

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393352** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.02.23

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.05.31

(54) **КОМПОЗИЦИИ АГЕНТА ДЦРНК К ОТКРЫТОЙ РАМКЕ СЧИТЫВАНИЯ 72 (C9orf72) ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ХРОМОСОМЫ 9 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) 63/196,791

(72) Изобретатель:

(32) 2021.06.04

Данг Лан Тхи Хоанг, Макининч
Джеймс Д., Нгуйен Туйен М., Шарма-
Каннинг Аарти, Френдевей Дэвид,
Сэвидж Бриттани (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/031519

(87) WO 2022/256290 2022.12.08

(88) 2023.01.19

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК.; РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к агентам на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНКи) и композициям, нацеленным на ген открытой рамки считывания 72 человеческой хромосомы 9 (C9orf72), а также к способам ингибирования экспрессии гена C9orf72 и способам лечения субъектов, имеющих C9orf72-ассоциированное заболевание или нарушение, например C9orf72-ассоциированный боковой амиотрофический склероз, лобно-височную деменцию или синдром, подобный болезни Хантингтона, обусловленный экспансиями C9orf72, с применением таких агентов на основе дцРНКи и композиций.

A1

202393352

202393352

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579652EA/022

КОМПОЗИЦИИ АГЕНТА мРНК К ОТКРЫТОЙ РАМКЕ СЧИТЫВАНИЯ 72 (C9ORF72) ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ХРОМОСОМЫ 9 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета в соответствии с предварительной заявкой США № 63/196791, поданной 4 июня 2021 г., полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Открытая рамка считывания 72 человеческой хромосомы 9 (C9orf72) представляет собой белок, кодируемый геном *c9orf72*. C9orf72 обнаруживается во многих областях головного мозга, таких как кора головного мозга, в цитоплазме астроцитов и нейронов, а также в пресинаптических окончаниях.

Различное использование альтернативных сайтов начала и терминации транскрипции приводит к образованию трех смысловых РНК-транскриптов с ДНК *C9orf72*. Они кодируют две изоформы белка, состоящие из длинной изоформы (изоформы А) размером приблизительно 54 кДа, происходящей из вариантов 2 (NM_018325.4) и 3 (NM_001256054.2), и короткой изоформы (изоформы В) размером приблизительно 24 кДа, происходящей из варианта 1 (NM_145005.6) (см, например, Фигуру 1 из Barker, *et al.* (2017) *Frontiers Cell Neurosci* 11:1-15). Помимо смысловых РНК-транскриптов с ДНК *C9orf72* существуют антисмысловые РНК-транскрипты, содержащие повторы, уровень которых, как было показано, повышен в головном мозге пациентов, положительных по экспансии *C9orf72*. Также существуют не содержащие повторов смысловые и антисмысловые РНК-транскрипты в зависимости от местоположения сайта начала транскрипции.

Два поочередно используемых первых экзона гена *C9orf72* представляют собой экзоны 1a и 1b (см., например, Фигуру 1 из Barker, *et al.*, *выше*). Высокая экспансия нуклеотидного повтора GGGGCC (G₄C₂) (от примерно 2-22 копий до 700-1600 копий) в первом интроне гена *C9orf72* между экзонами 1a и 1b, как было показано, 1) препятствует транскрипции не содержащей повторов мРНК *C9orf72*, что уменьшает уровни мРНК и белка C9orf72, 2) приводит к образованию токсичных белков с дипептидными повторами посредством RAN-инициируемой трансляции, а также 3) приводит к образованию ядерных и цитоплазматических очагов РНК, оба из которых могут быть патогенными и приводят к нескольким нейродегенеративным заболеваниям с различными клиническими признаками, но общими патологическими признаками и генетическими причинами (Ling, *et al.* (2013) *Neuron* 79:416-438). Кроме того, было показано, что содержащие повторы антисмысловые РНК-транскрипты накапливаются в ядерных и цитоплазматических очагах РНК, а также способствуют экспрессии токсичных антисмысловых белков с дипептидными повторами посредством RAN-инициируемой трансляции. В частности, присутствие экспансии гексануклеотидных повторов в гене *C9orf72* является наиболее частой генетической причиной семейного и спорадического бокового амиотрофического склероза (ALS),

разрушительного дегенеративного заболевания двигательных нейронов в головном мозге и спинном мозге. Действительно, мутационные экспансии гексануклеотидных повторов *C9orf72* присутствуют у приблизительно 40% субъектов с семейным ALS и у 8-10% субъектов со спорадическим ALS. Экспансия гексануклеотидных повторов в гене *C9orf72* также является наиболее частой причиной семейной лобно-височной деменции (FTD), второй наиболее распространенной формы пресенильной деменции после болезни Альцгеймера, которая характеризуется поведенческими нарушениями и нарушениями речи и проявляется патологически атрофией нейронов в лобной и передней височной долях головного мозга. Синдром, подобный болезни Хантингтона, обусловленный экспансиями *C9orf72*, характеризуется двигательными нарушениями, включая дистонию, хорею, миоклонус, тремор и ригидность, нарушение когнитивных функций и памяти, ранние психические нарушения и поведенческие расстройства, также ассоциирован с экспансией гексануклеотидных повторов в гене *C9orf72*.

Хотя функции белка *C9orf72* все еще изучаются, было показано, что *C9orf72* взаимодействует и активирует белки Rab, которые участвуют в регуляции цитоскелета, аутофагии и эндоцитарного транспорта. Кроме того, было продемонстрировано, что регуляция многих клеточных путей нарушена при нейродегенеративных заболеваниях, ассоциированных с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*. Например, измененный процессинг РНК постоянно выходил на передний план исследований *C9orf72*-ассоциированного заболевания. Это включает двунаправленную транскрипцию последовательности повтора, накопление РНК повтора в ядерных очагах, секвестрирующих специфичные РНК-связывающие белки (RBP), и трансляцию РНК повторов в белки с дипептидными повторами (DPR) посредством ассоциированной с повторами трансляции, инициируемой в кодоне, отличном от AUG (RAN). Кроме того, было показано, что высвобождение РНК *C9orf72* из РНК-полимеразы II, трансляция в цитоплазме и деградация нарушаются экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*. Кроме того, было идентифицировано несколько изменений в процессинге самой РНК *C9orf72* касательно ее транскрипции, сплайсинга и локализации (см., например, Barker, *et al.*, *выше*).

Независимо от механизма, несколько групп выявили присутствие очагов, содержащих смысловой и антисмысловой *C9orf72*, а также присутствие аберрантных белков с дипептидными повторами (DPR) (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и поли(PR)), продуцированных со всех рамок считывания смысловых или антисмысловых РНК *C9orf72*, содержащих повторы, посредством ассоциированной с повторами трансляции, зависимой от кодона, отличного от AUG (RAN), в нескольких типах клеток в нервной системе субъектов, имеющих *C9orf72*-ассоциированное заболевание (Lagier-Tourenne, *et al.* (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* doi/10.1073/pnas.1318835110; Jiang, *et al.* (2016) *Neuron* 90:535-550). Кроме того, у мышей с одним инактивированным аллелем *C9orf72* не наблюдали заболевания, но у мышей с обоими инактивированными аллелями *C9orf72* наблюдали спленомегалию, увеличенные лимфатические узлы и легкий дефицит социального взаимодействия, но не наблюдали двигательной дисфункции. Кроме того,

было показано, что у мышей, экспрессирующих РНК *C9orf72* человека, содержащую до 450 повторов GGGGCC, экспансии гексануклеотидов вызвали зависимое от возраста, длины повторов и уровня экспрессии накопление содержащих смысловую и антисмысловую РНК очагов и белков с дипептидными повторами, синтезированных посредством AUG-независимой трансляции, сопровождающееся потерей нейронов гиппокампа, повышенной тревожностью и нарушением когнитивной функции (Jiang, *et al.* (2016) *Neuron* 90:535-550).

В настоящее время не существует лечения субъектов с *C9orf72*-ассоциированным заболеванием, например, *C9orf72*-ассоциированным боковым амиотрофическим склерозом, *C9orf72*-ассоциированной лобно-височной деменцией или болезнью Хантингтона, например, синдромом, подобным болезни Хантингтона, обусловленным экспансиями *C9orf72*, паркинсонизмом, оливопонтномозжечковой дегенерацией, кортикобазальным синдромом или болезнью Альцгеймера, и виды лечения направлены только на облегчение симптомов и улучшение качества жизни пациента по мере прогрессирования заболевания.

Соответственно, в данной области техники существует потребность в агентах, которые могут селективно и эффективно ингибировать экспрессию гена *C9orf72*, например, содержащих гексануклеотидные повторы РНК *C9orf72*, например, для лечения субъектов, имеющих *C9orf72*-ассоциированное нарушение.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены композиции иРНК, с помощью которых осуществляют опосредуемое РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена *C9orf72*, такого как ген *C9orf72*, имеющий распространившийся повтор GGGGCC (G_4C_2) (экспансия). РНК-транскрипт *C9orf72* может находиться внутри клетки, например, клетки в организме субъекта, такого как человек. Применение указанных иРНК обеспечивает нацеленную деградацию одной или более РНК соответствующего гена (гена *C9orf72*) у млекопитающих.

иРНК согласно настоящему изобретению были разработаны для нацеливания на транскрипт гена *C9orf72*, например, транскрипт гена *C9orf72*, имеющий экспансированный гексануклеотидный повтор GGGGCC в интроне указанного гена. Агенты могут быть нацелены на зрелую мРНК *C9orf72* (мРНК, имеющую сплайсированные интроны) или смысловую или антисмысловую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор (например, РНК, содержащую интрон 1А *C9orf72*). Описанные иРНК могут иметь одну или более нуклеотидных модификаций или комбинацию нуклеотидных модификаций, которые повышают активность, доставку и/или стабильность иРНК.

Агенты могут быть нацелены на смысловую цепь зрелой мРНК *C9orf72* (мРНК, имеющую сплайсированные интроны) или смысловую или антисмысловую цепь РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор (РНК, содержащую интрон 1А *C9orf72*). Согласно определенным аспектам настоящего изобретения агенты РНК и согласно настоящему изобретению могут быть нацелены на смысловой и/или антисмысловой РНК-транскрипт *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор (РНК, содержащую интрон 1А

C9orf72). Нацеливание на смысловую цепь и/или антисмысловую цепь РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, может ингибировать экспрессию или уменьшать присутствие aberrантных белков с дипептидными повторами (DPR) (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(РА) и поли(PR)), которые продуцируются со всех рамок считывания смысловых или антисмысловых содержащих повторы РНК *C9orf72* посредством ассоциированной с повторами трансляции, зависимой от кодона, отличного от AUG (RAN), в клетках нервной системы субъектов, имеющих *C9orf72*-ассоциированное заболевание. Согласно некоторым вариантам реализации предложена комбинация как РНК-агента, нацеленного на смысловую цепь РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, так и РНК-агента, нацеленного на антисмысловую цепь РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор.

иРНК согласно настоящему изобретению могут уменьшать уровни зрелой мРНК *C9orf72* в меньшей степени, чем они уменьшают уровни РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор. Например, иРНК согласно настоящему изобретению могут уменьшать уровни зрелой мРНК *C9orf72* не более чем на примерно 50% и снижать уровень очагов, содержащих смысловую и антисмысловую РНК *C9orf72*, снижать уровни одного или более aberrантных белков с дипептидными повторами (DPR) (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(РА) и поли(PR)) и/или уменьшать уровни смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, более чем на примерно 50%. Не ограничиваясь теорией, полагают, что комбинация или подкомбинация указанных выше свойств и конкретных целевых сайтов или конкретные модификации в указанных иРНК обеспечивают иРНК согласно настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, активность, долговечность и безопасность.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены агенты на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для нокдауна целевой РНК *C9orf72* в клетке.

Согласно одному варианту реализации агенты на основе дцРНК нацелены на область целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, например, несколько последовательных копий гексануклеотидного повтора GGGGCC или CCCCGG. Согласно некоторым вариантам реализации целевая РНК *C9orf72* может представлять собой смысловую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор, целевую антисмысловую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор, или комбинацию смысловой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, и целевой антисмысловой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии *C9orf72*, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0,

нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:13, и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:14; и при этом указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь, или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии *C9orf72*, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:17, и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:18; и при этом указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь, или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии *C9orf72*, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:19, и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:20; и при этом указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь, или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению нацелен на антисмысловой РНК-транскрипт *C9orf72* в области между сайтом начала антисмыслового РНК-транскрипта и 5'-концом экзона 1В. Согласно другому варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению нацелен на антисмысловой РНК-транскрипт *C9orf72* в области между сайтом начала антисмыслового РНК-транскрипта и гексануклеотидным повтором. Согласно другому варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению нацелен на антисмысловой РНК-транскрипт

нацелен на антисмысловой РНК-транскрипт *C9orf72* в области между гексануклеотидным повтором и 500 основаниями выше 5'-конца экзона 1А. Согласно другому варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению нацелен на антисмысловой РНК-транскрипт *C9orf72* в области между гексануклеотидным повтором и 1000 оснований выше 5'-конца экзона 1А. Согласно другому варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению нацелен на антисмысловой РНК-транскрипт *C9orf72* в области между гексануклеотидным повтором и 1500 основаниями выше 5'-конца экзона 1А. Согласно другому варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению нацелен на антисмысловой РНК-транскрипт *C9orf72* в области между гексануклеотидным повтором и 2000 оснований выше 5'-конца экзона 1А.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии *C9orf72*, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от целевой последовательности мРНК в любой из Таблиц 4А-4G и 7А-7E; и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности соответствующей целевой последовательности мРНК в любой из Таблиц 4А-4G и 7А-7E.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая цепь или антисмысловая цепь, или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии *C9orf72*, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от целевой последовательности мРНК в любой из Таблиц 4А-4G; и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности соответствующей целевой последовательности мРНК в любой из Таблиц 4А-4G; и

б) агента на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии *C9orf72*, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом

указанная смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от целевой последовательности мРНК в любой из Таблиц 7А-7Е; и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности соответствующей целевой последовательности мРНК в любой из Таблиц 7А-7Е.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая цепь или антисмысловая цепь, или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 21; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 7А-7Е.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 22; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 7А-7Е.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 23; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 7А-7Е.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 24; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 7А-7Е.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 25; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1

или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 7А-7Е.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 26; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 7А-7Е.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 51; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4А-4Г.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 52; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом

указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4А-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 53; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4А-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 54; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4А-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 55; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4А-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 56; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4А-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 57; и

б) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4А-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

а) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по

меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 58; и

b) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4A-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

a) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 59; и

b) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4A-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

a) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 60; и

b) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4A-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

a) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и

антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 61; и

b) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4A-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация:

a) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта смысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от комплементарной последовательности SEQ ID NO: 62; и

b) агента на основе дцРНК для ингибирования экспрессии транскрипта антисмысловой цепи C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от комплементарной последовательности любой из целевых последовательностей мРНК в любой из Таблиц 4A-4G.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена комбинация первого агента на основе дцРНК, нацеленного на антисмысловой РНК-транскрипт C9orf72, и второго агента на основе дцРНК, нацеленного на транскрипт смысловой цепи C9orf72, причем

a) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446213; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285238;

b) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446213; и указанный второй агент на основе

дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285234;

с) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446246; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285238;

д) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446246; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285234;

е) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446268; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285238;

ф) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446268; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285234.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь или антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из группы, состоящей из любой из смысловых цепей и антисмысловых цепей в любой из Таблиц 2, 3, 10A, 10C, 11, и 12; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и

указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336; 27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; или 27573717-27573739 SEQ ID NO: 13; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь или антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1; AD-1446217.1; AD-1446222.1; AD-1446234.1; AD-1446243.1; AD-1446246.1; AD-1446252.1; AD-1446259.1; AD-1446265.1; AD-1446268.1; AD-1446271.1; AD-1446279.1; AD-1446289.1; и AD-1446294.1.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь или антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1; AD-1446246.1; и AD-1446268.1.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии C9orf72, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 5, 6, 10B, и 10D; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии c9orf72, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной

последовательности из нуклеотидов 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; 59-81; 62-84; или 69-91 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, или 23, последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446073.1; AD-1446075.1; AD-1285246.2; AD-1446084.1; AD-1446087.1; AD-1446090.1; и AD-1446095.1.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии c9orf72, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5197-5219; 5213-5235; 5223-5245; 5226-5248; 5227-5249; 5228-5250, 5229-5251, 5230-5252, 5231-5253, 5233-5255; 5235-5256, 5241-5263; 5245-5267; 5233-5255; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; или 6048-6070 SEQ ID NO: 15, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:16; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285231.1, AD-1285232.1, AD-1285233.1, AD-1285235.1, AD-1285237.1, AD-1285239.1, AD-1285240.1, AD-1285242.1, AD-1285244.1; AD-1285238.1; AD-1285243.1; AD-1285234.1; AD-1285241.1; AD-1285236.1; AD-1446111.1; AD-1446117.1; AD-1446147.1; AD-1446157.1; AD-1446168.1; AD-1446180.1; AD-1446189.1; AD-1446196.1; AD-1446202.1; AD-1446205.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы,

состоящей из AD-1285231.1, AD-1285232.1, AD-1285233.1, AD-1285234.1, AD-1285235.1, AD-1285236.1, AD-1285237.1, AD-1285239.1, AD-1285240.1, AD-1285241.1, AD-1285242.1, AD-1285243.1, AD-1446087.1 и AD-1446090.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285238.1 и AD-1285234.1.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии c9orf72, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO: 15, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:16; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии c9orf72, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:5; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии *c9orf72*, причем указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21, последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, например, 3, 2, 1 или 0, нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-27573740 SEQ ID NO: 13, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15, например, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:14; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии *C9orf72*, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, при этом указанная смысловая цепь или антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из группы, состоящей из любой из смысловых цепей и антисмысловых цепей в любой из Таблиц 8 и 9; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с одним или более внутренними положениями в двухцепочечной области агента на основе дцРНК.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован посредством линкера или носителя.

Согласно одному варианту реализации липофильность липофильного фрагмента, измеренная по $\log K_{ow}$, превышает 0.

Согласно одному варианту реализации гидрофобность двухцепочечного агента РНКи, измеренная по несвязанной фракции двухцепочечного агента РНКи в анализе связывания с белками плазмы крови, превышает 0,2.

Согласно одному варианту реализации анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

Согласно одному варианту реализации все нуклеотиды смысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. Согласно одному варианту реализации все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. Согласно одному варианту реализации все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из: дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового нуклеотида (dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, 2'-О-гексадецил-модифицированного нуклеотида, 2'-фосфат-модифицированного нуклеотида, 2'-5'-связанного рибонуклеотида (3'-РНК), блокированного нуклеотида, неблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, ограниченного этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, инвертированного остатка без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2',3'-секо-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфонат, гликоль-модифицированной нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер гликолевой нуклеиновой кислоты (S-GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, и концевого нуклеотида, связанного с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты; и их комбинаций.

Согласно одному варианту реализации модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT), 2'-О-

гексадецил-модифицированного нуклеотида, 2'-фосфат-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида, блокированного нуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

Согласно одному варианту реализации модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

Согласно одному варианту реализации модифицированные нуклеотиды независимо выбраны из группы, состоящей из: 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, GNA-модифицированных нуклеотидов и 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-фосфат-модифицированного нуклеотида, 2'-О-гексадецил-модифицированного нуклеотида и 2'-фосфат-модифицированного нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации по существу все модифицированные нуклеотиды смысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов и 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации все модифицированные нуклеотиды смысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов и 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации по существу все модифицированные нуклеотиды антисмысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-фосфат-модифицированных нуклеотидов, нуклеотидов, модифицированных гликолевой нуклеиновой кислотой, и 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации все модифицированные нуклеотиды антисмысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-фосфат-модифицированных нуклеотидов, нуклеотидов, модифицированных гликолевой нуклеиновой кислотой, и 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации по существу все модифицированные нуклеотиды смысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-гексадецил-модифицированных нуклеотидов и нуклеотидов, модифицированных гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA). Согласно некоторым вариантам реализации все модифицированные нуклеотиды смысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-гексадецил-модифицированных нуклеотидов и нуклеотидов, модифицированных гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA).

Согласно одному варианту реализации по существу все модифицированные нуклеотиды антисмысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-фосфат-модифицированных нуклеотидов и нуклеотидов, модифицированных гликолевой

нуклеиновой кислотой (GNA). Согласно некоторым вариантам реализации все модифицированные нуклеотиды антисмысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-фосфат-модифицированных нуклеотидов и нуклеотидов, модифицированных гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA).

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи, на 3'-конце одной цепи или находится как на 5'-конце, так и на 3'-конце одной цепи.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь на 5'-конце и одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь на 3'-конце. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-конце, так и на 3'-конце антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и 1 фосфотиоатную межнуклеотидную связь на 3'-конце. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит три фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь на 3'-конце. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит три фосфотиоатные

межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце.

Согласно одному варианту реализации все модифицированные нуклеотиды смысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-гексадецил-модифицированных нуклеотидов и 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, все модифицированные нуклеотиды антисмысловой цепи выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-фосфат-модифицированных нуклеотидов, нуклеотидов, модифицированных гликолевой нуклеиновой кислотой, и 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, и антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи или винилфосфонат на 3'-конце.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь имеет длину не более 30 нуклеотидов. Согласно другому варианту реализации антисмысловая цепь имеет длину не более 30 нуклеотидов. Согласно одному варианту реализации каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо имеет длину не более 30 нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно другому варианту реализации по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов. Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит 3'-липкий конец.

Двухцепочечная область может иметь длину 15-30 пар нуклеотидов; 17-23 пары нуклеотидов; 17-25 пар нуклеотидов; 23-27 пар нуклеотидов; 19-21 пару нуклеотидов; длину 21-23 пары нуклеотидов или 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 пары нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации двухцепочечная область имеет длину 20 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации двухцепочечная область имеет длину 21 нуклеотид. Двухцепочечная область может иметь 0, 1, 2 или 3 несовпадения.

Каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи может независимо иметь длину 17-30 нуклеотидов, 17-25, 19-30 нуклеотидов; 19-25 нуклеотидов; 19-23 нуклеотида; или 21-23 нуклеотида или 19, 20, 21, 22 или 23 нуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь имеет длину 20 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь имеет длину 22 нуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида и антисмысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида и содержит инвертированные лишённые азотистого основания остатки в 3'- и 5'-концевых положениях нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации область комплементарности имеет длину по меньшей мере 17 нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации область

комплементарности имеет длину 19-30 нуклеотидов; 19-25 нуклеотидов; или 21-23 нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации область комплементарности по меньшей мере на 85% комплементарна последовательности между началом экзона 1А и началом экзона 2 гена *C9orf72*. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит последовательность из 15-25 последовательных нуклеотидов, имеющую по меньшей мере 85% комплементарности последовательности из 15-25 последовательных нуклеотидов, присутствующих в последовательности между началом экзона 1А и началом экзона 2 целевой РНК *C9orf72*. Согласно другим вариантам реализации область комплементарности по меньшей мере на 90% комплементарна последовательности между началом экзона 1А и началом экзона 2 целевой РНК *C9orf72*. Согласно одному варианту реализации область комплементарности по меньшей мере на 95% комплементарна последовательности между началом экзона 1А и началом экзона 2 целевой РНК *C9orf72*. Согласно некоторым вариантам реализации область комплементарности на 100% комплементарна последовательности между началом экзона 1А и началом экзона 2 целевой РНК *C9orf72*. Согласно некоторым вариантам реализации область комплементарности на 100% комплементарна последовательности между концом экзона 1А и началом области гексануклеотидных повторов целевой РНК *C9orf72*.

Согласно одному варианту реализации область комплементарности по меньшей мере на 85% комплементарна последовательности между концом экзона 1А и началом гексануклеотидного повтора в интроне 1А гена *C9orf72*. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит последовательность из 15-25 последовательных нуклеотидов, имеющую по меньшей мере 85% комплементарности последовательности из 15-25 последовательных нуклеотидов, присутствующих в последовательности между концом экзона 1А и началом гексануклеотидного повтора в интроне 1А целевой РНК *C9orf72*. Согласно другим вариантам реализации область комплементарности по меньшей мере на 90% комплементарна последовательности между концом экзона 1А и началом гексануклеотидного повтора в интроне 1А целевой РНК *C9orf72*. Согласно одному варианту реализации область комплементарности по меньшей мере на 95% комплементарна последовательности между концом экзона 1А и началом гексануклеотидного повтора в интроне 1А целевой РНК *C9orf72*. Согласно некоторым вариантам реализации область комплементарности на 100% комплементарна последовательности между концом экзона 1А и началом гексануклеотидного повтора в интроне 1А целевой РНК *C9orf72*.

Согласно некоторым вариантам реализации композиций и способов согласно настоящему изобретению агент РНКи дополнительно содержит один или более липофильных фрагментов. Конъюгированные с липофильными фрагментами агенты РНКи являются предпочтительными для доставки *in vivo* нуклеиновых кислот, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, описанных в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации один или более липофильных

фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи. Липофильный фрагмент может быть конъюгирован с внутренними положениями посредством линкера или носителя. Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент облегчает или улучшает доставку агента РНК к нейрональной клетке или клетке в нейрональной ткани.

Согласно одному варианту реализации внутреннее положение может представлять собой любое положение, за исключением двух концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи.

Согласно другому варианту реализации внутреннее положение может представлять собой любое положение, за исключением трех концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи.

Согласно одному варианту реализации внутреннее положение исключает область сайта расщепления смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутреннее положение может представлять собой любое положение, за исключением положений 9-12, считая от 5'-конца смысловой цепи.

Согласно другому варианту реализации внутреннее положение может представлять собой любое положение, за исключением положений 11-13, считая от 3'-конца смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутреннее положение исключает область сайта расщепления антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутреннее положение может представлять собой любое положение, за исключением положений 12-14, считая от 5'-конца антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутреннее положение может представлять собой любое положение, за исключением положений 11-13 на смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положений 12-14 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 на смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

Согласно другому варианту реализации один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 на смысловой цепи и положений 15 и 17 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения в двухцепочечной области исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, и липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7,

положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи.

Согласно другому варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно другому варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с положением 20 или положением 15 смысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с положением 16 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, пирен-1-масляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексианола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О3-(олеил)литохолевой кислоты, О3-(олеил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С4-С30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида, алкенила и алкинила. Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит С6-С30 алкил, С6-С30 алкенил или С6-С30 алкинил.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С6-С18 углеводородную цепь. Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С6, С7, С8, С9, С10, С11, С12, С13, С15, С15, С16, С17 или С18 углеводородную цепь. Ненасыщенный С6-С18 может представлять собой мононенасыщенный С6-С18 или полиненасыщенный С6-С18.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С16 углеводородную цепь. Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит С16 алкил, С16 алкенил или С16 алкинил. Ненасыщенный С16 может представлять собой мононенасыщенный С16 или полиненасыщенный С16.

Согласно одному варианту реализации насыщенная или ненасыщенная С16 углеводородная цепь конъюгирована с положением 6, считая от 5'-конца цепи.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении(положениях) или двухцепочечной области.

Согласно одному варианту реализации носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент на основе сериного остова или диэтаноламинового остова.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с двухцепочечным агентом иРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

Согласно одному варианту реализации 3'-конец смысловой цепи защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, причем указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на нейрональную клетку, клетку в нейрональной ткани или клетку в ткани центральной нервной системы.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на ткань печени.

Согласно одному варианту реализации нацеливающий лиганд представляет собой конъюгат GalNAc.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом

Согласно одному варианту реализации миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

Согласно одному варианту реализации пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь имеет в общей сложности 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь имеет в общей сложности 23 нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК ингибирует экспрессию целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% в течение 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК селективно ингибирует экспрессию целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, по сравнению с экспрессией зрелой матричной РНК *C9orf72*.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК ингибирует экспрессию зрелой матричной РНК *C9orf72* на менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20% или менее чем 10% в течение 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую зрелую матричную РНК *C9orf72*.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК снижает синтез белка с дипептидными повторами (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и поли(PR)) в течение 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК снижает синтез белка с дипептидными повторами на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% в течение 24-48 часов после введения в клетку.

Согласно настоящему изобретению также предложены клетки и фармацевтические композиции для ингибирования экспрессии гена, кодирующего *C9orf72*, содержащие агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, например.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК находится в незабуферном растворе, таком как солевой раствор или вода.

Согласно другому варианту реализации агент на основе дцРНК находится в буферном растворе, таком как буферный раствор, содержащий ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или любую их комбинацию; или в фосфатно-солевом буферном растворе (ФСБ).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена композиция, содержащая два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, для ингибирования экспрессии *C9orf72*.

Согласно одному варианту реализации композиция содержит первый агент на основе дцРНК, нацеленный на смысловую цепь *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и

второй агент на основе дцРНК, нацеленный на антисмысловую цепь *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*).

Согласно некоторым вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на смысловую цепь *C9orf72*, для применения в композициях согласно настоящему изобретению, содержащих два или более агентов на основе дцРНК, содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, выбранные из группы, состоящей из

а) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5,

б) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16,

в) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 5, 6, 10B и 10D; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами;

г) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; 59-81; 62-84 или 69-91 SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

д) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5197-5219; 5213-5235; 5223-5245, 5226-5248; 5227-5249, 5228-5250, 5229-5251, 5230-5252, 5231-5253, 5233-5255; 5235-5256, 5241-5263; 5245-5267; 5233-5255; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; или 6048-6070 SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

е) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной

последовательности из нуклеотидов 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

g) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; и

h) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 8 и 9,

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно определенным вариантам реализации предложены подходящие агенты, нацеленные на смысловую цепь *C9orf72*, например, смысловую последовательность экзона или интрона *C9orf72*, для применения в композициях согласно настоящему изобретению, содержащих два или более агентов на основе дцРНК, таких как агенты на основе дцРНК, раскрытые в РСТ публикации WO 2021/119226, полное содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на антисмысловую цепь *C9orf72*, для применения в композициях согласно настоящему изобретению, содержащих два или более агентов на основе дцРНК, содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область и выбранные из группы, состоящей из

a) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:13, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

b) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной

последовательности SEQ ID NO: 17, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18,

с) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20,

d) антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2, 3, 10A, 10C, 11 и 12; и

e) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336; 27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; или 27573717-27573739 SEQ ID NO: 13;

f) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-27573740 SEQ ID NO: 13, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая два или более агентов на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК), для ингибирования экспрессии *C9orf72*,

причем каждый агент на основе дцРНК независимо содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

при этом первый агент на основе дцРНК, нацеленный на антисмысловую цепь *C9orf72*, выбран из группы, состоящей из

а) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 13, и антисмысловую цепи, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

б) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18,

в) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20,

д) агента на основе дцРНК, содержащего антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2, 3, 10А, 10С, 11 и 12;

е) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336; 27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; или 27573717-27573739 SEQ ID NO: 13; и

ф) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-27573740 SEQ ID NO: 13, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14; и

причем второй агент на основе дцРНК, нацеленный на смысловую цепь C9orf72, выбран из группы, состоящей из

а) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5,

б) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16,

с) агента на основе дцРНК, содержащего антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 5, 6, 10B и 10D;

д) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; 59-81, 62-84, 69-91 SEQ ID NO: 1, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

е) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5197-5219; 5213-5235; 5223-5245, 5226-5248; 5227-5249, 5228-5250, 5229-5251, 5230-5252, 5231-5253, 5233-5255; 5235-5256, 5241-5263; 5245-5267; 5233-5255; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; или 6048-6070 SEQ ID NO: 15, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

ф) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO: 15, и антисмысловую цепь,

содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

g) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO: 1, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; и

h) агента на основе дцРНК, содержащего антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 8 и 9; и

при этом указанная смысловая цепь первой дцРНК, указанная антисмысловая цепь первой дцРНК, как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь первой дцРНК, указанная смысловая цепь второй дцРНК, указанная антисмысловая цепь второй дцРНК и/или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь второй дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь или антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1; AD-1446217.1; AD-1446222.1; AD-1446234.1; AD-1446243.1; AD-1446246.1; AD-1446252.1; AD-1446259.1; AD-1446265.1; AD-1446268.1; AD-1446271.1; AD-1446279.1; AD-1446289.1; и AD-1446294.1.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь или антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1; AD-1446246.1; и AD-1446268.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, двумя или одним нуклеотидом от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или нуклеотидных последовательностей смысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446073.1; AD-1446075.1; AD-1285246.2; AD-1446084.1; AD-1446087.1; AD-1446090.1 и AD-1446095.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, двумя или одним нуклеотидом от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или нуклеотидных последовательностей смысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285231.1, AD-1285232.1, AD-1285233.1, AD-1285235.1, AD-1285237.1, AD-1285239.1, AD-1285240.1, AD-1285242.1, AD-1285244.1; AD-1285238.1; AD-1285234.1; AD-1285243.1; AD-1285241.1; AD-1285236.1; AD-1446111.1; AD-1446117.1; AD-

1446147.1; AD-1446157.1; AD-1446168.1; AD-1446180.1; AD-1446189.1; AD-1446196.1; AD-1446202.1; AD-1446205.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, двумя или одним нуклеотидом от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или нуклеотидных последовательностей смысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285238.1 и AD-1285234.1.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь первого агента на основе дцРНК содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, двумя или одним нуклеотидом от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или нуклеотидных последовательностей смысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1, AD-1446246.1 и AD-1446268.1; и антисмысловая цепь второго агента на основе дцРНК содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя, двумя или одним нуклеотидом от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи и/или нуклеотидных последовательностей смысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285238.1 и AD-1285234.1.

Согласно одному варианту реализации а) первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446213; и второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285238;

б) первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446213; и второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285234;

с) первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446246; и второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285238;

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с одним или более внутренними положениями в двухцепочечной области первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК посредством линкера или носителя.

Согласно одному варианту реализации липофильность липофильного фрагмента, измеренная по $\log K_{ow}$, конъюгированного с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК, превышает 0.

Согласно одному варианту реализации гидрофобность первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК, измеренная по несвязанной фракции агента на основе дцРНК в анализе связывания с белками плазмы крови, превышает 0,2.

Согласно одному варианту реализации анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

Согласно одному варианту реализации все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК представляют собой модифицированные нуклеотиды.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового нуклеотида (dT), 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, 2'-O-гексадецилнуклеотида, 2'-фосфатнуклеотида, блокированного нуклеотида, неблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, ограниченного этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, инвертированного остатка без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-O-аллил-

модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксимодифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2',3'-секо-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфонат, гликоль-модифицированной нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотида, содержащего аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (S-GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, и концевую нуклеотида, связанного с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты; и их комбинаций.

Согласно одному варианту реализации модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-дезокси-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT), блокированного нуклеотида, 2'-О-гексадецилнуклеотида, 2'-фосфатнуклеотида, гликолевого нуклеотида, винилфосфонатного нуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

Согласно одному варианту реализации модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

Согласно одному варианту реализации модифицированные нуклеотиды независимо выбраны из группы, состоящей из: 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, GNA-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-гексадецил-модифицированных нуклеотидов, 2'-фосфат-модифицированных нуклеотидов, винилфосфонат-модифицированных нуклеотидов и 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК содержат по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК содержат 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

Согласно одному варианту реализации каждая цепь первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину не более 30 нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна цепь первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере одна цепь первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечная область первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину по меньшей мере 15-30 нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечная область первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину 17-23 пары нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечная область первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину 17-25 пар нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечная область первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину 23-27 пар нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечная область первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину 19-21 пару нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечная область первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину 21-23 пары нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации каждая цепь первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину 19-30 нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации каждая цепь первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину 19-23 нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации каждая цепь первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК имеет длину 21-23 нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК посредством линкера или носителя.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на

основе дцРНК включают любые положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК включают любые положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК включают любые положения, за исключением положений 9-12, считая от 5'-конца смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК включают любые положения, за исключением положений 11-13, считая от 3'-конца смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК исключают область сайта расщепления антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК включают любые положения, за исключением положений 12-14, считая от 5'-конца антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК включают любые положения, за исключением положений 11-13 на смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положений 12-14 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 на смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

Согласно одному варианту реализации один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 на смысловой цепи и положений 15 и 17 на антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

Согласно одному варианту реализации внутренние положения в двухцепочечной области первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, и липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК в положении 21, положении 20, положении 15, положении 1 или положении 7 смысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК в положении 21, положении 20 или положении 15 смысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК в положении 20 или положении 15 смысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК в положении 16 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент, конъюгированный с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК, представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, пирен-1-масляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексианола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, ОЗ-(олеил)литохолевой кислоты, ОЗ-(олеил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С4-С30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

Согласно одному варианту реализации насыщенная или ненасыщенная C16 углеводородная цепь конъюгирована с положением 6, считая от 5'-конца цепи.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении(ях) или двухцепочечной области.

Согласно одному варианту реализации носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент на основе сериного остова или диэтаноламинового остова.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с двухцепочечным агентом иРНК первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агентов на основе дцРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК.

Согласно одному варианту реализации липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован с первым агентом на основе дцРНК, вторым агентом на основе дцРНК или как первым, так и вторым агентом на основе дцРНК посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

Согласно одному варианту реализации 3'-конец смысловой цепи первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, причем указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила,

изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на нейрональную клетку, клетку в нейрональной ткани или клетку в ткани центральной нервной системы, или ткань печени.

Согласно одному варианту реализации нацеливающий лиганд представляет собой конъюгат GalNAc.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой, второй или третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающей в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, возникающую в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

Согласно одному варианту реализации первый агент на основе дцРНК, второй агент на основе дцРНК или как первый, так и второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

Согласно одному варианту реализации пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса первого агента на основе дцРНК, второго агента на основе

дцРНК или как первого, так и второго агента на основе дцРНК представляет собой пару оснований AU.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид и антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида.

Согласно настоящему изобретению также предложены клетки, содержащие композицию согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам реализации композиции согласно настоящему изобретению представляют собой фармацевтические композиции и, согласно некоторым вариантам реализации, содержат липидный состав.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ снижения уровня одного или более РНК-транскриптов *C9orf72*, такой как РНК *C9orf72*, содержащая гексануклеотидный повтор, такой как ген *C9orf72*, содержащий множество последовательных копий гексануклеотидного повтора, в клетке, например, нейроне, таком как двигательный нейрон, причем указанный способ включает приведение клетки в контакт с агентом на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, двумя или более, например, 2, 3 или 4, агентами на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композицией, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, для ингибирования экспрессии одного или более РНК-транскриптов *C9orf72*, например, первым агентом на основе дцРНК, нацеленным на смысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и вторым агентом на основе дцРНК, нацеленным на антисмысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), описанными в настоящем документе, или фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению, что ингибирует экспрессию гена *C9orf72* в клетке.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы снижения синтеза белка с дипептидными повторами или уровня агрегатов белка с дипептидными повторами в клетке. Способы включают введение в клетку агента на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композиции, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, для ингибирования экспрессии одного или более РНК-транскриптов *C9orf72*, например, первого агента на основе дцРНК, нацеленного на смысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и второго агента на основе дцРНК, нацеленного на антисмысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что снижает синтез белка с дипептидными повторами и уровень агрегатов белка с дипептидными повторами в клетке.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы снижения накопления или агрегации пептидов поли(глицин-аланин), пептидов поли(глицин-пролин), пептидов поли(глицин-аргинин), пептидов поли(аланин-пролин) или пептидов поли(пролин-аргинин) в клетке. Способы включают введение в клетку агента на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на

основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композиции, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, для ингибирования экспрессии *C9orf72*, например, первого агента на основе дцРНК, нацеленного на смысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и второго агента на основе дцРНК, нацеленного на антисмысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что снижает накопление или агрегацию пептидов поли(глицин-аланин), пептидов поли(глицин-пролин), пептидов поли(глицин-аргинин), пептидов поли(аланин-пролин) или пептидов поли(пролин-аргинин) в клетке.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы снижения зависимого от длины повтора образования очагов РНК *C9orf72* в клетке. Способы включают введение в клетку агента на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композиции, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, для ингибирования экспрессии *C9orf72*, например, первого агента на основе дцРНК, нацеленного на смысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и второго агента на основе дцРНК, нацеленного на антисмысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что снижает зависимое от длины повтора образование очагов РНК *C9orf72* в клетке.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены способы уменьшения ядерных и/или цитоплазматических очагов смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72* в клетке. Способы включают введение в клетку агента на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композиции, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, для ингибирования экспрессии *C9orf72*, например, первого агента на основе дцРНК, нацеленного на смысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и второго агента на основе дцРНК, нацеленного на антисмысловой транскрипт *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что уменьшает ядерные и/или цитоплазматические очаги смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72* в клетке.

Согласно одному варианту реализации клетка находится в организме субъекта.

Согласно одному варианту реализации субъект представляет собой человека.

Согласно одному варианту реализации субъект имеет или подвержен риску развития нарушения, ассоциированного с *C9orf72*, такого как заболевание, состояние или нарушение, ассоциированное с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*.

Согласно одному варианту реализации *C9orf72*-ассоциированное нарушение выбрано из группы, состоящей из *C9orf72*-ассоциированного бокового амиотрофического склероза, лобно-височной деменции, болезни Хантингтона, синдрома, подобного болезни

Хантингтона, обусловленного экспансиями гексануклеотидных повторов *C9orf72*, паркинсонизма, оливопонтномозжечковой дегенерации, кортикобазального синдрома и болезни Альцгеймера.

Согласно одному варианту реализации приведение клетки в контакт со агентом на основе дцРНК ингибирует уровни смысловых и/или антисмысловых РНК-транскриптов *C9orf72*, содержащей гексануклеотидные повторы, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

Согласно одному варианту реализации ингибирование уровней смысловых и/или антисмысловых РНК-транскриптов *C9orf72*, содержащей гексануклеотидные повторы, уменьшает уровень одного или более aberrантных белков с дипептидными повторами (DPR), выбранных из группы, состоящей из поли(глицин-аланин), поли(глицин-аргинин), поли(глицин-пролин), поли(пролин-аланин) и поли(пролин-аргинин), по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

Согласно одному варианту реализации приведение клетки в контакт с агентом на основе дцРНК ингибирует экспрессию мРНК *C9orf72* не более чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5%.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК ингибирует экспрессию целевой мРНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или по меньшей мере 60% в течение 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК селективно ингибирует экспрессию целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, по сравнению с экспрессией зрелой матричной РНК *C9orf72*. Согласно другим вариантам реализации агент на основе дцРНК ингибирует экспрессию зрелой матричной РНК *C9orf72* на менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20% или менее чем 10% в течение 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую зрелую матричную РНК *C9orf72*.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК снижает синтез белка с дипептидными повторами (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и/или поли(PR)) или уровень агрегатов белка с дипептидными повторами (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и/или поли(PR)) в клетке.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК уменьшает ядерные и/или цитоплазматические очаги смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72* в клетке.

Согласно одному варианту реализации ингибирование экспрессии *C9orf72* уменьшает уровень белка *C9orf72* в сыворотке крови субъекта не более чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5%.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК снижает синтез белка с дипептидными повторами (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и/или

поли(PR)) или уровень агрегатов белка с дипептидными повторами (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и/или поли(PR)) на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% в течение 24-48 часов после введения в клетку.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложены способы лечения субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от нокдауна целевой РНК *C9orf72*, такое как заболевание, состояние или нарушение, ассоциированное с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества агента на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композиции, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, для ингибирования экспрессии одной или более РНК *C9orf72*, например, первого агента на основе дцРНК, нацеленного на транскрипт смысловой цепи *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и второго агента на основе дцРНК, нацеленного на транскрипт антисмысловой цепи *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что обеспечивает лечение субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от снижения экспрессии *C9orf72*.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен способ предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от снижения экспрессии РНК *C9orf72*, включающей экспансию гексануклеотидных повторов, такое как заболевание, состояние или нарушение, ассоциированное с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества агента на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композиции, содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, для ингибирования экспрессии *C9orf72*, например, первого агента на основе дцРНК, нацеленного на транскрипт смысловой цепи *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и второго агента на основе дцРНК, нацеленного на транскрипт антисмысловой цепи *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), описанных в настоящем документе, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что предотвращает по меньшей мере один симптом у субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от снижения экспрессии *C9orf72*.

Согласно одному варианту реализации способы включают введение первого агента на основе дцРНК, нацеленного на смысловую цепь *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*), и второго агента на основе дцРНК, нацеленного на антисмысловую цепь *C9orf72* (экзон или интрон *C9orf72*).

Согласно некоторым вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на смысловую цепь *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению,

включающих два или более агентов на основе дцРНК, содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, выбранные из группы, состоящей из

а) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5,

б) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16,

с) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 5, 6, 10B и 10D;

д) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; 59-81; 62-84 или 69-91 SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

е) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5197-5219; 5213-5235; 5223-5245; 5226-5248; 5227-5249; 5228-5250; 5229-5251; 5230-5252; 5231-5253; 5235-5256; 5241-5263; 5245-5267; 5233-5255; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; или 6048-6070 SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

ф) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере

15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

g) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; и

h) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 8 и 9,

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно определенным вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на смысловую цепь *C9orf72*, например, смысловую последовательность экзона или интрона *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению, включающих два или более агентов на основе дцРНК, представляют собой агенты на основе дцРНК, раскрытые в РСТ публикации WO 2021/119226, полное содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на антисмысловую цепь *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению, включающих два или более агентов на основе дцРНК, содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, выбранные из группы, состоящей из

a) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:13, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

b) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18,

c) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную

последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20,

d) антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2, 3, 10С, 10В, 11 и 12; и

e) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336; 27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; или 27573717-27573739 SEQ ID NO: 13;

f) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-27573740 SEQ ID NO: 13, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно одному варианту реализации нарушение представляет собой C9orf72-ассоциированное нарушение.

Согласно одному варианту реализации C9orf72-ассоциированное нарушение выбрано из группы, состоящей из C9orf72-ассоциированного бокового амиотрофического склероза, лобно-височной деменции, болезни Хантингтона, синдрома, подобного болезни Хантингтона, обусловленного экспансиями C9orf72, паркинсонизма, оливопонтномозжечковой дегенерации, кортикобазального синдрома и болезни Альцгеймера.

Согласно одному варианту реализации субъект представляет собой человека.

Согласно одному варианту реализации введение агента субъекту вызывает уменьшение накопления белка C9orf72.

Согласно некоторым вариантам реализации способ обеспечивает снижение синтеза белка с дипептидными повторами или снижение уровня агрегатов белка с дипептидными повторами у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации способ обеспечивает уменьшение экспрессии целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, содержащий множество последовательных копий SEQ ID NO: 1, у субъекта.

Согласно одному варианту реализации введение агента субъекту вызывает уменьшение уровня одного или более белков с дипептидными повторами (DPR), выбранных из группы, состоящей из поли(глицин-аланин), поли(глицин-аргинин), поли(глицин-пролин), поли(пролин-аланин) и поли(пролин-аргинин).

Согласно одному варианту реализации уровень одного или более абберантных белков с дипептидными повторами (DPR) уменьшается более чем на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

Согласно одному варианту реализации уровень поли(глицин-аланин) и/или поли(глицин-пролин) уменьшается более чем на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК вводят субъекту в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

Согласно одному варианту реализации агент на основе дцРНК вводят субъекту подкожно.

Согласно другому варианту реализации агент на основе дцРНК вводят субъекту интратекально.

Согласно еще одному варианту реализации агент на основе дцРНК вводят субъекту интрацеребровентрикулярно.

Согласно одному варианту реализации способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают определение уровня *C9orf72* в образце(ах) от субъекта.

Согласно одному варианту реализации уровень *C9orf72* в образце(ах) от субъекта представляет собой уровень белка *C9orf72* в образце(ах) крови, сыворотки крови или спинномозговой жидкости.

Согласно одному варианту реализации способы согласно настоящему изобретению дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического агента.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен набор, содержащий любой один или более агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен флакон, содержащий любой один или более агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, композицию согласно настоящему изобретению или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен шприц, содержащий любой один или более агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению,

композицию согласно настоящему изобретению или фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи представляет собой его фармацевтически приемлемую соль. «Фармацевтически приемлемые соли» каждого из агентов РНКи в настоящем документе включают, но не ограничиваются перечисленными, натриевую соль, кальциевую соль, литиевую соль, калиевую соль, аммониевую соль, магниевую соль, их смеси. Специалист в данной области техники поймет, что агент РНКи, если он предложен в виде поликатионной соли, имеет одну катионную группу на свободную кислотную группу необязательно модифицированного фосфодиэфирного остова и/или любые другие кислотные модификации (например, 5'-концевые фосфонатные группы). Например, олигонуклеотид из «n» нуклеотидов в длину содержит n-1 необязательно модифицированных фосфодиэфиров так, что олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину может быть предложен в виде соли, содержащей до 20 катионов (например, 20 катионов натрия). Аналогичным образом, агенты РНКи, имеющие смысловую цепь из 21 нуклеотида в длину и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов в длину, могут быть предложены в виде соли, содержащей до 42 катионов (например, 42 катиона натрия). В предыдущем примере, в котором агент РНКи также включает 5'-концевой фосфат или 5'-концевую винилфосфонатную группу, агент РНКи может быть предложен в виде соли, содержащей до 44 катионов (например, 44 катиона натрия).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1 представляет собой график, показывающий результаты скрининга однократной дозы в клетках Cos-7 указанных агентов при конечной концентрации 10 нМ, 1 нМ или 0,1 нМ.

Фигура 2 представляет собой график, показывающий результаты подгруппы агентов из Фигуры 1, отобранных для дальнейшего анализа на основании скрининга однократной дозы в клетках Cos-7 при конечной концентрации 10 нМ, 1 нМ или 0,1 нМ.

Фигура 3 представляет собой график, показывающий результаты скрининга однократной дозы в клетках Cos-7 указанных агентов при конечной концентрации 10 нМ, 1 нМ или 0,1 нМ.

Фигура 4 представляет собой график, показывающий результаты подгруппы агентов из Фигуры 3, отобранных для дальнейшего анализа на основании скрининга однократной дозы в клетках Cos-7 при конечной концентрации 10 нМ, 1 нМ или 0,1 нМ.

Фигуры 5A-5B представляют собой графики, показывающие влияние представляющих интерес дуплексов на накопление РНК *C9orf72*. Эмбриональные стволовые клетки, несущие приблизительно 300X экспансию повтора G4C2, подвергали электропорации с 1 мкМ двух различных агентов на основе дцРНК, нацеленных на смысловую РНК (закрашенные темные столбики), или двух различных агентов на основе дцРНК, нацеленных на антисмысловую РНК (белые столбики), транскрибированную из области гена *C9orf72* между экзоном 1A и экспансией повтора, или комбинации киРНК-1 (AD1285238.1), нацеленной на смысловую РНК, и одной из каждой киРНК, нацеленной на

антисмысловую РНК (заштрихованные столбики). Нокдаун транскриптов, которые содержат последовательности, происходящие из области гена *C9orf72* между экзоном 1А и экспансией повтора (Фигура 5А), анализировали с помощью ОТ-кПЦР с использованием анализа, в котором детектируют последовательность из этой области. Следует отметить, что в этом анализе детектируют преимущественно смысловую РНК, поскольку уровень антисмысловой РНК составляет одну восьмую от уровня смысловой РНК. *C9orf72*-сплайсированную мРНК (Фигура 5В) анализировали с помощью ОТ-кПЦР с использованием анализа, в котором распознаются РНК, содержащие последовательности, которые охватывают место соединения экзонов 2 и 3. Данные нормировали к среднему значению для двух контрольных образцов (черные столбики), обработанных носителем, искусственной спинномозговой жидкостью (ИСМЖ).

Фигуры 6А-6С представляют собой Вестерн-слот-блоты (Фигура 6А) и графики количественной оценки блотов (Фигуры 6В и 6С), показывающие влияние представляющих интерес дуплексов на уровни белков с дипептидными повторами. Эмбриональные стволовые клетки, несущие приблизительно 300X экспансию повтора G4C2, подвергали электропорации с 1 мкМ двух различных агентов на основе дцРНК, нацеленных на смысловую РНК (закрашенные темные столбики, Фигуры 6В-6С), антисмысловую РНК (белые столбики, Фигуры 6В-6С), или комбинации, как на Фигуре 5 (заштрихованные столбики, Фигуры 6В-6С). Уровни белков с дипептидными повторами после нокдауна анализировали с помощью антител к поли(GlyAla) (Фигура 6А, правая панель) и поли(GlyPro) (Фигура 6А, левая панель). Относительные уровни белков для поли(GlyPro) (Фигура 6В) и поли(GlyAla) (Фигура 6С) после обработки киРНК количественно определяли и нормировали к образцам, обработанным ИСМЖ.

Фигура 7 представляет собой график, отображающий процент мРНК *C9orf72*, оставшейся после интратекального введения однократной дозы 3 мг/кг указанных дуплексов или ФСБ.

Фигура 8 представляет собой график, отображающий применение зондов Nanostring для картирования сайта начала транскрипции в антисмысловой РНК *C9orf72*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему изобретению предложены композиции для РНКи, которые влияют на опосредуемое РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена *C9orf72*, такого как ген *C9orf72*, имеющий экспансированный повтор GGGGCC (G₄C₂). Ген *C9orf72* может находиться внутри клетки, например, клетки в организме субъекта, такого как человек. Применение указанных иРНК обеспечивает нацеленную деграцию РНК соответствующего гена (гена *C9orf72*) у млекопитающих.

иРНК согласно настоящему изобретению были разработаны для нацеливания на целевую РНК *C9orf72*, например, целевую РНК *C9orf72*, имеющую экспансированный гексануклеотидный повтор GGGGCC в интроне указанного гена. Агенты могут быть нацелены на зрелую мРНК *C9orf72* (мРНК, в которой интроны были сплайсированы) или

предшественник мРНК *C9orf7* (мРНК, содержащую интроны). Согласно определенным аспектам настоящего изобретения агенты РНКи согласно настоящему изобретению могут быть нацелены на смысловой и/или антисмысловой РНК-транскрипт *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор (РНК, содержащую интрон 1А *C9orf72*). Нацеливание на смысловую и/или антисмысловую цепь РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, может ингибировать экспрессию или уменьшать присутствие aberrантных белков с дипептидными повторами (DPR) (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и поли(PR)), которые продуцируются со всех рамок считывания смысловых или антисмысловых РНК *C9orf72*, содержащих повторы, посредством ассоциированной с повторами трансляции, зависимой от кодона, отличного от AUG (RAN), в клетках нервной системы субъектов, имеющих *C9orf72*-ассоциированное заболевание. Согласно некоторым вариантам реализации предложена комбинация как РНК-агента, нацеленного на смысловую цепь РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, так и РНК-агента, нацеленного на антисмысловую цепь РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор.

Описанные иРНК могут иметь одну или более нуклеотидных модификаций или комбинацию нуклеотидных модификаций, которые повышают активность, доставку и/или стабильность иРНК.

Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению ингибируют экспрессию гена *C9orf72* (например, зрелой мРНК) не более чем на примерно 50% и снижают уровень очагов, содержащих смысловую и антисмысловую РНК *C9orf72*, снижают уровень одного или более aberrантных белков с дипептидными повторами (DPR) (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и поли(PR)) и/или уменьшают экспрессию смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, более чем на примерно 50%. Не ограничиваясь теорией, полагают, что комбинация или подкомбинация указанных выше свойств и конкретных целевых сайтов или конкретные модификации в указанных иРНК обеспечивают иРНК согласно настоящему изобретению улучшенную эффективность, стабильность, активность, долговечность и безопасность.

Соответственно, согласно настоящему изобретению также предложены способы применения композиций РНКи согласно настоящему изобретению, включая композиции, содержащие один или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, для нокдауна или ингибирования экспрессии одной или более РНК *C9orf72* или для лечения субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от нокдауна или ингибирования экспрессии одной или более РНК *C9orf72*, например, *C9orf72*-ассоциированное заболевание, например, заболевание, ассоциированное с экспансированным гексануклеотидным повтором GGGGCC в интроне гена *C9orf72*, такое как *C9orf72*-ассоциированный боковой амиотрофический склероз, лобно-височная деменция или болезнь Хантингтона, например, синдром, подобный болезни Хантингтона, обусловленный экспансиями *C9orf72*, паркинсонизм,

оливопонтотомозжечковая дегенерация, кортикобазальный синдром или болезнь Альцгеймера.

Агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, длина которой составляет примерно 30 нуклеотидов или меньше, 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 нуклеотида в длину, причем указанная область по существу комплементарна по меньшей мере части целевого РНК-транскрипта гена *C9orf72*, например, интрону *C9orf72*. Согласно определенным вариантам реализации агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, длина которой составляет примерно 21-23 нуклеотида, причем указанная область по существу комплементарна по меньшей мере части целевого РНК-транскрипта гена *C9orf72*, например, интрону *C9orf72*.

Поскольку присутствие очагов, содержащих смысловую и антисмысловую цепи *C9orf72*, а также присутствие aberrantных белков с дипептидными повторами (DPR) (поли(GA), поли(GR), поли(GP), поли(PA) и поли(PR)), продуцируемых со всех рамок считывания либо смысловых, либо антисмысловых содержащих повторы РНК *C9orf72* посредством ассоциированной с повторами трансляции, зависимой от кодона, отличного от AUG (RAN), было идентифицировано в нескольких типах клеток в нервной системе субъектов, имеющих *C9orf72*-ассоциированное заболевание (Lagier-Tourenne, *et al.* (2013) *Proc Natl Acad Sci USA* doi/10.1073/pnas.1318835110; Jiang, *et al.* (2016)), в определенных аспектах настоящего изобретения агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, которая представляет собой примерно 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 нуклеотида в длину, причем указанная область по существу комплементарна по меньшей мере части целевого РНК-транскрипта гена *C9orf72*, например, интрону *C9orf72*. Согласно определенным вариантам реализации агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, которая имеет длину примерно 21-23 нуклеотида, причем указанная область по существу комплементарна по меньшей мере части целевого РНК-транскрипта гена *C9orf72*, например, интрону *C9orf72*.

Согласно определенным вариантам реализации агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), которая может иметь большую длину, например, до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотидов в длину с областью из по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов,

которая по существу комплементарна по меньшей мере части мРНК-транскрипта гена *C9orf72*. Указанные агенты РНКи с более длинными антисмысловыми цепями предпочтительно включают вторую цепь РНК (смысловую цепь) длиной 20-60 нуклеотидов, причем указанная смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 18-30 последовательных нуклеотидов.

Применение указанных агентов РНКи обеспечивает нацеленную деградацию целевых РНК гена *C9orf72* у млекопитающих. Таким образом, способы и композиции, включающие указанные агенты РНКи, можно применять для лечения субъекта, который может получить пользу от нокдауна целевой РНК *C9orf72*, снижения уровня нормального белка *C9orf72* и/или снижения уровня патогенных белков с дипептидными повторами, которые образуются в результате патогенной экспансии гексануклеотидных повторов, такого как, субъект, который имеет *C9orf72*-ассоциированное заболевание, такое как *C9orf72*-ассоциированный боковой амиотрофический склероз, лобно-височная деменция, болезнь Хантингтона, например, синдром, подобный болезни Хантингтона, обусловленный экспансиями *C9orf72*, паркинсонизм, оливопонтномозжечковая дегенерация, кортикобазальный синдром или болезнь Альцгеймера.

В следующем подробном описании раскрыты способы получения и применения композиций, содержащих агенты РНКи, для ингибирования экспрессии гена *C9orf72*, а также композиции и способы для лечения субъектов, имеющих заболевания и нарушения, которые могут получить пользу в результате ингибирования или снижения экспрессии генов.

I. Определения

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, сначала приведены определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что при указании значения или диапазона значений параметра, предполагается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также являются частью настоящего изобретения.

Неопределенные артикли (соотв., «а» и «an» в исходном тексте на английском языке) используются в настоящем документе для обозначения одного или более чем одного (то есть, по меньшей мере одного) грамматического объекта артикля. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента, например, множество элементов.

Термин «включая» используется в настоящем документе для обозначения выражения «включая без ограничения» и используется взаимозаменяемо с ним. Термин «или» используется в настоящем документе для обозначения термина «и/или» и используется взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает на иное.

Термин «примерно» используется в настоящем документе для обозначения нахождения в пределах типичных диапазонов допусков в данной области техники. Например, «примерно» можно понимать как примерно 2 стандартных отклонения от среднего значения. Согласно определенным вариантам реализации примерно означает

$\pm 10\%$. Согласно определенным вариантам реализации примерно означает $\pm 5\%$. Если «примерно» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «примерно» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Под термином «по меньшей мере» перед числом или рядом чисел понимается включение числа, смежного с термином «по меньшей мере», и всех последующих чисел или целых чисел, которые могут быть логически включены, как ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 18 нуклеотидов 21-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 18, 19, 20 или 21 нуклеотид имеет указанное свойство. Если «по меньшей мере» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «по меньшей мере» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В настоящем документе «не более чем» или «менее чем» понимается как значение, относящееся к выражению и логическим более низким значениям или целым числам, как логически следует из контекста, до нуля. Например, дуплекс с липким концом из «не более чем 2 нуклеотидов» имеет липкий конец из 2, 1 или 0 нуклеотидов. Если «не более чем» предшествует ряду чисел или диапазону, следует понимать, что «не более чем» может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В настоящем документе способы детектирования могут включать определение того, что количество присутствующего аналита находится ниже уровня детектирования способа.

В случае противоречия между указанным сайтом-мишенью и нуклеотидной последовательностью для смысловой или антисмысловой цепи указанная последовательность имеет приоритет.

В случае противоречия между химической структурой и химическим названием, химическая структура имеет приоритет.

Композиции или способы, «содержащие» или «включающие» один или более перечисленных элементов, могут включать другие элементы, не перечисленные конкретно. Например, композиция, которая «содержит» или «включает» белок, может содержать белок по отдельности или в комбинации с другими ингредиентами. Переходное выражение «состоящий по существу из» означает, что объем формулы изобретения следует толковать как охватывающий указанные элементы, перечисленные в формуле изобретения, и те, которые не оказывают существенного влияния на основную и новую характеристику (характеристики) заявленного изобретения. Таким образом, термин «состоящий по существу из» при использовании в формуле изобретения не предназначен для толкования как эквивалентный термину «содержащий».

Термин «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное впоследствии событие или обстоятельство может происходить или может не происходить, и что описание включает случаи, в которых событие или обстоятельство происходит, и случаи, в которых событие или обстоятельство не происходит.

Термин «ген *C9orf72*», также известный как «субъединица комплекса *C9orf72-SMCR8*», «фактор обмена гуаниновых нуклеотидов *C9orf72*», «открытая рамка считывания

72 хромосомы 9, «белок C9orf72», «DENNL72», «FTDALS1», «ALSFTD» и «FTDALS», относится к гену, кодирующему хорошо известный белок, вовлеченный в регуляцию эндосомального переноса, C9orf72. Было показано, что белок C9orf72 взаимодействует с белками Rab, которые участвуют в аутофагии и эндоцитарном транспорте. Экспансия повтора GGGGCC с примерно 2-22 копий до примерно 700-1600 копий в интронной последовательности между чередующимися 5'-экзонами в транскриптах из этого гена ассоциировано с C9orf72-ассоциированным боковым амиотрофическим склерозом, лобно-височной деменцией, болезнью Хантингтона, например, синдромом, подобным болезни Хантингтона, обусловленным экспансиями C9orf72, паркинсонизмом, оливопонтномозжечковой дегенерацией, кортикобазальным синдромом или болезнью Альцгеймера. Альтернативный сплайсинг приводит к образованию нескольких вариантов транскрипта, кодирующих разные изоформы.

Примерные нуклеотидные и аминокислотные последовательности C9orf72 можно найти, например, под номером доступа GenBank NM_001256054.2 (Homo sapiens C9orf72, SEQ ID NO:1, обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO:5; под номером доступа GenBank: XM_005581570.2 (Macaca fascicularis C9orf72, SEQ ID NO:2, обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO:6); под номером доступа GenBank NM_001081343.2 (Mus musculus C9orf72, SEQ ID NO:3, обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO:7); и под номером доступа GenBank: NM_001007702.1 (Rattus norvegicus C9orf72, SEQ ID NO:4, обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO:8).

Дополнительные нуклеотидные и аминокислотные последовательности человеческого C9orf72 можно найти, например, под номером доступа в GenBank NM_145005.6, вариант транскрипта 1 (SEQ ID NO:9, обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO:10); и NM_018325.5, вариант транскрипта 2 (SEQ ID NO:11, обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO:12).

Нуклеотидная последовательность геномной области хромосомы 9 человека, несущей ген *C9orf72*, может быть найдена, например, в сборке 38 Консорциума референсного генома человека (также называемой сборкой 38 генома человека или GRCh38), доступной в GenBank. Нуклеотидная последовательность геномной области хромосомы 9 человека, несущей ген *C9orf72*, также может быть найдена, например, под номером доступа GenBank NC_000009.12 (в SEQ ID NO:13 приведены нуклеотиды 27546546..27573866 сборки хромосомы 9, обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO:14). Нуклеотидную последовательность гена *C9orf72* человека можно найти, например, под номером доступа GenBank NG_031977.1 (SEQ ID NO:15, обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO:16).

В SEQ ID NO:13 приведены нуклеотиды 27546546..27573866 сборки хромосомы 9 (NC_000009.12). Следует понимать, что в тех случаях, когда приведен диапазон для целевой последовательности в SEQ ID NO:13, диапазон положений нуклеотидов соответствует положениям нуклеотидов сборки хромосомы 9, например, нуклеотиды 27573086-27573106

из SEQ ID NO: 13 относятся к положениям нуклеотидов в сборке хромосомы 9 человека, для которых в SEQ ID NO: 13 приведены нуклеотиды в положениях 27546546..27573866.

Дополнительные примеры последовательностей *C9orf72* можно найти в общедоступных базах данных, например, GenBank, OMIM и UniProt.

Дополнительная информация о *C9orf72* может быть найдена, например, на веб-сайте www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/203228. Термин *C9orf72* в контексте настоящего документа также относится к вариантам гена *C9orf72*, включая варианты, представленные в базе данных клинических вариантов, например, на веб-сайте www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=NM_001256054.2.

Полное содержание каждого из вышеуказанных номеров доступа в GenBank и номеров базы данных генов включено в настоящий документ посредством ссылки на дату подачи данной заявки.

В настоящем документе «целевая последовательность» относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы РНК, образованной во время транскрипции гена *C9orf72*, такой как молекула смысловой или антисмысловой РНК *C9orf72*, включая мРНК, которая представляет собой продукт процессинга РНК первичного транскрипционного продукта. Согласно одному варианту реализации целевая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для РНКи-направленного расщепления в этой части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена *C9orf72*, или вблизи нее. Согласно одному варианту реализации целевая последовательность находится в пределах кодирующей белок области гена *C9orf72*. Согласно другому варианту реализации целевая последовательность находится в пределах интрона, например, интрона между экзонами 1А и 1В, гена *C9orf72*. Согласно одному варианту реализации целевая последовательность представляет собой молекулу смысловой РНК *C9orf72*. Согласно другому варианту реализации целевая последовательность представляет собой молекулу антисмысловой РНК *C9orf72*. Согласно одному варианту реализации целевая последовательность содержит сайт начала транскрипции, например, сайт начала транскрипции для молекулы антисмысловой РНК *C9orf72*, например, примерно на 171 п. о. ниже 3'-конца ДНК, кодирующей экзон 1В, или приблизительно на 270 п. о. ниже экспансии гексануклеотидного повтора GGGGCC, например, нуклеотид 5607 из NG_031977 (SEQ ID NO: 15). Согласно некоторым вариантам реализации целевая последовательность содержит область между сайтом начала транскрипции и экзоном 1А, например, нуклеотиды 5001-5607, 5026-5607, 5127-5607 или 5130-5607 из NG_031977 (SEQ ID NO: 15). Экзоны 1А и 1В соответствуют положениям 5001-5158 и 5386-5436 из NG_031977. Согласно некоторым вариантам реализации целевая последовательность содержит область, начинающуюся с сайта начала транскрипции и простирающуюся через область экспансии гексануклеотидного повтора на по меньшей мере примерно 200 п. о., примерно 500 п. о., примерно 900 п. о., примерно 1200 п. о. или примерно 1500 п. о., или примерно 2000 п. о. в 5'-фланкирующую последовательность гена *C9orf72*. Следует понимать, что если

нуклеотидная последовательность целевой последовательности обеспечена, например, в виде кДНК или геномной последовательности, или обратнoкомплементарной последовательности кДНК или геномной последовательности, например, SEQ ID NO: 1-20, «Т» представляют собой «U» в соответствующей последовательности мРНК.

мРНК *C9orf72* (целевая РНК *C9orf72*) представляет собой РНК, транскрибированную из гена *C9orf72*, транскрибированную со смысловой цепи или антисмысловой цепи мРНК. РНК *C9orf72* включает зрелую мРНК *C9orf72*, предшественник РНК *C9orf72* или любые их части (например, сплайсированные интронные области или альтернативно сплайсированные РНК). Зрелая мРНК *C9orf72* представляет собой мРНК *C9orf72*, в которой интроны удалены (сплайсированы) и из которой транслируется белок *C9orf72*. Предшественник РНК *C9orf72* представляет собой РНК *C9orf72*, в которой по меньшей мере 1 интрон, в частности, первый интрон (интрон 1), не был удален.

Белок *C9orf72* включает любой белок, экспрессируемый из РНК *C9orf72*. Белок *C9orf72* включает белок, экспрессируемый из зрелой РНК *C9orf72*, а также белки с дипептидными повторами (например, поли(глицин-аланин), поли(глицин-пролин), поли(глицин-аргинин), поли(аланин-пролин) и поли(пролин-аргинин)), полученные в результате ассоциированной с повторами трансляции с кодона, отличного от AUG, из РНК *C9orf72*, содержащих гексануклеотидные повторы.

Целевая РНК *C9orf72* может включать РНК *C9orf72*, характеризующуюся экспансией гексануклеотидных повторов. Экспансия гексануклеотидных повторов включает, но не ограничивается этим, множество последовательных копий SEQ ID NO: 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с множеством последовательных копий SEQ ID NO: 1. Целевая РНК *C9orf72* включает, но не ограничивается этим, смысловые и антисмысловые РНК-транскрипты *C9orf72*, характеризующиеся экспансией гексануклеотидных повторов. Целевая РНК *C9orf72* может представлять собой, например, РНК с патогенной экспансией гексануклеотидных повторов (имеющую, например, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 35, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 200, по меньшей мере примерно 300, по меньшей мере примерно 400 или по меньшей мере примерно 500 копий гексануклеотидного повтора).

Целевая последовательность может иметь примерно 15-30 нуклеотидов в длину. Например, целевая последовательность может состоять из примерно 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. Согласно определенным вариантам реализации целевая последовательность имеет длину 19-23 нуклеотида, необязательно 21-23 нуклеотида.

Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

В настоящем документе термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описана последовательностью, описанной с применением стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из «G», «C», «A», «T» и «U» обычно обозначает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно, в контексте модифицированного или немодифицированного нуклеотида. Однако будет понятно, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» также может относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или суррогатному заменяющему фрагменту (см., например, Таблицу 1). Специалисту в данной области техники будет хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил могут быть заменены другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве его основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях дцРНК, охарактеризованных в настоящем изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначной пары оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, охарактеризованных в настоящем изобретении.

Термины «иРНК», «агент РНКи», «иРНК-агент», «агент РНК-интерференции», используемые в настоящем документе взаимозаменяемо, относятся к агенту, который содержит РНК, в соответствии с определением этого термина в настоящем документе, и который опосредует нацеленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). РНК-интерференция (РНКи) представляет собой процесс, который направляет специфичную в отношении последовательности деградацию мРНК. РНКи обеспечивает нокдаун (т. е. снижает количество) или модуляцию (т. е. ингибирует) экспрессии *C9orf72*, *C9orf72*-родственного транскрипта или *C9orf72*-родственного пептида (например, дипептидного повтора) в клетке, например, в клетке в организме субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению включает одноцепочечную РНКи, которая взаимодействует с последовательностью целевой РНК, например, последовательностью целевой мРНК *C9orf72* (последовательность смыслового или антисмыслового РНК-транскрипта), для направления расщепления целевой РНК. Не ограничиваясь теорией, полагают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, расщепляется эндонуклеазой типа III, известной

как Dicer, на двухцепочечные короткие интерферирующие РНК (киРНК), содержащие смысловую цепь и антисмысловую цепь (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, подобный рибонуклеазе-III фермент, процессирует эти дцРНК на короткие интерферирующие РНК из 19-23 пар оснований с характерными 3'-липкими концами из двух пар оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Затем эти киРНК встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или более геликаз разматывают дуплекс киРНК, что позволяет комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). После связывания с подходящей целевой мРНК одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, чтобы индуцировать сайленсинг (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к одноцепочечной РНК (оцРНК) (антисмысловая цепь дуплекса киРНК), образованной в клетке, которая способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т. е. гена *C9orf72*. Соответственно, термин «киРНК» также используется в настоящем документе для обозначения РНКи, как описано выше.

Согласно другому варианту реализации агент РНКи может представлять собой одноцепочечную РНК, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одноцепочечные агенты РНКи связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет целевую мРНК. Одноцепочечные киРНК обычно представляют собой 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Дизайн и тестирование одноцепочечных РНК описаны в патенте США № 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Любая из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе, может применяться в качестве одноцепочечной киРНК, описанной в настоящем документе, или как химически модифицированная с помощью способов, описанных в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

Согласно другому варианту реализации «агент РНКи» для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению представляет собой двухцепочечную РНК и в настоящем документе называется «двухцепочечным агентом РНКи», «двухцепочечной молекулой РНК (дцРНК)», «агентом на основе дцРНК» или «дцРНК». Термин «дцРНК» относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющему дуплексную структуру, содержащую две антипараллельные и по существу комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, называемые «смысловой» и «антисмысловой» ориентациями по отношению к целевой РНК, т. е. смысловой цепи гена *C9orf72* или антисмысловой цепи гена *C9orf72*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения двухцепочечная РНК (дцРНК) запускает деградацию целевой РНК, например, мРНК, посредством посттранскрипционного механизма сайленсинга генов, называемого в настоящем документе РНК-интерференцией или РНКи.

Агенты на основе дцРНК, описанные в настоящем документе, могут отличаться (т. е. не включать их) от антисмысловых олигонуклеотидов (ASO) или гэлмерных антисмысловых олигонуклеотидов (ASO).

Согласно некоторым вариантам реализации любую из раскрытых последовательностей антисмысловых олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, можно применять отдельно в качестве ASO, рибозима. ASO может содержать 16-20 последовательных нуклеотидов из любой из описанных последовательностей антисмысловых олигонуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации ASO нацелен на ту же область целевой РНК, что и любая из описанных дцРНК. ASO может отрицательно регулировать мишень путем индукции расщепления эндонуклеазой РНКазой Н целевой РНК, путем стерического затруднения рибосомной активности, путем ингибирования образования 5'-кэпа или путем альтернативного сплайсинга. ASO может представлять собой гэлмер или морфолино. «Гэлмер» представляет собой олигонуклеотид, содержащий внутреннюю область, имеющую множество нуклеозидов, которые поддерживают расщепление РНКазой Н, расположенную между внешними областями, содержащими один или более нуклеозидов, причем указанные нуклеозиды, составляющие внутреннюю область, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, составляющих внешние области. Внутренняя область может называться «гэпом», и внешние области могут называться «крыльями». Гэлмер может иметь 5'- и 3'-крылья, каждое из которых содержит 2-6 нуклеотидов, и гэл, содержащий 7-12 нуклеотидов. Гэлмер может иметь конфигурацию 3-10-3 или конфигурацию 5-10-5. Все нуклеотиды гэлмера могут иметь фосфотиоатные связи, необязательно с одним или более хиральными мезилфосфорамидат- или метилфосфонат-связанными нуклеотидами. Нуклеотиды крыла могут представлять собой, но не ограничиваются перечисленными, 2'-О-метоксиэтил(2'-МОЕ)-модифицированные нуклеотиды, LNA-модифицированные нуклеотиды, сЕТ-модифицированные нуклеотиды или их комбинации. Нуклеотиды гэпа могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды. Любые цитозиновые нуклеотиды в ASO могут представлять собой метилцитозины.

В целом, молекула дцРНК может включать рибонуклеотиды, но, как подробно описано в настоящем документе, каждая или обе цепи также могут включать один или более нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид, модифицированный нуклеотид. Кроме того, в данном описании «агент РНКи» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; агент РНКи может включать значительные модификации в нескольких нуклеотидах. В настоящем документе термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, имеющему независимо модифицированный сахарный фрагмент, модифицированную межнуклеотидную связь или модифицированное нуклеиновое основание. Таким образом, термин модифицированный нуклеотид охватывает замены, добавления или удаление, например, функциональной группы или атома, в межнуклеотидных связях, сахарных фрагментах или нуклеиновых основаниях. Модификации, подходящие для применения в агентах согласно настоящему изобретению,

включают все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных из уровня техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа киРНК, включены в термин «агент РНКи» для целей настоящего описания и формулы изобретения.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения включение дезоксирибонуклеотида, если он присутствует в агенте РНКи, можно считать представляющим собой модифицированный нуклеотид.

Дуплексная область может иметь любую длину, которая обеспечивает специфичную деградацию желаемой целевой РНК посредством пути RISC, и может быть в диапазоне примерно 15-36 пар оснований в длину, например, примерно 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований в длину, например, примерно 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 пары оснований в длину. Согласно определенным вариантам реализации дуплексная область имеет длину 19-21 пару оснований, например, 21 пару оснований. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут представлять собой различные части одной более крупной молекулы РНК, или они могут представлять собой отдельные молекулы РНК. Если две цепи являются частью одной более крупной молекулы и, следовательно, соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, то соединяющая цепь РНК называется «петлей шпильки». Петля шпильки может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может содержать по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренных нуклеотидов или нуклеотидов, не направленных на целевой сайт, дцРНК. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 10 или менее нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 8 или менее неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 4-10 неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля шпильки может представлять собой 4-8 нуклеотидов.

Если две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы не обязательно должны быть соединены, но могут быть ковалентно соединены. Согласно определенным вариантам реализации в том случае, если две цепи ковалентно соединены путем, отличным от непрерывной цепи нуклеотидов, между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, соединяющую структуру называют «линкером» (хотя следует отметить, что

некоторые другие структуры, определенные в другом месте в настоящем документе, также можно назвать «линкером»). Цепи РНК могут иметь одинаковое или различное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет собой число нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК за вычетом любых липких концов, которые присутствуют в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре РНКи может содержать один или более нуклеотидных липких концов. Согласно одному варианту реализации агента РНКи по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно другому варианту реализации по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации по меньшей мере одна цепь агента РНКи содержит 5'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида. Согласно определенным вариантам реализации по меньшей мере одна цепь содержит 5'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации как 3'-конец, так и 5'-конец одной цепи агента РНКи содержат липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой независимо содержит 19-23 нуклеотида, которые взаимодействуют с последовательностью целевой РНК, например, последовательностью целевой мРНК *C9orf72*, для направления расщепления целевой РНК.

Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению представляет собой дцРНК из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например, последовательностью целевой мРНК *C9orf72*, для направления расщепления целевой РНК.

В настоящем документе термин «нуклеотидный липкий конец» относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры агента РНКи, например, дцРНК. Например, если 3'-конец одной цепи дцРНК выходит за пределы 5'-конца другой цепи, или наоборот, существует нуклеотидный липкий конец. дцРНК может содержать липкий конец по меньшей мере из одного нуклеотида; в качестве альтернативы, липкий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный липкий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Липкий(ие) конец(концы) может(могут) находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) липкого конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно одному варианту реализации смысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые

являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно другому варианту реализации один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом.

Согласно определенным вариантам реализации антисмысловая цепь дцРНК содержит 1-10 нуклеотидов, например, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно одному варианту реализации смысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, которые являются липкими на 3'-конце или 5'-конце. Согласно другому варианту реализации один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом.

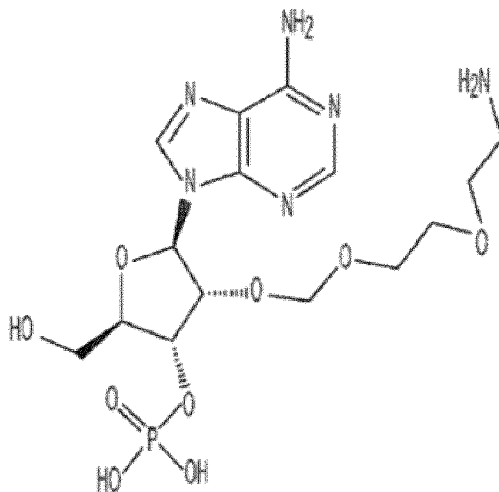
Согласно определенным вариантам реализации липкий конец на смысловой цепи или антисмысловой цепи может иметь большую длину, превышающую 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов в длину. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец находится на смысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец находится на антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации удлиненный липкий конец присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. Согласно определенным вариантам реализации один или более нуклеотидов в липком конце заменены нуклеозидтиофосфатом. Согласно определенным вариантам реализации липкий конец включает самокомплементарную часть таким образом, что липкий конец способен образовывать шпильчатую структуру, которая является стабильной в физиологических условиях.

Согласно определенным вариантам реализации по меньшей мере один конец по меньшей мере одной цепи простирается за пределы дуплексной нацеливающей области, включая структуры, в которых одна из цепей включает термодинамически стабилизирующую четырехпетлевую структуру (см., например, патенты США №№ 8513207 и 8927705, а также W02010033225, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки). Такие структуры могут включать одноцепочечные удлинения (с одной или с обеих сторон молекулы), а также двухцепочечные удлинения.

Согласно определенным вариантам реализации 3'-конец смысловой цепи и 5'-конец антисмысловой цепи соединены полинуклеотидной последовательностью, содержащей рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или и то, и другое, причем необязательно указанная полинуклеотидная последовательность содержит последовательность четырехчастной петли. Согласно определенным вариантам реализации смысловая цепь имеет длину 25-35 нуклеотидов.

Четырехчастная петля может содержать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и их комбинации. Как правило, четырехчастная петля имеет от 4 до 5 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации петля содержит последовательность, представленную как GAAA. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один из нуклеотидов петли (GAAA) содержит нуклеотидную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный нуклеотид содержит 2'-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 2'-модификация представляет собой модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-аминоэтил, 2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил, 2'-аминодиэтоксиметанол, 2'-адем и 2'-дезоксид-2'-фтор-d-арабинонуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации все нуклеотиды петли модифицированы. Согласно некоторым вариантам реализации G в последовательности GAAA содержит 2'-ОН. Согласно некоторым вариантам реализации каждый из нуклеотидов в последовательности GAAA содержит 2'-О-метильную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации каждый из A в последовательности GAAA содержит 2'-ОН, и G в последовательности GAAA содержит 2'-О-метильную модификацию. Согласно предпочтительным вариантам реализации, согласно некоторым вариантам реализации, каждый из A в последовательности GAAA содержит 2'-О-метоксиэтильную модификацию (МОЕ), и G в последовательности GAAA содержит 2'-О-метильную модификацию; или каждый из A в последовательности GAAA содержит модификацию 2'-адем, и G в последовательности GAAA содержит 2'-О-метильную модификацию. См., например, РСТ публикацию WO 2020/206350, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Примерный 2'-адем-модифицированный нуклеотид показан ниже:



Термины «тупой» или «с тупыми концами», используемые в настоящем документе в отношении дцРНК, означают отсутствие неспаренных нуклеотидов или аналогов нуклеотидов на указанном конце дцРНК, т. е. отсутствие нуклеотидного липкого конца. Один или оба конца дцРНК могут быть тупыми. Если оба конца дцРНК являются тупыми, то считается, что дцРНК имеет тупые концы. Для ясности, дцРНК с «тупыми концами» представляет собой дцРНК, которая является тупой на обоих концах, т. е. не имеет

нуклеотидного липкого конца на любом конце молекулы. Чаще всего такая молекула будет иметь двухцепочечную структуру по всей своей длине.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» агента РНКи относится к цепи агента РНКи, например, дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна целевой последовательности, например, мРНК *C9orf72*.

В настоящем документе термин «область комплементарности» относится к области на антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности *C9orf72*, определенной в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна целевой последовательности, несовпадения могут находиться во внутренних или концевых областях молекулы. Обычно наиболее переносимые несовпадения находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'-конца или 3'-конца агента РНКи. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает несовпадение нуклеотидов в антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений с целевой мРНК, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений с целевой мРНК. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений со смысловой цепью, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений со смысловой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает несовпадение нуклеотидов в смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь агента на основе двухцепочечной РНК согласно настоящему изобретению включает не более 4 несовпадений с антисмысловой цепью, например, смысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений с антисмысловой цепью. Согласно некоторым вариантам реализации несовпадение нуклеотидов находится, например, в пределах 5, 4, 3 нуклеотидов от 3'-конца иРНК. Согласно другому варианту реализации несовпадение нуклеотидов находится, например, в 3'-концевом нуклеотиде агента иРНК. Согласно некоторым вариантам реализации несовпадение(я) не присутствует(ют) в затравочной области.

Таким образом, агент РНКи, описанный в настоящем документе, может содержать одно или более несовпадений с целевой последовательностью. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 3 несовпадений (т. е. 3, 2, 1 или 0 несовпадений). Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 2 несовпадений. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит не более 1 несовпадения. Согласно одному варианту реализации агент РНКи, описанный в настоящем документе, содержит 0 несовпадений. Согласно определенным вариантам реализации, если антисмысловая цепь агента РНКи содержит несовпадения с целевой

последовательностью, несовпадение необязательно может быть ограничено нахождением в пределах последних 5 нуклеотидов либо 5'-конца, либо 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах реализации для 23-нуклеотидного агента РНКи цепь, которая комплементарна области гена *C9orf72*, обычно не содержит какого-либо несовпадения в пределах 13 центральных нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области техники, можно применять для определения того, является ли агент РНКи, содержащий несовпадение с целевой последовательностью, эффективным в ингибировании экспрессии гена *C9orf72*. Рассмотрение эффективности агентов РНКи с несовпадениями в ингибировании экспрессии гена *C9orf72* является важным, в частности, если известно, что конкретная область комплементарности в гене *C9orf72* имеет полиморфную вариацию последовательности в популяции. Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи содержит однонуклеотидное несоответствие с целевой последовательностью, причем указанное несоответствие возникает на 3'- или 5'-конце агента РНКи. Несответствие может находиться в антисмысловой цепи, смысловой цепи или как в смысловой цепи, так и антисмысловой цепи. В случае агента РНКи, имеющего 3'- или 5'-концевое несоответствие с целевой РНК как в смысловой цепи, так и в антисмысловой цепи, концевые нуклеотиды смысловой и антисмысловой цепи могут образовывать пару оснований. Таким образом, для любой из описанных антисмысловых или смысловых последовательностей, раскрытых в настоящем документе, 5'- или 3'-нуклеотид может быть заменен нуклеотидом, который образует несоответствие с целевой РНК.

В настоящем документе термин «по существу все нуклеотиды модифицированы» означает в значительной степени, но не полностью, модифицированы и могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Термин «смысловая цепь» или «пассажирская цепь» агента РНКи относится к цепи агента РНКи, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, в соответствии с определением этого термина в настоящем документе.

В настоящем документе термин «область расщепления» относится к области, которая расположена непосредственно рядом с сайтом расщепления. Сайт расщепления представляет собой сайт на мишени, в котором происходит расщепление. Согласно некоторым вариантам реализации область расщепления содержит три основания на любом конце сайта расщепления и непосредственно рядом с ним. Согласно некоторым вариантам реализации область расщепления содержит два основания на любом конце сайта расщепления и непосредственно рядом с ним. Согласно некоторым вариантам реализации сайт расщепления конкретно находится в сайте, связанном нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, и область расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

В настоящем документе, и если не указано иное, термин «комплементарный» при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности относится к способности 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 техники. Такие условия могут представлять собой, например, строгие условия, причем указанные строгие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ ЭДТА, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующим промыванием (см., например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Могут применяться другие условия, такие как физиологически уместные условия, которые могут встречаться внутри организма. Специалист в данной области техники сможет определить набор условий, наиболее подходящих для теста комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в пределах агента РНКи, например, в пределах дцРНК, описанной в настоящем документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. В настоящем документе такие последовательности могут называться «полностью комплементарными» по отношению друг к другу. Однако, если в настоящем документе первая последовательность называется «по существу комплементарной» по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или более, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований после гибридизации для дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии гена посредством пути RISC. Однако если два олигонуклеотида сконструированы, чтобы образовывать при гибридизации один или более одноцепочечных липких концов, такие липкие концы не должны рассматриваться как несовпадения в отношении определения комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину и другой олигонуклеотид из 23 нуклеотидов в длину, в которой более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все еще может называться «полностью комплементарной» для целей, описанных в настоящем документе.

«Комплементарные» последовательности в контексте настоящего документа также могут включать или могут быть полностью образованы из пар оснований, отличных от пар по Уотсону-Крику, или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, в той степени, в которой выполняются вышеуказанные требования в отношении их способности к гибридизации. Такие пары оснований, отличные

от пар по Уотсону-Крику, включают, но не ограничиваются этим, неоднозначное спаривание оснований G:U или спаривание по Хугстину.

Термины «комплементарный», «полностью комплементарный» и «по существу комплементарный» в настоящем документе можно применять в отношении совпадения оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК или между антисмысловой цепью агента РНКи и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их применения.

В настоящем документе полинуклеотид, который «по существу комплементарен по меньшей мере части» РНК-транскрипта, относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части представляющего интерес РНК-транскрипта (например, РНК *C9orf72*, либо смысловой цепи, либо антисмысловой цепи). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части РНК *C9orf72*, если последовательность по существу комплементарна непрерывной части РНК.

Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, являются полностью комплементарными целевой последовательности *C9orf72*. Согласно другим вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO:1-4, 9, 11, 13, 15, 17 и 19, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%.

Как описано выше, высокая экспансия гексануклеотидного повтора GGGGCC (G_4C_2) в первом интроне гена *C9orf72* между экзонами 1a и 1b, которое является патогенным, может быть транскрибирована в двух направлениях. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации в настоящем документе раскрыты антисмысловые полинуклеотиды, которые комплементарны любой цепи гена *C9orf72*. Согласно другим вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO:5-8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:13, выбранному из группы нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336;

27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; и 27573717-27573739 SEQ ID NO:13, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:1, такому как нуклеотиды 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; 62-84 или 69-91 SEQ ID NO:1, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%. Диапазоны, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:15, такому как нуклеотиды 5197-5219; 5223-5245; 5226-5248; 5227-5249; 5233-5255; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; и 6048-6070 SEQ ID NO:15, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%. Диапазоны, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:15, такому как нуклеотиды 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO:15, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%. Диапазоны, которые являются

промежуточными для указанных выше диапазонов, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:1, такому как нуклеотиды 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO:1, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%. Диапазоны, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны фрагменту целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 80% комплементарна по всей своей длине фрагменту SEQ ID NO:13, такому как нуклеотиды 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-27573740 SEQ ID NO:13, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98% или примерно 99%. Диапазоны, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Согласно другим вариантам реализации смысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 2, 3, 10А, 10С, 11 или 12, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 2, 3, 10А, 10С, 11 или 12, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

Согласно другим вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 5, 6, 10В или 10D,

или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 5, 6, 10В или 10D, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-1446213.1; AD-1446217.1; AD-1446222.1; AD-1446234.1; AD-1446243.1; AD-1446246.1; AD-1446252.1; AD-1446259.1; AD-1446265.1; AD-1446268.1; AD-1446271.1; AD-1446279.1; AD-1446289.1; и AD-1446294.1.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-1446213.1; AD-1446246.1; и AD-1446268.1.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-1446073.1; AD-1446075.1; AD-1285246.2; AD-1446084.1; AD-1446087.1; AD-1446090.1 и AD-1446095.1.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-1446087.1 и AD-1446090.1.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-1285238.1; и AD-1285234.1.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-1285231.1, AD-1285232.1, AD-1285233.1, AD-1285235.1, AD-1285237.1, AD-1285239.1, AD-1285240.1, AD-1285242.1, AD-1285244.1; AD-1285243.1; AD-1285241.1; AD-1285236.1; AD-1446111.1; AD-1446117.1; AD-1446147.1; AD-1446157.1; AD-1446168.1; AD-1446180.1; AD-1446189.1; AD-1446196.1; AD-1446202.1; AD-1446205.1.

Согласно определенным вариантам реализации смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-1285231.1, AD-1285232.1, AD-1285233.1, AD-1285234.1, AD-1285235.1, AD-1285236.1, AD-1285237.1, AD-1285239.1, AD-1285240.1, AD-1285241.1, AD-1285242.1 и AD-1285243.1.

Согласно другим вариантам реализации антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, по существу комплементарны целевой последовательности *C9orf72* и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на примерно 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 8 или 9, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи в любой из Таблиц 8 или 9, например, комплементарна на примерно 85%, примерно 90%, примерно 91%, примерно 92%, примерно 93%, примерно 94%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или 100%.

В настоящем документе выражение «ингибирование экспрессии *C9orf72*» включает ингибирование экспрессии зрелой мРНК *C9orf72*, нокдаун или ингибирование экспрессии или снижение уровня РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор в интроне, нокдаун или ингибирование экспрессии или снижение уровня антисмысловой цепи РНК

C9orf72, содержащей гексануклеотидный повтор. Нокдаун или ингибирование экспрессии, или снижение уровня РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, включает ингибирование продуцирования очагов, содержащих смысловую и антисмысловую цепи *C9orf72*, и/или ингибирование продуцирования aberrantных белков с дипептидными повторами (DPR) (например, пептидов поли(глицин-аланин) или поли(GA), пептидов поли(глицин-пролин) или поли(GP), пептидов поли(глицин-аргинин) или поли(GR), пептидов поли(аланин-пролин) или поли(PA), или пептидов поли(пролин-аргинин) или поли(PR)). Согласно некоторым вариантам реализации зависимое от длины повтора образование очагов РНК, секвестрация специфичных РНК-связывающих белков или накопление или агрегация пептидов поли(глицин-аланин), пептидов поли(глицин-пролин), пептидов поли(глицин-аргинин), пептидов поли(аланин-пролин) или пептидов поли(пролин-аргинин) ингибируется или уменьшается на более чем 50%, например, более чем 55%, более чем 60%, более чем 65%, более чем 70%, более чем 75%, более чем 80%, более чем 85%, более чем 90% или более чем 95%, и экспрессия зрелой РНК *C9orf72* ингибируется на менее чем 50%, например, менее чем 45%, менее чем 40%, менее чем 35%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10% или менее чем 5%.

Согласно одному варианту реализации по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена *C9orf72* оценивают по снижению количества РНК *C9orf72*, например, смыслового РНК-транскрипта, антисмыслового РНК-транскрипта, общих РНК-транскриптов *C9orf72*, смыслового РНК-транскрипта *C9orf72*, содержащей повторы, и/или антисмыслового РНК-транскрипта *C9orf72*, содержащей повторы, которые могут быть выделены из или детектированы в первой клетке или группе клеток, в которой транскрибируется ген *C9orf72* и которая была обработана таким образом, что экспрессия гена *C9orf72* ингибируется, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичной первой клетке или группе клеток, но которая не была обработана таким образом (контрольные клетки). Степень ингибирования может быть выражена в виде:

$$\frac{(\text{РНК в контрольных клетках}) - (\text{РНК в обработанных клетках})}{\text{РНК в контрольных клетках}} \times 100\%$$

Выражение «приведение клетки в контакт с агентом РНКи», таким как дцРНК, в контексте настоящего документа включает приведение клетки в контакт с помощью любых возможных средств. Приведение клетки в контакт с агентом РНКи включает приведение клетки в контакт *in vitro* с агентом РНКи или приведение клетки в контакт *in vivo* с агентом РНКи. Приведение в контакт может быть выполнено непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, агент РНКи можно привести в физический контакт с клеткой с помощью индивидуума, выполняющего способ, или, в качестве альтернативы, агент РНКи можно поместить в ситуацию, которая позволит или вынудит его впоследствии вступить в контакт с клеткой.

Контакт с клеткой *in vitro* можно осуществлять, например, путем инкубации клетки с агентом РНКи. Контакт с клеткой *in vivo* можно осуществлять, например, путем инъекции агента РНКи в ткань или вблизи нее, где расположена клетка, или путем инъекции агента РНКи в другую область, например, центральную нервную систему (ЦНС), необязательно посредством интратекальной, интравитреальной или другой инъекции, или путем инъекции в кровотоки или подкожное пространство, таким образом, что агент впоследствии достигнет ткани, где находится клетка, подлежащая приведению в контакт. Например, агент РНКи может содержать лиганд или может быть соединен с ним, например, липофильный фрагмент или фрагменты, описанные ниже и более подробно, например, в РСТ/US2019/031170, который включен в настоящий документ посредством ссылки, который направляет или иным образом стабилизирует агент РНКи в представляющем интересе сайте, например, в ЦНС. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно приводить в контакт *in vitro* с агентом РНКи и впоследствии трансплантировать субъекту.

Согласно одному варианту реализации приведение клетки в контакт с агентом РНКи включает «введение» или «доставку агента РНКи в клетку» путем облегчения или осуществления поглощения или всасывания в клетку. Всасывание или поглощение агента РНКи может происходить посредством пассивных диффузионных или активных клеточных процессов или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Введение агента РНКи в клетку можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* агент РНКи можно вводить путем инъекции в участок ткани или вводить системно. Введение *in vitro* в клетку включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в настоящем документе ниже или известны в данной области техники.

Термин «липофил» или «липофильный фрагмент» в широком смысле относится к любому соединению или химическому фрагменту, обладающему аффинностью в отношении липидов. Одним из путей характеристики липофильности липофильного фрагмента является коэффициент распределения октанол-вода, $\log K_{ow}$, где K_{ow} представляет собой отношение концентрации химического вещества в фазе октанола к его концентрации в водной фазе двухфазной системы при равновесии. Коэффициент распределения октанол-вода представляет собой измеренное в лаборатории свойство вещества. Однако его также можно прогнозировать с использованием коэффициентов, относимых к структурным компонентам химического вещества, которые рассчитывают с использованием основных принципов или эмпирических способов (см., например, Tetko *et al.*, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41:1407-21 (2001), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Он обеспечивает термодинамический показатель тенденции вещества к предпочтению неводной или масляной среды, а не воды (т. е. его гидрофильно-липофильный баланс). В принципе, химическое вещество является липофильным по характеру, если его $\log K_{ow}$ превышает 0. Как правило, липофильный фрагмент имеет $\log K_{ow}$, превышающий 1, превышающий 1,5, превышающий 2,

превышающий 3, превышающий 4, превышающий 5 или превышающий 10. Например, прогнозируется, что $\log K_{ow}$ 6-аминогексанола, например, будет составлять приблизительно 0,7. С применением этого же способа прогнозируется, что $\log K_{ow}$ холестерил-N-(гексан-6-ол)-карбамата составляет 10,7.

Липофильность молекулы может изменяться в зависимости от функциональной группы, которую она несет. Например, добавление гидроксильной группы или аминогруппы к концу липофильного фрагмента может увеличивать или уменьшать значение коэффициента распределения (например, $\log K_{ow}$) липофильного фрагмента.

В качестве альтернативы, гидрофобность двухцепочечного агента РНКи, конъюгированного с одним или более липофильными фрагментами, может быть измерена на основании его характеристик связывания с белками. Например, в определенных вариантах реализации несвязанную фракцию двухцепочечного агента РНКи в анализе связывания с белками плазмы крови можно определить как положительно коррелирующую с относительной гидрофобностью двухцепочечного агента РНКи, которая затем может положительно коррелировать с активностью сайленсинга двухцепочечного агента РНКи.

Согласно одному варианту реализации установленный анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с использованием белка сывороточного альбумина человека. Примерный протокол этого анализа связывания подробно проиллюстрирован, например, в РСТ/US2019/031170. Гидрофобность двухцепочечного агента РНКи, измеренная по фракции несвязанной киРНК в анализе связывания, превышает 0,15, превышает 0,2, превышает 0,25, превышает 0,3, превышает 0,35, превышает 0,4, превышает 0,45 или превышает 0,5 для улучшенной доставки киРНК *in vivo*.

Соответственно, конъюгирование липофильных фрагментов с внутренним положением(положениями) двухцепочечного агента РНКи обеспечивает оптимальную гидрофобность для улучшенной доставки киРНК *in vivo*. Согласно некоторым вариантам реализации липофильный фрагмент облегчает или улучшает доставку агента РНКи в нейрональную клетку или клетку в нейрональной ткани, или клетку в ткани центральной нервной системы.

Термин «липидная наночастица» или «LNP» представляет собой везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, агент РНКи или плазмиду, из которой транскрибируется агент РНКи. LNP описаны, например, в патентах США №№ 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В настоящем документе «субъект» представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (такого как человек, отличный от человека примат, например, обезьяна и шимпанзе), или отличное от примата животное (такое как крыса или мышь). Согласно предпочтительному варианту реализации субъект представляет собой человека, такого как человек, которого лечат или оценивают на наличие заболевания,

нарушения или состояния, при котором будет получена польза от снижения уровней целевой РНК *C9orf72*; человека, подверженного риску развития заболевания, нарушения или состояния, при котором будет получена польза от снижения уровней целевой РНК *C9orf72*; человека, имеющего заболевание, нарушение или состояние, при котором будет получена польза от снижения экспрессии *C9orf72*; или человека, у которого лечат заболевание, нарушение или состояние, при котором будет получена польза от снижения экспрессии *C9orf72*, как описано в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации субъект представляет собой женщину. Согласно другим вариантам реализации субъект представляет собой мужчину. Согласно одному варианту реализации субъект представляет собой взрослого субъекта. Согласно одному варианту реализации субъект представляет собой педиатрического субъекта. Согласно другому варианту реализации субъект представляет собой ювенильного субъекта, т. е. субъекта в возрасте менее 20 лет.

В настоящем документе термины «осуществлять лечение» или «лечение» относятся к благоприятному или желаемому результату, включая, но не ограничиваясь этим, облегчение или уменьшение одного или более признаков или симптомов, ассоциированных с экспрессией транскрипта *C9orf72* с экспансией гексануклеотидного повтора или его продукта с дипептидными повторами, например, *C9orf72*-ассоциированных заболеваний, таких как *C9orf72*-ассоциированное заболевание. «Лечение» также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

Термин «более низкий» в контексте уровня *C9orf72* у субъекта или маркера или симптома заболевания относится к статистически достоверному уменьшению такого уровня. Уменьшение может представлять собой, например, по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. Согласно определенным вариантам реализации уменьшение составляет по меньшей мере 20%. Согласно определенным вариантам реализации уменьшение составляет по меньшей мере 50% по маркеру заболевания, например, уровня содержащих смысловую или бессмысловую цепь очагов и/или уровня аберрантного белка с дипептидными повторами, например, уменьшение на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. Согласно некоторым вариантам реализации уменьшение уровня белка *C9orf72* и/или мРНК *C9orf72* составляет не более 50%, например, не более 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. «Более низкий» в контексте уровня *C9orf72* у субъекта предпочтительно находится ниже уровня, который принят как находящийся в пределах нормального диапазона для индивидуума без такого нарушения. Согласно определенным вариантам реализации «более низкий» представляет собой уменьшение различия между уровнем маркера или симптома у субъекта, страдающего заболеванием, и уровнем, который принят как находящийся в пределах нормального диапазона для индивидуума, например, уровень уменьшения веса тела между индивидуумом с ожирением и индивидуумом, имеющим вес, принятый как находящийся в пределах нормального диапазона.

В настоящем документе «предотвращение» или «предотвращать» при использовании в отношении заболевания, нарушения или состояния, при которых может быть получена польза от снижения экспрессии транскрипта *C9orf72*, характеризующегося экспансией гексануклеотидных повторов, или его дипептидного продукта, относится к снижению вероятности развития у субъекта симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием, например, симптома *C9orf72*-ассоциированного заболевания. Невозможность развития заболевания, нарушения или состояния или снижение вероятности развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, нарушением или состоянием (например, по меньшей мере примерно на 10% по клинически приемлемой шкале для этого заболевания или нарушения), или появление отсроченных симптомов (например, на дни, недели, месяцы или годы) считается эффективным предотвращением.

В настоящем документе термин «*C9orf72*-ассоциированное заболевание» или «*C9orf72*-ассоциированное нарушение» включает любое заболевание или нарушение, при котором может быть получена польза от снижения экспрессии и/или активности транскрипта *C9orf72*, характеризующегося экспансией гексануклеотидных повторов. Примерные *C9orf72*-ассоциированные заболевания включают заболевания, при которых субъекты несут экспансию гексануклеотидного повтора (GGGCC) в интроне между экзонами 1a и 1b в гене *C9orf72*, например, боковой амиотрофический склероз, лобно-височную деменцию, болезнь Хантингтона, например, синдром, подобный болезни Хантингтона, обусловленный экспансиями *C9orf72*, паркинсонизм, оливопонтномозжечковую дегенерацию, кортикобазальный синдром или болезнь Альцгеймера.

Нормальные повторы G4C2 представляют собой ~25 звеньев или меньше, и патологические аллели с высокой пенетрантностью, как правило, представляют собой более ~60 звеньев повторов в диапазоне до более чем 4000 звеньев; редко число повторов от 47 до 60 сегрегируется с заболеванием в семьях. Анализ методом ПЦР с праймерами против повторов, как правило, применяют для детектирования меньших экспансий (<80), но точное определение размеров больших повторов требует других методик (например, гибридизации с помощью Саузерн-блоттинга), которые обеспечивают оценку длины.

У субъектов, имеющих экспансию гексануклеотида GGGGCC (или G4C2) в интроне гена *C9orf72*, может наблюдаться боковой амиотрофический склероз (ALS) или лобно-височная деменция (FTD) даже в одной и той же семье, и поэтому нейродегенерация, ассоциированная с этой экспансией, называется в настоящем документе «*C9orf72*-ассоциированный боковой амиотрофический склероз/лобно-височная деменция» или «*C9orf72* ALS/FTD». Это аутосомно-доминантное заболевание и наиболее распространенная форма семейного ALS, на которую приходится примерно треть семей с ALS и 5-10% спорадических клинических случаев ALS. Это также распространенная причина FTD, на которую приходится примерно одна четвертая случаев семейной FTD. Возраст появления симптомов находится в диапазоне от 30 до 70 лет со средним началом в

конце пятого десятилетия. C9orf72-опосредованный ALS наиболее часто напоминает типичный ALS, может иметь бульбарное начало или может начинаться в конечностях, может быстро прогрессировать (хотя и не всегда) и может быть ассоциирован с более поздними когнитивными симптомами. Таким образом, C9orf72-опосредованный ALS оценивают и лечат так же, как и у любого пациента с ALS. Профиль C9orf72-опосредованной FTD чаще всего представляет собой поведенческий вариант FTD с полным спектром поведенческих и когнитивных симптомов, включая расторможение, апатию и нарушение высших психических функций. Менее часто C9orf72-опосредованная FTD представляет собой семантический вариант первичной прогрессирующей афазии (PPA) или вариант небеглой PPA и очень редко может напоминать кортикобазальный синдром, прогрессирующий надъядерный паралич или HD-подобный синдром. Иногда паркинсонические признаки наблюдают при C9orf72-опосредованном ALS или FTD.

У субъектов могут наблюдать лобно-височную долевую дегенерацию (FTLD), характеризующуюся прогрессирующими изменениями поведения, высших психических функций и/или нарушениями речи. Из трех клинических синдромов FTLD наиболее часто, но не исключительно, наблюдают поведенческий вариант FTD (bvFTD). Он характеризуется прогрессирующим нарушением поведения и ухудшением высших психических функций с преобладающей атрофией лобной доли на МРТ головного мозга. Также может наблюдаться заболевание двигательных нейронов, включая дисфункцию верхних или нижних двигательных нейронов (или обоих типов), которое может соответствовать или не соответствовать критериям полного фенотипа ALS. Некоторая степень паркинсонизма, которая наблюдается у многих индивидуумов с C9orf72-ассоциированной bvFTD, как правило, относится к акинетико-ригидному типу без тремора и не отвечает на леводопу.

Синдромы, подобные болезни Хантингтона (HD-подобные синдромы или синдромы HDL), представляют собой семейство наследственных нейродегенеративных заболеваний, которые очень напоминают болезнь Хантингтона (HD), в том смысле, что они обычно вызывают комбинацию хореи, ухудшения когнитивных функций или деменции, а также поведенческих или психических расстройств.

Субъекты, имеющие синдром, подобный болезни Хантингтона, обусловленный экспансиями C9orf72, характеризуются наличием двигательных нарушений, включая дистонию, хорею, миоклонус, тремор и ригидность. Ассоциированные признаки также включают когнитивные нарушения и нарушение памяти, ранние психические нарушения и поведенческие расстройства. Средний возраст начала составляет примерно 43 года (диапазон 8-60). Распространенными являются ранние психические и поведенческие расстройства (включая депрессию, апатию, obsессивное поведение и психоз). Когнитивные симптомы проявляются как нарушение высших психических функций. Выражены двигательные нарушения: Также могут наблюдаться паркинсонические признаки и пирамидальные признаки. «Терапевтически эффективное количество» в контексте настоящего документа подразумевает включение количества агента РНКи, которое при

введении субъекту, имеющему C9orf72-ассоциированное заболевание, является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, путем ослабления, облегчения или поддержания существующего заболевания или одного или более симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента РНКи, способа введения агента, заболевания и его тяжести, а также анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетического фона, типов предшествующих или сопутствующих видов лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик субъекта, подлежащего лечению.

«Профилактически эффективное количество» в контексте настоящего документа подразумевает включение количества агента РНКи, которое при введении субъекту, имеющему C9orf72-ассоциированное нарушение, является достаточным для предотвращения или облегчения заболевания или одного или более симптомов заболевания. Облегчение заболевания включает замедление течения заболевания или снижение тяжести заболевания с более поздним началом. «Профилактически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от агента РНКи, способа введения агента, степени риска развития заболевания и анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетического фона, типов предшествующих или сопутствующих видов лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик пациента, подлежащего лечению.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество агента РНКи, которое обеспечивает некоторый желаемый локальный или системный эффект при разумном соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. Агент РНКи, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для получения разумного соотношения польза/риск, применимого к такому лечению.

Выражение «фармацевтически приемлемый» применяется в настоящем документе для обозначения тех соединений, материалов (включая соли), композиций или лекарственных форм, которые, в рамках обоснованного медицинского суждения, подходят для применения в контакте с тканями субъектов-людей и субъектов-животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно разумному соотношению польза/риск.

Выражение «фармацевтически приемлемый носитель» в контексте настоящего документа означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, производственное вспомогательное вещество (например, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновую кислоту) или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и не должен быть вредным для субъекта, которого лечат. Некоторые примеры

материалов, 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 карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошковый трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие агенты, такие как, стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и суппозиторные воски; (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 агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) воду, не содержащую пирогенов; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH-буферные растворы; (21) полиэфиры, поликарбонаты или полиангидриды; (22) объемобразующие агенты, такие как полипептиды и аминокислоты, (23) компонент сыворотки, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Термин «образец» в контексте настоящего документа включает набор сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, глазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут быть получены из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. Согласно определенным вариантам реализации образцы могут быть получены из головного мозга (например, всего головного мозга или определенных сегментов головного мозга, например, стриатума или определенных типов клеток в головном мозге, таких как, например, нейроны и глиальные клетки (астроциты, олигодендроциты, микроглиальные клетки)). Согласно некоторым вариантам реализации «образец, полученный от субъекта» относится к крови, взятой у субъекта, или плазме или сыворотке крови, полученной из нее. Согласно дополнительным вариантам реализации «образец, полученный от субъекта» относится к ткани головного мозга (или ее подкомпонентам) или ткани сетчатки (или ее подкомпонентам), полученной от субъекта.

II. Агенты РНКи согласно настоящему изобретению

Как описано в другом месте настоящего документа, мутации в *C9orf72* связаны с семейной лобно-височной деменцией (FTD) и боковым амиотрофическим склерозом (ALS). Мутации являются результатом экспансии гексануклеотидных повторов G4C2 (SEQ ID NO: 1), расположенных в интроне между экзоном 1A и экзоном 1B гена *C9orf72*. Гексануклеотидные повторы могут быть транслированы посредством механизма, инициируемого кодоном, отличным от AUG. Накопление РНК, характеризующейся

экспансией повторов (целевой РНК, РНК-мишени), или трансляция последовательностей повторов может вызывать или способствовать развитию FTD и/или ALS или симптомов заболевания, ассоциированных с FTD и/или ALS.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены агенты на основе дцРНК, которые селективно и эффективно уменьшают экспрессию связанных с *C9orf72* продуктов экспрессии, РНК и/или транслированных полипептидов, ассоциированных с экспансиями гексануклеотидных повторов. Согласно некоторым вариантам реализации агенты на основе дцРНК нацелены (например, селективно нацелены) на РНК, содержащую гексануклеотидные повторы (целевую РНК), и обеспечивают нокдаун целевой РНК и полипептидов, экспрессируемых из РНК, содержащей гексануклеотидные повторы. Агенты на основе дцРНК можно применять в способах терапевтического лечения и/или предотвращения признаков или симптомов, ассоциированных с FTD и/или ALS, включая, но не ограничиваясь перечисленными, зависимое от длины повтора образование очагов РНК, секвестрацию специфичных РНК-связывающих белков, и накопление и агрегацию белков с дипептидными повторами (например, поли(глицин-аланин), поли(глицин-пролин), поли(глицин-аргинин), поли(аланин-пролин) и поли(пролин-аргинин)), полученных в результате ассоциированной с повторами трансляции с кодона, отличного от AUG (AUG), в нейронах. Агенты на основе дцРНК можно применять в способах терапевтического лечения и/или предотвращения признаков или симптомов, ассоциированных с FTD и/или ALS, включая, но не ограничиваясь перечисленными, признаки и симптомы заболевания двигательных нейронов и признаки и симптомы деменции. Признаки и симптомы заболевания двигательных нейронов могут включать, например, спотыкание, падение предметов, патологическую усталость рук и/или ног, невнятную речь, мышечные судороги и подергивания, неконтролируемые периоды смеха или плача, а также затрудненное дыхание. Признаки и симптомы деменции могут включать, например, поведенческие изменения, изменения личности, проблемы с речью и языком и проблемы, связанные с движением. Такие способы включают введение одного или более агентов на основе дцРНК, описанных в настоящем документе, субъекту (например, субъекту-человеку или субъекту-животному).

Агенты на основе дцРНК, описанные в настоящем документе, могут останавливать или снижать накопление РНК *C9orf72*, содержащей повторы (например, проанализированной как очаги РНК), что предотвращает синтез белков с дипептидными повторами посредством RAN-трансляции.

Согласно некоторым вариантам реализации агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению нацелены на зрелые мРНК *C9orf72* (т. е. мРНК, в которых интроны были сплайсированы). Согласно другим вариантам реализации агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению нацелены на РНК *C9orf72*, содержащие интрон, такой как интрон 1А (т. е. смысловые или бессмысловые РНК, в которых интроны не сплайсированы, области РНК, сплайсированные из мРНК-предшественника, или альтернативно сплайсированные РНК).

дцРНК включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет применяться дцРНК. Согласно некоторым вариантам реализации одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна и обычно полностью комплементарна целевой последовательности. Целевая последовательность может быть получена из последовательности РНК, образованной во время экспрессии гена *C9orf72*. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, которая комплементарна антисмысловой цепи так, что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Согласно некоторым вариантам реализации одна цепь дцРНК (смысловая цепь) содержит область комплементарности, которая по существу комплементарна и обычно полностью комплементарна целевой последовательности, полученной из антисмысловой последовательности РНК, образованной во время экспрессии гена *C9orf72*. Другая цепь (антисмысловая цепь) содержит область, которая комплементарна смысловой цепи так, что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано в другом месте настоящего документа и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности дцРНК также могут содержаться в качестве самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, в отличие от нахождения на отдельных олигонуклеотидах.

Обычно дуплексная структура имеет длину 15-30 пар оснований, например, 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 пары оснований. Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации дуплексная структура имеет длину 18-25 пар оснований, например, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 или 24-25 пар оснований в длину, например, 19-21 пару оснований. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Сходным образом, область комплементарности целевой последовательности имеет длину 15-30 нуклеотидов, например, 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 нуклеотида, например, 19-23 нуклеотида или 21-23 нуклеотида. Диапазоны и длины, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов и длин, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Согласно некоторым вариантам реализации дуплексная структура имеет длину от 19 до 30 пар оснований. Сходным образом, область комплементарности целевой последовательности имеет длину от 19 до 30 нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации дцРНК имеет длину от 15 до 23, от 19 до 23 нуклеотидов или от 25 до 30 нуклеотидов. Обычно дцРНК является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, из уровня техники хорошо известно, что дцРНК длиннее примерно 21-23 нуклеотида могут служить в качестве субстратов Dicer. Обычный специалист в данной области техники также поймет, что область РНК, которая является мишенью для расщепления, чаще всего будет являться частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях «часть» целевой мРНК представляет собой непрерывную последовательность целевой мРНК, имеющую достаточную длину, чтобы она могла быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т. е. расщепления посредством пути RISC).

Специалист в данной области техники также поймет, что дуплексная область представляет собой основную функциональную часть дцРНК, например, дуплексная область из примерно 15-36 пар оснований, например, 15-36, 15-35, 15-34, 15-33, 15-32, 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, например, 19-21 пары оснований. Таким образом, согласно одному варианту реализации, в той степени, в которой она(он) подвергается процессингу в функциональный дуплекс, например, из 15-30 пар оснований, который нацелен на желаемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексную область более 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, обычный специалист в данной области техники поймет, что согласно одному варианту реализации миРНК представляет собой дцРНК. Согласно другому варианту реализации дцРНК не представляет собой встречающуюся в природе миРНК. Согласно другому варианту реализации агент РНКи, который можно применять для нацеливания на экспрессию *C9orf72*, не образуется в целевой клетке путем расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, описанная в настоящем документе, может дополнительно включать один или более одноцепочечных нуклеотидных липких концов, например, 1, 2, 3 или 4 нуклеотида. Нуклеотидный липкий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Липкий(ие) конец(концы) может(могут) находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) липкого конца может(могут) присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

дцРНК может быть синтезирована с помощью стандартных способов, известных в данной области техники. Двухцепочечные соединения РНКи согласно настоящему

изобретению можно получить с использованием двухэтапной процедуры. Сначала отдельные цепи двухцепочечной молекулы РНК получают по отдельности. Затем цепи-компоненты ренатурируют. Отдельные цепи соединения киРНК могут быть получены с использованием органического синтеза в жидкой фазе или в твердой фазе или и того, и другого. Преимуществом органического синтеза является легкое получение олигонуклеотидных цепей, содержащих неприродные или модифицированные нуклеотиды. Сходным образом, одноцепочечные олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть получены с использованием органического синтеза в жидкой фазе или в твердой фазе или и того, и другого.

Независимо от способа синтеза, препарат киРНК может быть приготовлен в растворе (например, водном или органическом растворе), который подходит для состава. Например, препарат киРНК может быть осажден и повторно растворен в чистой бидистиллированной воде и лиофилизирован. Высушенную киРНК затем можно ресуспендировать в растворе, подходящем для предполагаемого процесса изготовления.

Согласно определенным вариантам реализации агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению нацелены на целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор, содержащий множество последовательных копий, например, целевую РНК *C9orf72* с патогенной экспансией гексануклеотидных повторов (имеющую, например, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 35, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 200, по меньшей мере примерно 300, по меньшей мере примерно 400 или по меньшей мере примерно 500 копий гексануклеотидного повтора).

Согласно одному аспекту дцРНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Последовательность смысловой цепи для *C9orf72* может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10А, 10В, 10С, 10D, 11 и 12, и соответствующая нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи для смысловой цепи может быть выбрана из группы последовательностей в любой из Таблиц 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10А, 10В, 10С, 10D, 11 и 12. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности РНК, образованной при экспрессии локуса гена *C9orf72*. Таким образом, в данном аспекте дцРНК будет включать два олигонуклеотида, причем один олигонуклеотид описан в качестве смысловой цепи (пассажирской цепи) в любой из Таблиц 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10А, 10В, 10С, 10D, 11 и 12, и второй олигонуклеотид описан в качестве соответствующей антисмысловой цепи (направляющей цепи) для смысловой цепи в любой из Таблиц 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10А, 10В, 10С, 10D, 11 и 12.

Согласно одному варианту реализации по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в отдельных олигонуклеотидах. Согласно другому

варианту реализации по существу комплементарные последовательности дцРНК содержатся в одном олигонуклеотиде.

Следует понимать, что, хотя последовательности в Таблицах 2 и 5 описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК агента РНКи согласно настоящему изобретению, например, дцРНК согласно настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, изложенных в любой из Таблиц 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10А, 10В, 10С, 10D, 11 и 12, которая является немодифицированной, неконъюгированной или модифицированной или конъюгированной отличным образом от последовательностей, описанных в таблицах.

Специалисту в данной области техники будет хорошо известно, что дцРНК, имеющие дуплексную структуру из примерно 20-23 пар оснований, например, 21 пару оснований, были хорошо приняты как особенно эффективные в индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, (2001) *EMBO J.*, 20:6877-6888). Однако другие обнаружили, 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 реализации, описанных выше, в силу природы олигонуклеотидных последовательностей, предложенных в настоящем документе, дцРНК, описанные в настоящем документе, могут включать по меньшей мере одну цепь длиной минимум 21 нуклеотид. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, за исключением только нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут обладать подобной эффективностью в сравнении с дцРНК, описанными выше. Следовательно, предусмотрено, что дцРНК, имеющие последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более последовательных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей согласно настоящему изобретению, и отличающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена *C9orf72* не более чем на 10, 15, 20, 25 или 30% от ингибирования дцРНК, содержащей полную последовательность, по данным анализа *in vitro*, например, с использованием клеток Ве(2)с и РНК-агента в концентрации 10 нМ, и анализа методом ПЦР, как представлено в примерах в настоящем документе, включены в объем настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, описанные в настоящем документе, идентифицируют сайт(ы) в транскрипте *C9orf72*, который(ые) является(являются) восприимчивым(и) к RISC-опосредуемому расщеплению. Таким образом, согласно настоящему изобретению дополнительно охарактеризованы агенты РНКи, которые нацелены в пределах этого сайта(сайтов). В настоящем документе считается, что агент РНКи нацелен в пределах конкретного сайта РНК-транскрипта, если агент РНКи способствует расщеплению транскрипта в любом месте в пределах данного конкретного сайта. Такой агент РНКи обычно будет включать по меньшей мере примерно 15 последовательных нуклеотидов, предпочтительно по меньшей мере 19 нуклеотидов, из одной из последовательностей согласно настоящему изобретению, связанных с дополнительными нуклеотидными

последовательностями, взятыми из области, смежной с выбранной последовательностью в гене *C9orf72*.

Агенты на основе дцРНК, раскрытые в настоящем документе, ингибируют экспрессию целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор. Ингибирование экспрессии включает любой уровень ингибирования (например, частичное ингибирование экспрессии). Например, агенты на основе дцРНК могут ингибировать экспрессию целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, на по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80% или по меньшей мере примерно 90% (или до точки, в которой целевая РНК *C9orf72* не детектируется). Например, эти уровни ингибирования могут иметь место в течение 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор. Уменьшение может происходить, например, относительно клетки до обработки агентом на основе дцРНК или относительно контрольной клетки, которую не обрабатывали агентом на основе дцРНК.

Агенты на основе дцРНК, раскрытые в настоящем документе, также могут, например, селективно снижать уровень или ингибировать экспрессию целевой РНК *C9orf72*, содержащей интронный гексануклеотидный повтор, по сравнению с экспрессией зрелой матричной РНК *C9orf72*. Зрелая матричная РНК *C9orf72* в этом контексте представляет собой РНК-транскрипт *C9orf72*, который был сплайсирован и процессирован. Зрелая матричная РНК *C9orf72* состоит исключительно из экзонов и все интроны удалены. Агент на основе дцРНК может селективно ингибировать экспрессию целевой РНК *C9orf72*, содержащей интронный гексануклеотидный повтор, по сравнению с экспрессией зрелой матричной РНК *C9orf72*, если относительное уменьшение экспрессии целевой РНК *C9orf72* больше, чем относительное уменьшение экспрессии зрелой матричной РНК *C9orf72* после введения агента на основе дцРНК в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*. Например, агенты на основе дцРНК могут ингибировать экспрессию зрелой матричной РНК *C9orf72* на менее чем примерно 50%, менее чем примерно 40%, менее чем примерно 30%, менее чем примерно 20%, менее чем примерно 10% или менее чем примерно 5% (или, например, не оказывают какого-либо статистически значимого или функционально значимого эффекта на экспрессию). Например, эти уровни ингибирования могут иметь место в течение 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую зрелую матричную РНК *C9orf72*.

Агенты на основе дцРНК, раскрытые в настоящем документе, также могут, например, снижать синтез белка с дипептидными повторами или уровни белка с дипептидными повторами в клетке (например, в течение 24-48 часов после введения в клетку). Например, агент на основе дцРНК может снижать синтез белка с дипептидными повторами или уровни белка с дипептидными повторами на по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере

примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80% или по меньшей мере примерно 90%. Уменьшение может происходить, например, относительно клетки до обработки агентом на основе дцРНК или относительно контрольной клетки, которую не обрабатывали агентом на основе дцРНК.

В соответствии с определенными аспектами настоящего изобретения агент иРНК может быть разработан для нацеливания на область «горячей точки» любой из целевых РНК, описанных в настоящем документе, включая любые идентифицированные части целевой РНК (например, конкретный экзон). В настоящем документе область «горячей точки» может относиться к приблизительно 19-200, 19-150, 19-100, 19-75, 19-50, 21-200, 21-150, 21-100, 21-75, 21-50, 50-200, 50-150, 50-100, 50-75, 75-200, 75-150, 75-100, 100-200 или 100-150 нуклеотидной области последовательности целевой РНК, для которой нацеливание с применением агентов РНКи обеспечивает заметно более высокую вероятность эффективного сайленсинга по сравнению с нацеливанием на другие области той же целевой РНК. В соответствии с определенными аспектами настоящего изобретения область «горячей точки» может содержать ограниченную область целевой РНК и, в некоторых случаях, по существу ограниченную область целевой РНК, включая, например, менее половины длины целевой РНК, например, примерно 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% длины целевой РНК. И наоборот, другие области, с которыми сравнивается «горячая точка», могут суммарно составлять по меньшей мере большую часть длины целевой РНК. Например, другие области могут суммарно составлять по меньшей мере примерно 60%, или по меньшей мере примерно 70%, или по меньшей мере примерно 80%, или по меньшей мере примерно 90%, или по меньшей мере примерно 95% длины целевой РНК.

Сравниваемые области целевой РНК можно оценить эмпирически на предмет выявления «горячих точек», используя данные об эффективности, полученные в результате скрининговых анализов *in vitro* или *in vivo*. Например, агенты РНКи, нацеленные на различные области, которые охватывают целевую РНК, можно сравнивать по частоте эффективных агентов иРНК (например, по величине, на которую ингибируется экспрессия целевого гена, измеренной по экспрессии мРНК или экспрессии белка), которые связывают каждую область. В целом, «горячая точка» может быть установлена путем наблюдения кластеризации нескольких эффективных агентов РНКи, которые связываются с ограниченной областью целевой РНК. «Горячая точка» может быть в достаточной степени охарактеризована как таковая путем наблюдения эффективности агентов иРНК, которые в совокупности охватывают по меньшей мере примерно 60% целевой области, идентифицированной как «горячая точка», например, примерно 70%, примерно 80%, примерно 90% или примерно 95% или более длины области, включая оба конца области (т. е. по меньшей мере примерно 60%, 70%, 80%, 90% или 95% или более нуклеотидов в пределах области, включая нуклеотиды на каждом конце области, были мишенями агента иРНК). В соответствии с некоторыми аспектами настоящего изобретения агент иРНК, который демонстрирует по меньшей мере примерно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%,

85%, 90% или 95% ингибирование в пределах области (например, не более примерно 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% оставшейся мРНК), может быть идентифицирован как эффективный.

Возможность нацеливания на области РНК также можно оценить с помощью количественного сравнения измерений ингибирования в различных областях определенного размера (например, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 нуклеотидов). Например, средний уровень ингибирования может быть определен для каждой области, и могут быть сравнены средние значения для каждой области. Средний уровень ингибирования в пределах области «горячей точки» может быть существенно выше, чем усреднение по средним значениям для всех оцененных областей. Согласно некоторым аспектам средний уровень ингибирования в области «горячей точки» может быть по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% выше усреднения по средним значениям. Согласно некоторым аспектам средний уровень ингибирования в области «горячей точки» может быть по меньшей мере примерно на 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0 стандартных отклонения выше усреднения по средним значениям. Средний уровень ингибирования может быть выше на статистически значимую (например, $p < 0,05$) величину. В соответствии с некоторыми аспектами каждое измерение ингибирования в пределах области «горячей точки» может быть выше порогового количества (например, на уровне или ниже порогового количества оставшейся мРНК). В соответствии с некоторыми аспектами каждое измерение ингибирования в пределах области может быть по существу выше среднего значения для всех измерений ингибирования по всем измеренным областям. Например, каждое измерение ингибирования в области «горячей точки» может быть по меньшей мере примерно на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% выше среднего значения для всех измерений ингибирования. В соответствии с некоторыми аспектами каждое измерение ингибирования может быть по меньшей мере примерно на 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0 стандартных отклонения выше среднего для всех измерений ингибирования. Каждое измерение ингибирования может быть выше на статистически значимую (например, $p < 0,05$) величину по сравнению со средним значением для всех измерений ингибирования. Стандарт для оценки «горячей точки» может содержать различные комбинации вышеуказанных стандартов, если они совместимы (например, средний уровень ингибирования составляет по меньшей мере примерно первую величину и отсутствие измерений ингибирования ниже порогового уровня второй величины, меньшей, чем первая величина).

Поэтому явным образом предусмотрено, что любой агент иРНК, включая конкретные примерные агенты иРНК, описанные в настоящем документе, который нацелен на область «горячей точки» целевой РНК, может быть предпочтительно отобран для индукции РНК-интерференции целевой мРНК, поскольку нацеливание на такую область «горячей точки», вероятно, будет вызывать надежную ингибирующую реакцию относительно нацеливания на область, которая не является областью «горячей точки».

Агенты РНКи, нацеленные на целевые последовательности, которые по существу перекрываются (например, по меньшей мере примерно на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% длины целевой последовательности) или предпочтительно находятся полностью в пределах области «горячей точки», можно считать нацеленными на область «горячей точки». Области «горячей точки» целевой(ых) РНК согласно настоящему изобретению могут включать любую область, для которой данные, раскрытые в настоящем документе, демонстрируют более высокую частоту нацеливания эффективными агентами РНКи, в том числе с помощью любого из стандартов, описанных в другом месте настоящего документа, независимо от того, указан ли четко диапазон(диапазоны) такой области(областей) «горячей точки».

Согласно различным вариантам реализации агент на основе дцРНК согласно настоящему изобретению нацелен на область «горячей точки». Согласно одному варианту реализации область «горячей точки» содержит нуклеотидную последовательность любой из последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 21-47 и 51-93. Согласно другому варианту реализации область «горячей точки» содержит нуклеотиды 220-256, 220-266, 200-290 из SEQ ID NO: 13.

III. Модифицированные агенты РНКи согласно настоящему изобретению

Согласно одному варианту реализации нуклеотид агента РНКи согласно настоящему изобретению, например, дцРНК, не модифицирован и не содержит, например, химических модификаций или конъюгаций, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе. Согласно предпочтительным вариантам реализации нуклеотид агента РНКи согласно настоящему изобретению, например, дцРНК, химически модифицирован для повышения стабильности или других благоприятных характеристик. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения по существу все нуклеотиды агента РНКи согласно настоящему изобретению модифицированы. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения все нуклеотиды агента РНКи согласно настоящему изобретению модифицированы. Агенты РНКи согласно настоящему изобретению, в которых «по существу все нуклеотиды модифицированы» в значительной степени, но не полностью, модифицированы и могут включать не более 5, 4, 3, 2 немодифицированных нуклеотидов. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения агенты РНКи согласно настоящему изобретению могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 модифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, охарактеризованные в настоящем изобретении, можно синтезировать или модифицировать с помощью способов, хорошо установленных в данной области техники, таких как описанные в источнике «Current protocols in nucleic acid chemistry», Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи) или 3'-концевые модификации (конъюгацию, ДНК-нуклеотиды, инвертированные связи, и т. д.); модификации оснований, например, замену

стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями, или основаниями, которые спариваются с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (лишенные азотистого основания нуклеотиды), или конъюгированные основания; модификации сахара (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; или модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры агентов РНКи, которые можно применять в вариантах реализации, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются этим, РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природных межнуклеозидных связей. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают, помимо прочего, РНК, не содержащие атома фосфора в остове. Для целей настоящего описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, которые не имеют атома фосфора в их межнуклеозидном остове, также можно считать олигонуклеозидами. Согласно некоторым вариантам реализации модифицированный агент РНКи будет иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидаты и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры, и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги, и те, которые имеют инвертированную полярность, при которой смежные пары нуклеозидных звеньев соединены 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме свободной кислоты. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли. Согласно одному варианту реализации агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия. Согласно определенным вариантам реализации, если агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия, ионы натрия присутствуют в указанном агенте в качестве противоионов по существу для всех фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных групп, присутствующих в указанном агенте. Агенты, в которых по существу все из фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных связей имеют противоион натрия, включают не более 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирной и/или фосфотиоатной связи без противоиона натрия. Согласно некоторым вариантам реализации, если агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению находятся в форме соли натрия, ионы натрия присутствуют в указанном агенте в качестве противоионов для всех фосфодиэфирных и/или фосфотиоатных групп, присутствующих в указанном агенте.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение упомянутых выше фосфоросодержащих связей, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты

США №№ 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029; и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не включают в себя атом фосфора, имеют остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. К ним относятся те, которые имеют морфолиновые связи (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; содержащие алкены остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленгидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, имеющие смешанные составные части N, O, S и CH₂.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение упомянутых выше олигонуклеозидов, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437; и 5677439, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно другим вариантам реализации для применения в агентах РНКи предусмотрены подходящие миметики РНК, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов, нуклеотидных звеньев заменены новыми группами. Звенья оснований сохраняют для гибридизации с подходящим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает отличными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидосодержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания сохранены и связаны, непосредственно или опосредованно, с аза-атомами азота амидной части остова. Типичные патенты США, в которых раскрыто получение соединений PNA, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 5539082; 5714331; и 5719262, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в агентах для РНКи согласно настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты реализации, охарактеризованные 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 (метилимин) остов или остов ММІ], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ и $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как $--O--P--O--CH_2--$] из упомянутого выше патента США № 5489677, и амидные остовы из упомянутого выше патента США № 5602240. Согласно некоторым вариантам реализации РНК, охарактеризованные в настоящем документе, имеют структуры морфолинового остова из вышеупомянутого US 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или более замещенных сахарных фрагментов. Агенты РНКи, например дцРНК, охарактеризованные в настоящем документе, могут включать одно из следующего 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 представлять собой замещенный или незамещенный C₁-C₁₀ алкил или C₂-C₁₀ алкенил и алкинил. Примерные подходящие модификации включают O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m находятся в диапазоне от 1 до примерно 10. Согласно другим вариантам реализации дцРНК включают одно из следующих в 2'-положении: C₁-C₁₀ низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино, полиалкиламино, замещенный силил, РНК-расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств агента РНКи, или группу для улучшения фармакодинамических свойств агента РНКи, и другие заместители, имеющие подобные свойства. Согласно некоторым вариантам реализации модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), т. е. группу алкокси-алкокси. Другая примерная модификация представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группу O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известную как 2'-DMAOE, описанную в примерах в настоящем документе ниже, и 2'-диметиламинооксиэтокси (также известную в данной области техники как 2'-O-диметиламинооксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е., 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂. Дополнительные примерные модификации включают: 5'-Me-2'-F-нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (как R-изомеры, так и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил; и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-O-гексадецил и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также можно вносить в других положениях на РНК агента РНКи, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Агенты РНКи также могут содержать миметики сахара, такие как фрагменты циклобутила, вместо пентофуранозильного сахара. Типичные патенты США, в которых

раскрыто получение таких модифицированных структур сахара, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; и 5700920, некоторые из которых находятся в общем владении с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из упомянутых выше документов тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки.

Агент РНКи согласно настоящему изобретению также может включать модификации или замены нуклеинового основания (часто называемого в данной области техники просто как «основание»). В настоящем документе «немодифицированные» или «природные» нуклеиновые основания включают пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G), и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и природные нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-гало, в частности, 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезагуанин и 7-дезааденин, а также 3-дезагуанин и 3-дезааденин. Дополнительные нуклеиновые основания включают раскрытые в патенте США № 3687808, раскрытые в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, стр. 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые *Englisch et al., (1991) Angewandte Chemie, International Edition*, 30:613, и раскрытые *Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications*, стр. 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеиновых оснований особенно применимы для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, охарактеризованных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замены увеличивают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (*Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278*) и представляют собой примерные замены оснований, еще более конкретно при комбинировании с 2'-O-метоксиэтильными модификациями сахара.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение некоторых из упомянутых выше модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, но не ограничиваются перечисленными, упомянутые

выше патенты США №№ 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Агент РНКи согласно настоящему изобретению также можно модифицировать для включения одной или более блокированных нуклеиновых кислот (LNA). Блокированная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный фрагмент рибозы, в котором фрагмент рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-углероды. Эта структура эффективно «блокирует» рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Было показано, что добавление блокированных нуклеиновых кислот к кРНК повышает стабильность кРНК в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

Агент РНКи согласно настоящему изобретению также можно модифицировать для включения одного или более бициклических сахарных фрагментов. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное путем образования мостика между двумя атомами. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, содержащий фрагмент сахара, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца с образованием тем самым бициклической кольцевой системы. Согласно определенным вариантам реализации мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца. Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации агент согласно настоящему изобретению может включать одну или более блокированных нуклеиновых кислот (LNA). Блокированная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный фрагмент рибозы, в котором фрагмент рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-углероды. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно «блокирует» рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Было показано, что добавление блокированных нуклеиновых кислот к кРНК повышает стабильность кРНК в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. Согласно определенным вариантам реализации антисмысловые полинуклеотидные агенты согласно настоящему изобретению включают один или более бициклических нуклеозидов, содержащих мостик 4'-2'. Примеры таких 4'-2'-мостиковых бициклических нуклеозидов, включают, но не ограничиваются перечисленными, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-

2' (также называемый «ограниченным этилом» или «сEt») и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и его аналоги; см. например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C1-C12-алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из упомянутых выше документов тем самым включено в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные типичные патенты США и публикации патентов США, в которых раскрыто получение заблокированных нуклеотидов нуклеиновой кислоты, включают, но не ограничиваются перечисленными, следующие: патенты США №№ 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618; и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Может быть получен любой из вышеупомянутых бициклических нуклеозидов, имеющий одну или более стереохимических конфигураций сахара, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

Агент РНКи согласно настоящему изобретению также можно модифицировать для включения одного или более ограниченных этилнуклеотидов. В настоящем документе «ограниченный этилнуклеотид» или «сEt» представляет собой заблокированную нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий мостик 4'-CH(CH₃)-O-2'. Согласно одному варианту реализации ограниченный этилнуклеотид находится в S-конформации, называемой в настоящем документе «S-cEt».

Агент РНКи согласно настоящему изобретению также может включать один или более «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2' и C4'-углероды рибозы или C3 и -C5'-углероды рибозы. CRN блокируют рибозное кольцо в стабильной конформации и повышают аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину для размещения кислорода в оптимальном положении для стабильности и аффинности, что приводит к меньшему «сморщиванию» рибозного кольца.

Типичные публикации, в которых раскрыто получение некоторых из упомянутых выше CRN, включают, но не ограничиваются перечисленными, US 2013/0190383; и WO 2013/036868, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи согласно настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (неблокированные нуклеиновые кислоты). UNA представляет собой

неблокированную ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой любая из связей сахара была удалена с образованием неблокированного «сахарного» остатка. В одном примере UNA также включает мономер, в котором удалены связи между C1'-C4' (т. е. ковалентная связь углерод-кислород-углерод между C1'- и C4'-углеродами). В другом примере связь C2'-C3' сахара (т. е. ковалентная связь углерод-углерод между C2'- и C3'-углеродами) была удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и *Fluiter et al., Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039, которые включены в настоящий документ посредством ссылки).

Типичные публикации США, в которых раскрыто получение UNA, включают, но не ограничиваются перечисленными, US8314227; и публикации патентов США №№ 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-ННAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3'-фосфат, инвертированный 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид, такой как инвертированный dT(idT), инвертированный dA (idA) и инвертированный лишенный азотистого основания 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид (iAb) и другие. Раскрытие этой модификации можно найти в WO 2011/005861.

В одном примере 3'- или 5'-конец олигонуклеотида связан с инвертированным 2'-дезоксидифицированным рибонуклеотидом, таким как инвертированный dT(idT), инвертированный dA (idA) или инвертированный лишенный азотистого основания 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид (iAb). В одном конкретном примере инвертированный 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид связан с 3'-концом олигонуклеотида, таким как 3'-конец смысловой цепи, описанной в настоящем документе, причем указанная связь происходит посредством 3'-3'-фосфодиэфирной связи или 3'-3'-фосфотиоатной связи.

В другом примере 3'-конец смысловой цепи связан посредством 3'-3'-фосфотиоатной связи с инвертированным лишенным азотистого основания рибонуклеотидом (iAb). В другом примере 3'-конец смысловой цепи связан посредством 3'-3'-фосфотиоатной связи с инвертированным dA (idA).

В другом примере 5'-конец смысловой цепи связан посредством 3'-3'-фосфотиоатной связи с инвертированным лишенным азотистого основания рибонуклеотидом (iAb). В другом примере 5'-конец смысловой цепи связан посредством 3'-3'-фосфотиоатной связи с инвертированным dA (idA).

В другом примере 3'- и 5'-концы смысловой цепи связаны посредством 3'-3'-фосфотиоатных связей с инвертированными лишенными азотистого основания рибонуклеотидами (iAb). В другом примере 3'- и 5'-концы смысловой цепи связаны посредством 3'-3'-фосфотиоатных связей с инвертированными dA (idA).

В одном конкретном примере инвертированный 2'-дезоксидифицированный рибонуклеотид связан с 3'-концом олигонуклеотида, таким как 3'-конец смысловой цепи,

описанной в настоящем документе, причем указанная связь происходит посредством 3'-3'-фосфодизфирной связи или 3'-3'-фосфотиоатной связи.

В другом примере 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи представляют собой инвертированный dA (idA) и связаны с предыдущим нуклеотидом посредством 3'-3'-связи (например, 3'-3'-фосфотиоатной связи).

Другие модификации агента РНКи согласно настоящему изобретению включают 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата на антисмысловой цепи агента РНКи. Подходящие миметики фосфата раскрыты, например, в US 2012/0157511, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

А. Модифицированные агенты РНКи, содержащие мотивы согласно настоящему изобретению

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению включают агенты с химическими модификациями, раскрытыми, например, в WO 2013/075035, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Как показано в настоящем документе и в WO 2013/075035, превосходный результат можно получить путем введения одного или более мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь или антисмысловую цепь агента РНКи, в частности, в сайте расщепления или вблизи него. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь и антисмысловая цепь агента РНКи в ином случае могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает профиль модификации смысловой или антисмысловой цепи, если он присутствует. Агент РНКи может быть необязательно конъюгирован с липофильным лигандом, например, с С16-лигандом, например, на смысловой цепи. Агент РНКи может быть необязательно модифицирован с использованием модификации (S)-гликольнуклеиновой кислотой (GNA), например, на одном или более остатках антисмысловой цепи. Полученные в результате агенты РНКи характеризуются превосходной активностью сайленсинга генов.

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложены двухцепочечные агенты РНКи, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т. е. гена *C9orf72*) *in vivo*. Агент РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь агента РНКи может иметь длину 15-30 нуклеотидов. Например, каждая цепь может иметь длину 16-30 нуклеотидов, 17-30 нуклеотидов, 25-30 нуклеотидов, 27-30 нуклеотидов в длину, 17-23 нуклеотида, 17-21 нуклеотид, 17-19 нуклеотидов, 19-25 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида в длину, 19-21 нуклеотид, 21-25 нуклеотидов или 21-23 нуклеотида. Согласно определенным вариантам реализации каждая цепь имеет длину 19-23 нуклеотида.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь, как правило, образуют дуплексную двухцепочечную РНК («дцРНК»), также называемую в настоящем документе «агент РНКи». Дуплексная область агента РНКи может иметь длину 15-30 пар нуклеотидов. Например, дуплексная область может иметь длину 16-30 пар нуклеотидов, длину 17-30 пар

нуклеотидов, длину 27-30 пар нуклеотидов, длину 17-23 пары нуклеотидов, длину 17-21 пару нуклеотидов, длину 17-19 пар нуклеотидов, длину 19-25 пар нуклеотидов, длину 19-23 пары нуклеотидов, длину 19-21 пару нуклеотидов, длину 21-25 пар нуклеотидов у или длину 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере дуплексная область выбрана из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину. Согласно предпочтительным вариантам реализации дуплексная область имеет длину 19-21 пару нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи может содержать одну или более областей липких концов или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Липкий конец может иметь длину 1-6, например, длину 2-6 нуклеотидов, длину 1-5 нуклеотидов, длину 2-5 нуклеотидов, длину 1-4 нуклеотида, длину 2-4 нуклеотида, длину 1-3 нуклеотида, длину 2-3 нуклеотида или длину 1-2 нуклеотида. Согласно предпочтительным вариантам реализации область нуклеотидного липкого конца имеет длину 2 нуклеотида. Липкие концы могут быть получены в результате того, что одна цепь длиннее другой, или в результате того, что две цепи одинаковой длины расположены в шахматном порядке. Липкий конец может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, которые являются мишенями, или может представлять собой другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, с помощью дополнительных оснований с образованием шпильки или с помощью других линкеров, не содержащих оснований.

Согласно одному варианту реализации каждый из нуклеотидов в области липкого конца агента РНКи может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включающий, но не ограничивающийся указанным, 2'-сахар-модифицированный, такой как 2-F, 2'-O-метил, тимидин (Т) и любые их комбинации.

Например, ТТ может представлять собой последовательность липкого конца для любого конца на любой цепи. Липкий конец может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, которые являются мишенями, или может представлять собой другую последовательность.

5'- или 3'-липкие концы на смысловой цепи, антисмысловой цепи или на обеих цепях агента РНКи могут быть фосфорилированы. Согласно некоторым вариантам реализации область(области) липкого конца содержит(ат) два нуклеотида, имеющих фосфотиоат между двумя нуклеотидами, причем указанные два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. Согласно одному варианту реализации липкий конец присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. Согласно одному варианту реализации указанный 3'-липкий конец присутствует в антисмысловой цепи. Согласно одному варианту реализации указанный 3'-липкий конец присутствует в смысловой цепи.

Агент РНКи может содержать только один липкий конец, который может усиливать интерференционную активность РНКи, не влияя на ее общую стабильность. Например, одноцепочечной липкий конец может быть расположен на 3'-конце смысловой цепи или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой цепи. РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или 3'-конце смысловой цепи) или

наоборот. Обычно антисмысловая цепь РНКи имеет нуклеотидный липкий конец на 3'-конце, и 5'-конец является тупым. Не ограничиваясь какой-либо теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и 3'-концевой липкий конец антисмысловой цепи способствуют загрузке направляющей цепи в процесс RISC.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи имеет оба тупых конца и содержит 19 нуклеотидов в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца.

Согласно другому варианту реализации агент РНКи имеет оба тупых конца и содержит 20 нуклеотидов в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца.

Согласно другому варианту реализации агент РНКи имеет оба тупых конца и содержит 21 нуклеотид в длину, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 с 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит 21-нуклеотидную смысловую цепь и 23-нуклеотидную антисмысловую цепь, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 с 5'-конца; указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 с 5'-конца, при этом один конец агента РНКи является тупым, в то время как другой конец содержит 2-нуклеотидный липкий конец. Предпочтительно 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи. Если 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи, могут существовать две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, причем два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды липкого конца, и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид рядом с нуклеотидом липкого конца. Согласно одному варианту реализации агент РНКи дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. Согласно одному варианту реализации каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи агента РНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляет собой модифицированный нуклеотид. Согласно

одному варианту реализации каждый остаток независимо модифицирован с использованием 2'-О-метила или 3'-фтора, например, в чередующемся мотиве. Необязательно агент РНКи дополнительно содержит лиганд (например, липофильный лиганд, необязательно С16-лиганд).

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит смысловую и антисмысловую цепь, причем указанная смысловая цепь имеет длину 25-30 нуклеотидных остатков, причем, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; указанная антисмысловая цепь имеет длину 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью с образованием тем самым 3'-одноцепочечного липкого конца из 1-6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, с образованием тем самым одноцепочечного 5'-липкого конца из 10-30 нуклеотидов; при этом по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи спарены с нуклеотидами антисмысловой цепи, если смысловые и антисмысловые цепи выравнены для обеспечения максимальной комплементарности, с образованием тем самым по существу дуплексной области между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является достаточно комплементарной целевой РНК вдоль по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций на трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов возникает в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит смысловую и антисмысловую цепи, причем указанный агент РНКи содержит первую цепь, имеющую длину, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую цепь, имеющую длину, которая составляет не более 30 нуклеотидов, с по меньшей мере одним мотивом из трех 2'-О-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положении 11, 12, 13 с 5'-конца; при этом 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи образуют тупой конец, и вторая цепь длиннее на 1-4 нуклеотида на своем 3'-конце, чем первая цепь, при этом указанная дуплексная область имеет длину по меньшей мере 25 нуклеотидов, и вторая цепь является достаточно комплементарной целевой мРНК вдоль по меньшей мере 19 нуклеотида по длине второй цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении агента РНКи в клетку млекопитающего, и при этом расщепление Dicer агента

РНКи преимущественно приводит к образованию киРНК, содержащей 3'-конец второй цепи, что снижает экспрессию целевого гена у млекопитающего. Необязательно агент РНКи дополнительно содержит лиганд.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь агента РНКи содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, причем один из мотивов возникает в сайте расщепления в смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь агента РНКи также может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, причем один из мотивов возникает в сайте расщепления или рядом с ним в антисмысловой цепи.

В случае агента РНКи, имеющего дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, сайт расщепления антисмысловой цепи, как правило, находится около 10, 11 и 12 положений с 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут возникать в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях; или 13, 14, 15 положениях антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца антисмысловой цепи, или отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также может изменяться в соответствии с длиной дуплексной области РНКи с 5'-конца.

Смысловая цепь агента РНКи может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления указанной цепи; и антисмысловая цепь может иметь по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи или рядом с ним указанной цепи. Если смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс дцРНК, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выравнены так, что один мотив из трех нуклеотидов на смысловой цепи и один мотив из трех нуклеотидов на антисмысловой цепи имеют по меньшей мере однонуклеотидное перекрытие, 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.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь агента РНКи может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может возникать в сайте расщепления цепи или вблизи него, и другие мотивы могут представлять собой модификацию «крыла». Термин «модификация крыла» в настоящем документе относится к мотиву, возникающему в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления или вблизи него той же цепи. Модификация «крыла» либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или более нуклеотидами. Если мотивы являются непосредственно смежными друг с другом, то химическая структура мотивов отличается друг от друга, и

если мотивы разделены одним или более нуклеотидами, химическая структура может быть одинаковой или разной. Могут присутствовать две или более модификаций «крыла». Например, при наличии двух модификаций «крыла» каждая модификация «крыла» может возникать на одном конце относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления или вблизи него, или по обеим сторонам от основного мотива.

Как и смысловая цепь, антисмысловая цепь агента РНКи может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, при этом по меньшей мере один из мотивов возникает в сайте расщепления указанной цепи или вблизи него. Указанная антисмысловая цепь также может содержать одну или более модификаций «крыла», расположение которых сходно с модификациями «крыла», которые могут присутствовать на смысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации модификация «крыла» на смысловой цепи или антисмысловой цепи агента РНКи, как правило, не включает один или два первых концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

Согласно другому варианту реализации модификация «крыла» на смысловой цепи или антисмысловой цепи агента РНКи, как правило, не включает один или два первых спаренных нуклеотида в пределах дуплексной области на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

Если каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента РНКи содержит по меньшей мере одну модификацию «крыла», то модификации «крыла» могут попадать на один и тот же конец дуплексной области и могут иметь перекрывание одного, двух или трех нуклеотидов.

Если каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента РНКи содержит по меньшей мере две модификации «крыла», смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть настолько выравнены, что две модификации, каждая из одной цепи, приходятся на один конец дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации, каждая из одной цепи, приходятся на другой конец дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации одной цепи приходятся на каждую сторону основного мотива с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов в дуплексной области.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит несовпадение(я) с мишенью, в пределах дуплекса, или их комбинации. Несовпадение может возникать в области липкого конца или в дуплексной области. Пару оснований можно ранжировать на основании ее склонности способствовать диссоциации или плавлению (например, на основании свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самый простой подход заключается в изучении пар на основе отдельной пары, хотя также можно использовать анализ следующей соседней пары или сходный анализ). С точки зрения содействия диссоциации: A:U предпочтительнее, чем G:C; G:U предпочтительнее, чем G:C; и I:C предпочтительнее, чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические пары или отличные от канонических пары (как описано в другом месте в настоящем

документе) являются предпочтительными по сравнению с каноническими (A:T, A:U, G:C) парами; и пары, которые включают универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническими парами.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в пределах дуплексных областей с 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранную из группы: A:U, G:U, I:C, и несовпадающие пары, например, неканонические пары или отличные от канонических пары или пары, которые включают универсальное основание, чтобы способствовать диссоциации антисмысловой цепи, на 5'-конце дуплекса.

Согласно одному варианту реализации нуклеотид в положении 1 в пределах дуплексной области с 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 пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

Согласно другому варианту реализации нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT). Согласно другому варианту реализации нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимин (dT). Согласно одному варианту реализации существует короткая последовательность дезокситиминовых нуклеотидов, например, два нуклеотида dT на 3'-конце смысловой или антисмысловой цепи.

Согласно одному варианту реализации смысловая последовательность может быть представлена формулой (I):



где:

каждый i и j независимо представляет собой 0 или 1;

каждый p и q независимо представляет собой 0-6;

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

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотид липкого конца;

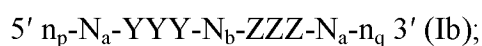
причем N_b и Y не имеют одинаковой модификации; и

каждый XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Предпочтительно все YYY представляют собой 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

Согласно одному варианту реализации N_a или N_b содержит модификации в чередующемся порядке.

Согласно одному варианту реализации мотив YYY возникает в сайте расщепления смысловой цепи или вблизи него. Например, если агент РНКи имеет дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, то мотив YYY может возникать в сайте расщепления или в непосредственной близости от него (например: может возникать в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой цепи, начиная отсчет с 1-го нуклеотида с 5'-конца; или необязательно начиная отсчет с 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца.

Согласно одному варианту реализации i представляет собой 1 и j представляет собой 0, или i представляет собой 0 и j представляет собой 1, или как i , так и j представляют собой 1. Таким образом, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:



Если 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.

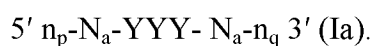
Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

Если смысловая цепь представлена формулой (Id), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

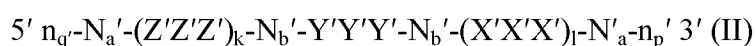
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличающимся друг от друга.

Согласно другим вариантам реализации i представляет собой 0 и j представляет собой 0, и смысловая цепь может быть представлена формулой:



Если смысловая цепь представлена формулой (Ia), каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Согласно одному варианту реализации последовательность антисмысловой цепи РНКи может быть представлена формулой (II):



где:

каждый k и l независимо представляет собой 0 или 1;

каждый p' и q' независимо представляет собой 0-6;
 каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

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

каждый n_p' и n_q' независимо представляет собой нуклеотид липкого конца;

причем N_b' и Y' не имеют одинаковой модификации;

и каждый $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

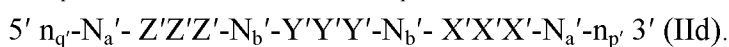
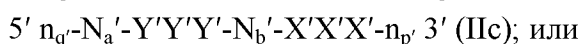
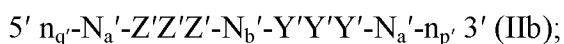
Согласно одному варианту реализации N_a' или N_b' содержат модификации в чередующемся порядке.

Мотив $Y'Y'Y'$ возникает в сайте расщепления антисмысловой цепи или вблизи него. Например, если агент РНКи имеет дуплексную область из 17-23 нуклеотидов в длину, то мотив $Y'Y'Y'$ может возникать в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца; или необязательно отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца. Предпочтительно мотив $Y'Y'Y'$ возникает в положениях 11, 12, 13.

Согласно одному варианту реализации мотив $Y'Y'Y'$ представляет собой все 2'-ОМемодифицированные нуклеотиды.

Согласно одному варианту реализации k представляет собой 1 и l представляет собой 0, или k представляет собой 0 и l представляет собой 1, или как k , так и l представляют собой 1.

Таким образом, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

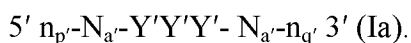


Если антисмысловая цепь представлена формулой (IIb), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если 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. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если антисмысловая цепь представлена формулой (IIId), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Согласно другим вариантам реализации k представляет собой 0 и 1 представляет собой 0, и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:



Если антисмысловая цепь представлена формулой (IIa), каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждый из X' , Y' и Z' может быть одинаковым или отличающимся друг от друга.

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован LNA, 1,5-ангидрогекситолом (HNA), циклогексенилом (CeNA), 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием 2'-О-метил или 2'-фтор. Каждый X , Y , Z , X' , Y' и Z' , в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

Согласно одному варианту реализации смысловая цепь агента РНКи может содержать мотив YYY , возникающий в 9, 10 и 11 положениях цепи, если дуплексная область представляет собой 21 нуклеотид, начиная отсчет от 1-го нуклеотида с 5'-конца, или необязательно начиная отсчет с 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве модификаций «крыла» на противоположном конце дуплексной области; и каждый XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Согласно одному варианту реализации антисмысловая цепь может содержать мотив $Y'Y'Y'$, возникающий в положениях 11, 12, 13 цепи, начиная отсчет от 1-го нуклеотида с 5'-конца, или необязательно начиная отсчет от 1-го спаренного нуклеотида в пределах дуплексной области с 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метильную модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив $X'X'X'$ или мотивы $Z'Z'Z'$ в качестве модификаций «крыла» на противоположном конце дуплексной области; и каждый $X'X'X'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

Соответственно, агенты РНКи для применения в способах согласно настоящему изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, при этом каждая

цепь имеет от 14 до 30 нуклеотидов, при этом указанный дуплекс РНКи представлен формулой (III):

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

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

(III)

где:

каждый i, j, k и l независимо представляет собой 0 или 1;

каждый p, p', q и q' независимо представляет собой 0-6;

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

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

где

каждый n_p', n_p, n_q' и n_q , каждый из которых может присутствовать или может не присутствовать, независимо представляет собой нуклеотид липкого конца; и

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

Согласно одному варианту реализации i представляет собой 0 и j представляет собой 0; или i представляет собой 1 и j представляет собой 0; или i представляет собой 0 и j представляет собой 1; или как i , так и j представляют собой 0; или как i , так и j представляют собой 1. Согласно другому варианту реализации k представляет собой 0 и l представляет собой 0; или k представляет собой 1 и l представляет собой 0; k представляет собой 0 и l представляет собой 1; или как k , так и l представляют собой 0; или как k , так и l представляют собой 1.

Примерные комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс РНКи, включают формулы ниже:

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

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

(IIIa)

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

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

(IIIb)

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

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

(IIIc)

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

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

(III d)

Если агент РНКи представлен формулой (IIIa), каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если агент РНКи представлен формулой (IIIb), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если агент РНКи представлен формулой (IIIc), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если агент РНКи представлен формулой (IIIд), каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации в чередующемся порядке.

Согласно одному варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIд), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор. Согласно другому варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIд), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, и $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. Согласно еще одному варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIд), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более C16 (или родственными) фрагментами, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера (описанного ниже). Согласно другому варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIд), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами, например, C16-фрагментами (или родственными), необязательно присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Согласно одному варианту реализации, если агент РНКи представлен формулой (IIIa), модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил или 2'-фтор, $n_{p'} > 0$ и по меньшей мере один $n_{p'}$ связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной

связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами, например, С16-фрагментами (или родственными), присоединенным посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

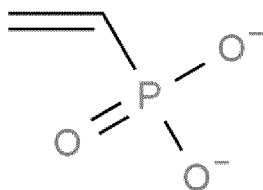
Согласно одному варианту реализации агент РНКи представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (Ш), (Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), причем указанные дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливать на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может нацеливать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

Согласно одному варианту реализации агент РНКи представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (Ш), (Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), причем указанные дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может нацеливать на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может нацеливать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

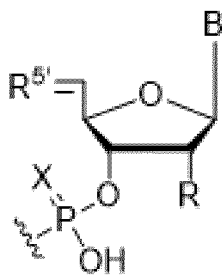
Согласно одному варианту реализации два агента РНКи, представленные формулой (Ш), (Ша), (Шб), (Шс) и (Шд), связаны друг с другом на 5'-конце и одном или обоих из 3'-концов и необязательно конъюгированы с лигандом. Каждый из агентов может нацеливать на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из агентов может нацеливать на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В различных публикациях описаны мультимерные агенты РНКи, которые можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520; и US 7858769, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам реализации композиции и способы согласно настоящему изобретению включают винилфосфонатную (VP) модификацию агента РНКи, описанного в настоящем документе. Согласно примерным вариантам реализации винилфосфонат согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру:



Согласно примерным вариантам реализации модифицированный 5'-винилфосфонатом нуклеотид согласно настоящему изобретению имеет структуру:



где X представляет собой O или S;

R представляет собой водород, гидроксильную группу, фтор или C₁₋₂₀алкокси (например, метокси или n-гексадецилокси);

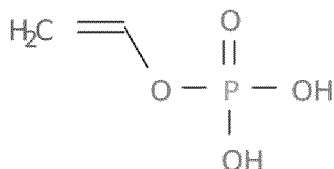
R^{5'} представляет собой =C(H)-P(O)(OH)₂ и двойная связь между C5'-углеродом и R^{5'} находится в ориентации E или Z (например, ориентации E); и

B представляет собой нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание, где B необязательно представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил.

Согласно одному варианту реализации R^{5'} представляет собой =C(H)-P(O)(OH)₂, и двойная связь между C5'-углеродом и R^{5'} находится в ориентации E. Согласно другому варианту реализации R представляет собой метокси, и R^{5'} представляет собой =C(H)-P(O)(OH)₂, и двойная связь между C5'-углеродом и R^{5'} находится в ориентации E. Согласно другому варианту реализации X представляет собой S, R представляет собой метокси, и R^{5'} представляет собой =C(H)-P(O)(OH)₂, и двойная связь между C5'-углеродом и R^{5'} находится в ориентации E.

Винилфосфонат согласно настоящему изобретению может быть присоединен либо к антисмысловому, либо к смысловому цепи дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно определенным предпочтительным вариантам реализации винилфосфонат согласно настоящему изобретению присоединен к антисмысловому цепи дцРНК, необязательно на 5'-конце антисмысловому цепи дцРНК.

Модификации винилфосфатом также предусмотрены для композиций и способов согласно настоящему изобретению. Примерная структура винилфосфоната представляет собой:



Другая примерная структура винилфосфата включает предшествующую структуру, где R^{5'} представляет собой =C(H)-OP(O)(OH)₂, и двойная связь между C5'-углеродом и R^{5'} находится в ориентации E или Z (например, ориентации E).

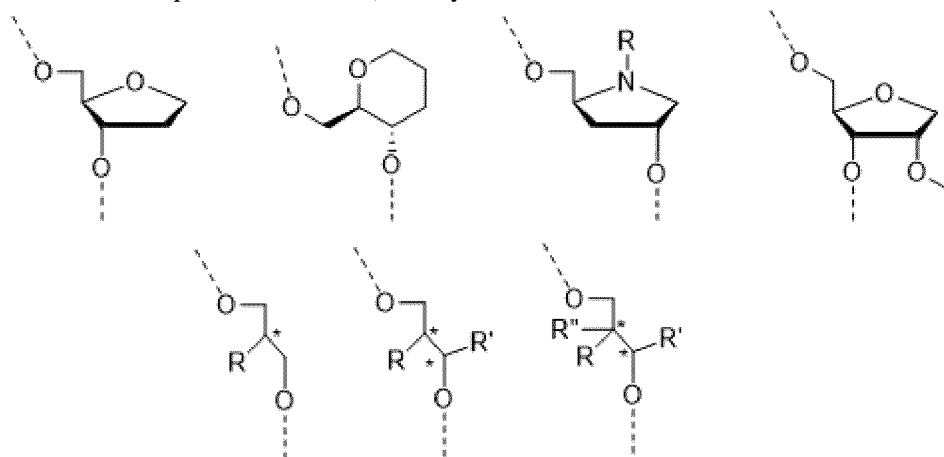
г. Термически дестабилизирующие модификации

Согласно определенным вариантам реализации молекулу дцРНК можно оптимизировать для РНК-интерференции путем включения термически

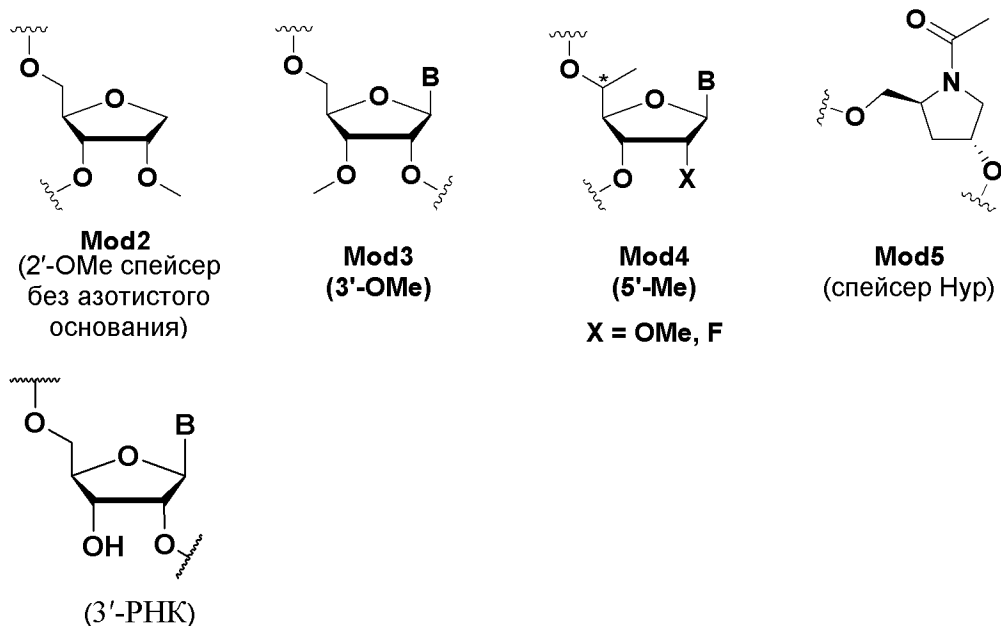
дестабилизирующих модификаций в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положениях 2-9 5'-конца антисмысловой цепи) для снижения или ингибирования сайленсинга нецелевого гена. Было обнаружено, что дцРНК с антисмысловой цепью, содержащей по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая от 5'-конца, антисмысловой цепи, обладают сниженной активностью сайленсинга нецелевого гена. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений 5'-области антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации одна или более термически дестабилизирующих модификаций дуплекса расположены в положениях 2-9 или предпочтительно в положениях 4-8 с 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым дополнительным вариантам реализации термически дестабилизирующая(ие) модификация(ии) дуплекса расположена(ы) в положении 6, 7 или 8 с 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым дополнительным вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 7 с 5'-конца антисмысловой цепи. Термин «термически дестабилизирующая модификация(ии)» включает модификацию(ии), которая приведет к получению дцРНК с более низкой общей температурой плавления (T_m) (предпочтительно T_m на один, два, три или четыре градуса ниже T_m дцРНК без такой модификации(ий)). Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 с 5'-конца антисмысловой цепи.

Термически дестабилизирующие модификации могут включать, но не ограничиваются перечисленными, модификацию путем удаления азотистого основания; несовпадение с противоположным нуклеотидом в противоположной цепи; и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксид-модификация или ациклический нуклеотид, например, неблокированные нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA; и 2'-5'-связанные рибонуклеотиды («3'-РНК»)).

Примерные модификации путем удаления азотистого основания включают, но не ограничиваются перечисленными, следующие:

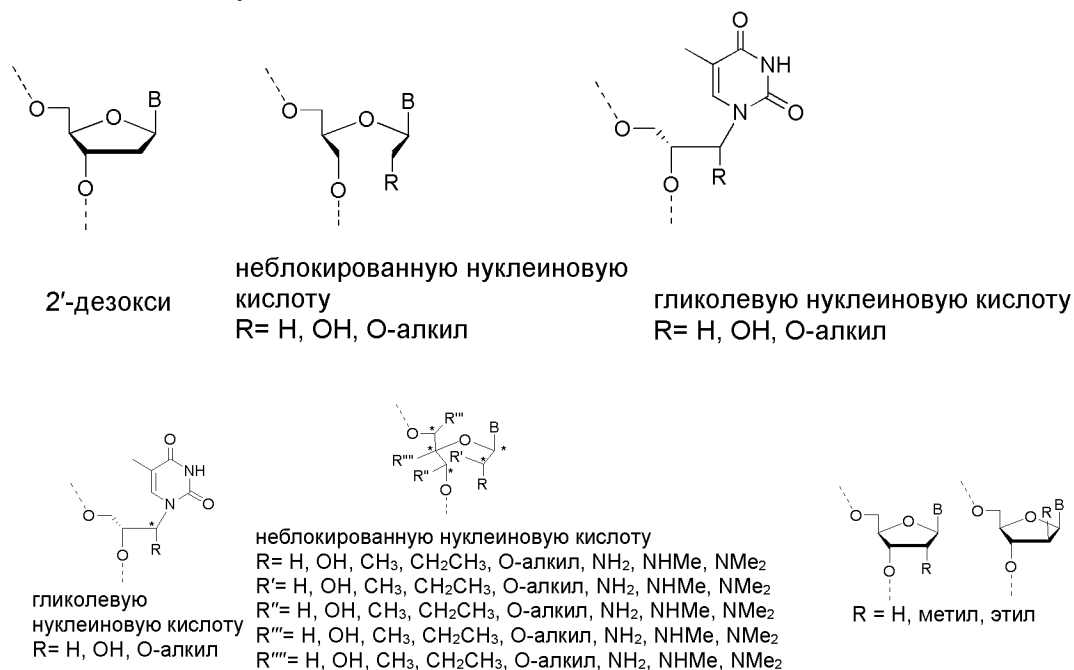


Где R=H, Me, Et или OMe; R'=H, Me, Et или OMe; R''=H, Me, Et или OMe



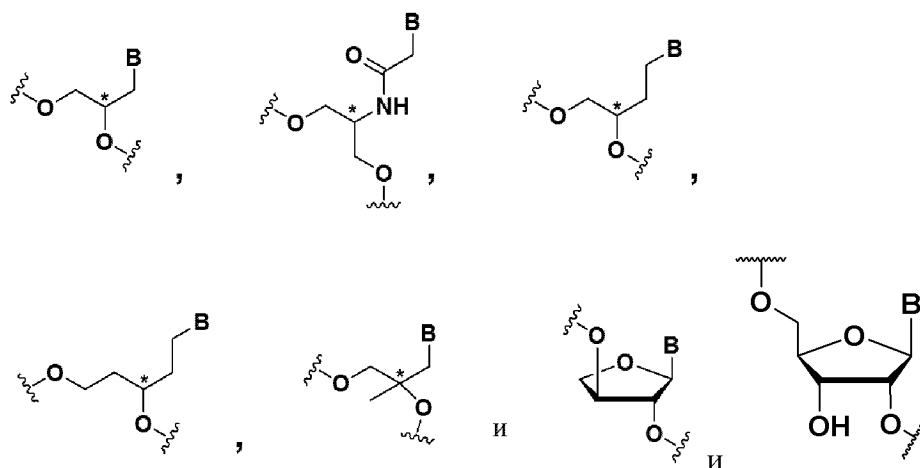
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

Примерные модификации сахара включают, но не ограничиваются перечисленными, следующие:



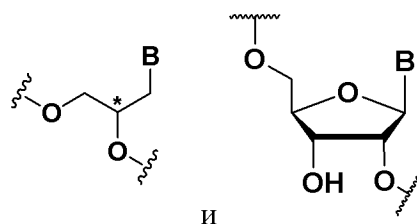
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



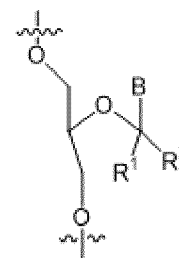
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой либо *R*, либо *S*, либо рацемат.

Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:

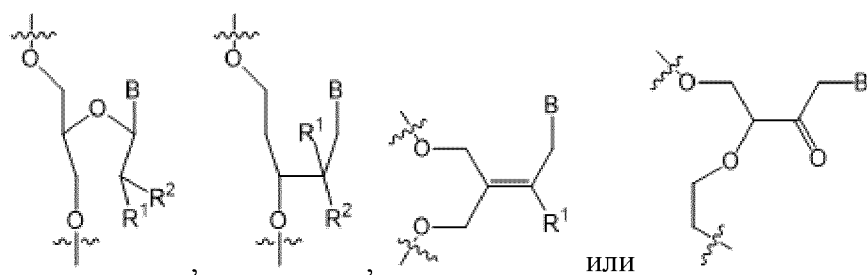


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, и звездочка представляет собой либо *R*, либо *S*, либо рацемат (например, *S*).

Термин «ациклический нуклеотид» относится к любому нуклеотиду, имеющему ациклический рибозный сахар, например, в котором любая из связей между углеродами рибозы (например, C1'-C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4' или C1'-O4') отсутствует или по меньшей мере один из атомов углерода или кислорода рибозы (например, C1', C2', C3', C4' или O4') независимо или в комбинации отсутствует в нуклеотиде. Согласно некоторым

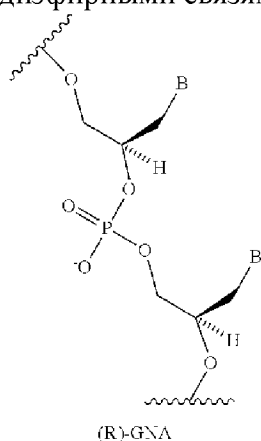


вариантам реализации ациклический нуклеотид представляет собой



, где В представляет собой модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, галоген, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. Термин «UNA» относится к неблокированной ациклической нуклеиновой кислоте, в которой любая из связей сахара была удалена с образованием неблокированного «сахарного» остатка. В одном примере UNA также включает мономеры, в которых удалены связи между $C1'-C4'$ (т. е. ковалентная связь углерод-кислород-углерод между $C1'$ - и $C4'$ -углеродами). В другом примере связь $C2'-C3'$ (т. е. ковалентная связь углерод-углерод между $C2'$ - и $C3'$ -углеродами) сахара удалена (см. Mikhailov et. al., *Tetrahedron Letters*, 26 (17): 2059 (1985); и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 10: 1039 (2009), которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость остова, не влияя на спаривания по Уотсону-Крику. Ациклический нуклеотид может быть связан посредством $2'-5'$ -связи или $3'-5'$ -связи.

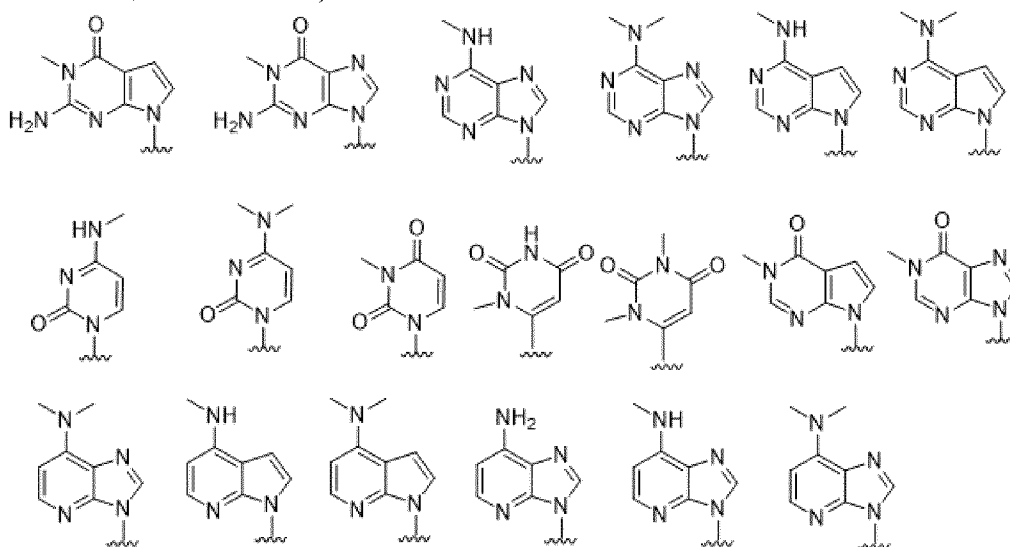
Термин «GNA» относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, сходный с ДНК или РНК, но отличающийся по композиции его «остова» тем, что он состоит из повторяющихся глицериновых звеньев, связанных фосфодиэфирными связями:



Термически дестабилизирующая модификация дуплекса может представлять собой несовпадения (т. е. некомплементарные пары оснований) между термически дестабилизирующим нуклеотидом и противоположным нуклеотидом в противоположной цепи в пределах дуплекса дцРНК. Примерные несовпадающие пары оснований включают G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T или их комбинацию. Другие несовпадающие пары оснований, известные в данной области техники, также являются

приемлемыми для настоящего изобретения. Несовпадение может возникать между нуклеотидами, которые являются либо встречающимися в природе нуклеотидами, либо модифицированными нуклеотидами, т. е. несовпадение спаривания оснований может возникать между нуклеиновыми основаниями соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций на рибозных сахарах нуклеотидов. Согласно определенным вариантам реализации молекула дцРНК содержит по меньшей мере одно нуклеиновое основание с несовпадающим спариванием, которое представляет собой 2'-дезоксинуклеиновое основание; например, 2'-дезоксинуклеиновое основание находится в смысловой цепи.

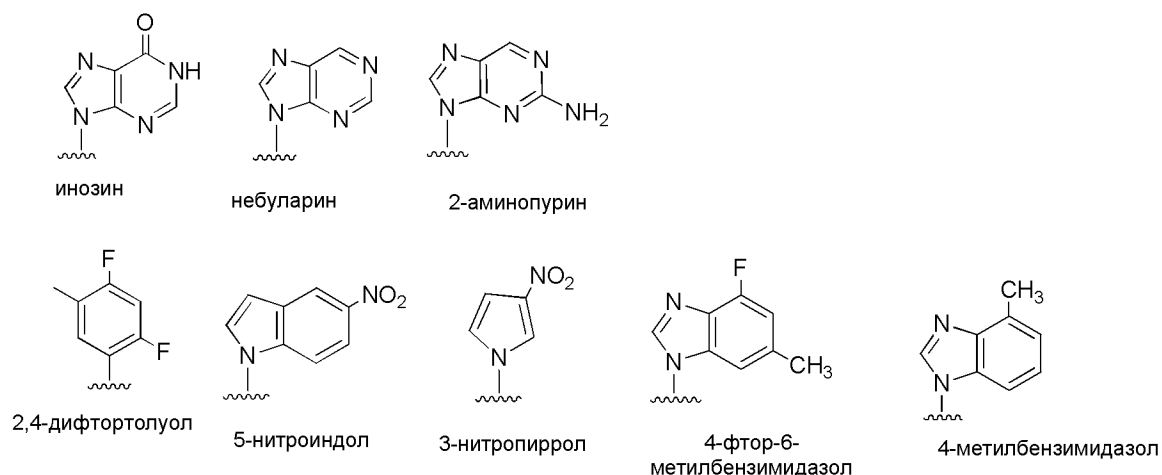
Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой цепи включает нуклеотиды с нарушенным образованием водородных связей по Уотсону-Крику с комплементарным основанием на целевой мРНК, такие как:



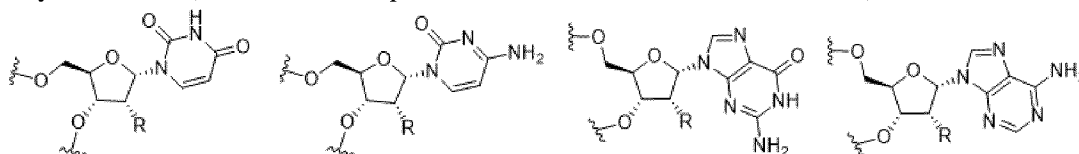
Дополнительные примеры лишено азотистого основания нуклеотида, ациклических нуклеотидных модификаций (включая UNA и GNA) и модификаций, приводящих к несовпадению, подробно описаны в WO 2011/133876, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Термически дестабилизирующие модификации также могут включать универсальное основание со сниженной или устраненной способностью образовывать водородные связи с противоположными основаниями и модификации фосфата.

Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса включает нуклеотиды с неканоническими основаниями, например, но не ограничиваясь этим, модификации нуклеиновых оснований с нарушенной или полностью устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной цепи. Указанные модификации нуклеиновых оснований оценивали в отношении дестабилизации центральной области дуплекса дцРНК, как описано в WO 2010/0011895, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Примерные модификации нуклеиновых оснований представляют собой:

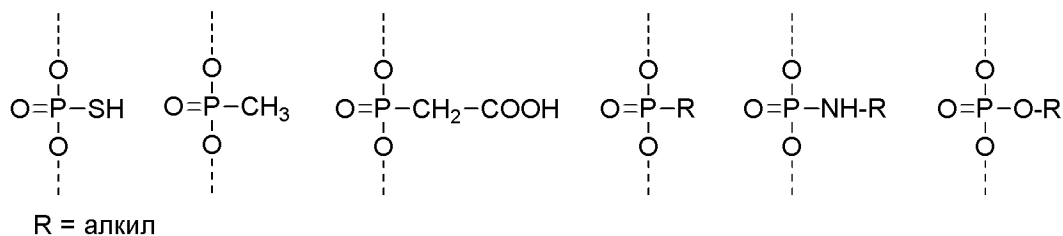


Согласно некоторым вариантам реализации термически дестабилизирующая модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой цепи включает один или более α -нуклеотидов, комплементарных основанию на целевой мРНК, таких как:



где R представляет собой H, OH, OCH₃, F, NH₂, NHMe, NMe₂ или O-алкил.

Примерные модификации фосфата, которые, как известно, уменьшают термическую стабильность дуплексов дцРНК по сравнению с природными фосфодиэфирными связями, представляют собой:



Алкил для группы R может представлять собой C₁-C₆алкил. Конкретные алкилы для группы R включают, но не ограничиваются перечисленными, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил и гексил.

Специалист в данной области техники поймет, что функциональная роль нуклеиновых оснований определяет специфичность агента РНКи согласно настоящему изобретению, в то время как модификации нуклеиновых оснований можно выполнять различными способами, описанными в настоящем документе, например, для введения дестабилизирующих модификаций в агент РНКи согласно настоящему изобретению, например, с целью усиления целевого эффекта относительно нецелевого эффекта, и что диапазон доступных модификаций и в целом присутствующих на агентах РНКи согласно настоящему изобретению, как правило, является намного большим для ненуклеиновых модификаций, например, модификаций сахарных групп или фосфатных остовов

полирибонуклеотидов. Такие модификации более подробно описаны в других разделах настоящего изобретения и явным образом предусмотрены для агентов РНК согласно настоящему изобретению, имеющих нативные нуклеиновые основания или модифицированные нуклеиновые основания, описанные выше или в другом месте в настоящем документе.

В дополнение к антисмысловой цепи, содержащей термически дестабилизирующую модификацию, дцРНК также может содержать одну или более стабилизирующих модификаций. Например, дцРНК может содержать по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, все стабилизирующие модификации могут присутствовать в одной цепи. Согласно некоторым вариантам реализации как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь содержат по меньшей мере две стабилизирующие модификации. Стабилизирующая модификация может возникать на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, стабилизирующая модификация может возникать на каждом нуклеотиде в смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая стабилизирующая модификация может возникать в чередующемся порядке на смысловой цепи или антисмысловой цепи; либо смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат стабилизирующую модификацию в чередующемся порядке. Порядок чередования стабилизирующих модификаций на смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и порядок чередования стабилизирующих модификаций на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно порядка чередования стабилизирующих модификаций на антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, стабилизирующая модификация в антисмысловой цепи может присутствовать в любом положении. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 14 и 16 с 5'-конца.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну стабилизирующую модификацию, смежную с дестабилизирующей модификацией. Например, стабилизирующая модификация может представлять собой нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит стабилизирующую модификацию на каждом из 5'-конца и 3'-конца дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две стабилизирующие модификации на 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, стабилизирующая модификация в смысловой цепи может присутствовать в любом положении. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 10 и 11 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 9, 10 и 11 с 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым другим вариантам реализации смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех стабилизирующих модификаций.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь не содержит стабилизирующей модификации в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

Примерные термически стабилизирующие модификации включают, но не ограничиваются перечисленными, 2'-фтор-модификации. Другие термически стабилизирующие модификации включают, но не ограничиваются перечисленными, LNA.

Согласно некоторым вариантам реализации дцРНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере четыре (например, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничений, все 2'-фторнуклеотиды могут присутствовать в одной цепи. Согласно некоторым вариантам реализации как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь содержат по меньшей мере два 2'-фторнуклеотида. 2'-фтор-модификация может возникать на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, 2'-фтор-модификация может возникать на каждом нуклеотиде в смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая 2'-фтор-модификация может возникать в чередующемся порядке на смысловой цепи или антисмысловой цепи; либо смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат 2'-фтор-модификации в чередующемся порядке. Порядок чередования 2'-фтор-модификаций на смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и порядок чередования 2'-фтор-модификаций на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно порядка чередования 2'-фтор-модификаций на антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или

более) 2'-фторнуклеотида. Без ограничений, 2'-фтор-модификация в антисмысловой цепи может присутствовать в любом положении. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 14 и 16 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 с 5'-конца.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один 2'-фторнуклеотид, смежный с дестабилизирующей модификацией. Например, 2'-фторнуклеотид может представлять собой нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотид на каждом из 5'-конца и 3'-конца дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит по меньшей мере два 2'-фторнуклеотида на 3'-конце дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотида. Без ограничений, 2'-фтор-модификация в смысловой цепи может присутствовать в любом положении. Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 10 и 11 с 5'-конца. Согласно некоторым другим вариантам реализации смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 9, 10 и 11 с 5'-конца. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым другим вариантам реализации смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, считая от 5'-конца антисмысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех 2'-фторнуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь не содержит 2'-фторнуклеотида в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида (нт.) и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов (нт.), причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, при этом по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид возникает в затравочной области

антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), при этом один конец дцРНК является тупым, в то время как другой конец содержит липкий конец из 2 нуклеотидов, и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. Предпочтительно 2-нуклеотидный липкий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловые цепи, причем: указанная смысловая цепь имеет длину 25-30 нуклеотидных остатков, при этом, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 указанной смысловой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; указанная антисмысловая цепь имеет длину 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи, образуют дуплекс; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью с образованием тем самым 3'-одноцепочечного липкого конца из 1-6 нуклеотидов; при этом указанный 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, с образованием тем самым одноцепочечного 5'-липкого конца из 10-30 нуклеотидов; при этом по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи спарены с нуклеотидами антисмысловой цепи, если смысловая и антисмысловая цепи выравнены для обеспечения максимальной комплементарности, с образованием тем самым по существу дуплексной области между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является в достаточной степени комплементарной целевой РНК вдоль по меньшей мере 19 рибонуклеотидов по длине антисмысловой цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, при этом по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи). Например, термически дестабилизирующий нуклеотид возникает между положениями, противоположными или комплементарными положениям 14-17 5'-конца смысловой цепи, и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь

содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК содержит дуплексную область из 12-30 нуклеотидных пар в длину.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, причем указанная молекула дцРНК содержит смысловую цепь, имеющую длину, которая составляет по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и антисмысловую цепь, имеющую длину, которая составляет не более 30 нуклеотидов, при этом указанная смысловая цепь содержит модифицированный нуклеотид, который восприимчив к ферментативной деградации, в положении 11 с 5'-конца, при этом 3'-конец указанной смысловой цепи и 5'-конец указанной антисмысловой цепи образуют тупой конец, и указанная антисмысловая цепь длиннее на 1-4 нуклеотида на своем 3'-конце, чем смысловая цепь, при этом длина дуплексной области составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов, и указанная антисмысловая цепь является достаточно комплементарной целевой мРНК вдоль по меньшей мере 19 нуклеотидов по длине указанной антисмысловой цепи для снижения экспрессии целевого гена при введении указанной молекулы дцРНК в клетку млекопитающего, и при этом расщепление Dicer указанной дцРНК преимущественно приводит к образованию киРНК, содержащей указанный 3'-конец указанной антисмысловой цепи, что снижает экспрессию целевого гена у млекопитающего, при этом указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид, при этом указанный по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК имеет дуплексную область из 12-29 нуклеотидных пар в длину.

Согласно некоторым вариантам реализации каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи молекулы дцРНК может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одинаковой или разной модификацией, которая может включать одно или более изменений одного или обоих несвязывающих кислородов фосфата или одного или более связывающих кислородов фосфата; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила на рибозном сахаре; полную замену фосфатного

фрагмента «дефосфо»-линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания; и замену или модификацию остова рибоза-фосфат.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, многие из модификаций возникают в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например, модификация основания или фосфатного фрагмента, или несвязывающего О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет возникать во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не возникнет. В качестве примера модификация может возникать только в 3'- или 5'-концевом положении, может возникать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может возникать в двухцепочечной области, в одноцепочечной области или в обеих областях. Модификация может возникать только в двухцепочечной области РНК или может возникать только в одноцепочечной области РНК. Например, фосфотиоатная модификация в положении несвязывающего О может возникать только на одном или на обоих концах, может возникать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи, или может возникать в двухцепочечной и одноцепочечной областях, в частности, на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Можно, например, повысить стабильность, включить конкретные основания в липкие концы или включать модифицированные нуклеотиды или суррогаты нуклеотидов в одноцепочечные липкие концы, например, в 5'- или 3'-липкий конец или в оба конца. Например, может быть желательным включение пуриновых нуклеотидов в липкие концы. Согласно некоторым вариантам реализации все или некоторые основания в 3'- или 5'-липком конце могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении сахара рибозы с модификациями, известными в данной области техники, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных, вместо рибозного сахара нуклеинового основания, и модификаций в фосфатной группе, например, фосфотиоатных модификаций. Липкие концы не обязательно должны быть гомологичны целевой последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил, 2'-О-метил, 2'-О-аллил, 2'-С-аллил, 2'-дезоксидезокси или 2'-фтор. Цепи могут содержать более одной модификации. Согласно некоторым вариантам реализации каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием 2'-О-метил или 2'-фтор. Следует понимать, что эти модификации дополняют по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, присутствующую в антисмысловой цепи.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют на смысловой цепи и антисмысловой цепи. Эти две модификации могут представлять собой

2'-дезоксиде, 2'-О-метил или 2'-фтор-модификации, ациклические нуклеотиды или другие. Согласно некоторым вариантам реализации каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь содержит два по-разному модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-О-метил или 2'-дезоксиде. Согласно некоторым вариантам реализации каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован с использованием 2'-О-метилнуклеотида, 2'-дезоксинуклеотида, 2'-дезоксиде-2'-фторнуклеотида, 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NMA)-нуклеотида, 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил (2'-О-DMAEOE)-нуклеотида, 2'-О-аминопропил (2'-О-AP)-нуклеотида или 2'-ара-F-нуклеотида. Как уже упоминалось, следует понимать, что эти модификации дополняют по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, присутствующую в антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит модификации в чередующемся порядке, в частности, в областях В1, В2, В3, В1', В2', В3', В4'. Термин «чередующийся мотив» или «чередующийся порядок» в контексте настоящего документа относится к мотиву, имеющему одну или более модификаций, при этом каждая модификация возникает на чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному из каждого второго нуклеотида или к одному из каждых трех нуклеотидов или к подобному порядку. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВАААВАААВ...», «АААВВВАААВВВ...» или «АВСАВСАВСАВС...», и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации на нуклеотиде, то порядок чередования, т. е. модификации на каждом втором нуклеотиде могут быть одинаковыми, но каждая из смысловой цепи или антисмысловой цепи может быть выбрана из нескольких возможностей модификаций в пределах чередующегося мотива, такого как «АВАВАВ...», «АСАСАС...», «ВДВДВД...» или «СДСДСД...», и т. д.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению имеет сдвиг профиля модификации для чередующегося мотива на смысловой цепи относительно профиля модификации для чередующегося мотива на антисмысловой цепи. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует по-иному модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, при спаривании смысловой цепи с антисмысловой цепью в дуплексе дцРНК чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВАВАВА» с 3'-5' цепи в пределах дуплексной области. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ААВВААВВ» с 5'-3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВВААВВАА» с 3'-5' цепи в пределах дуплексной

области так, что существует полный или частичный сдвиг профилей модификаций между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, где каждый А представляет собой немодифицированный рибонуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В другом конкретном примере чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» с 3'-5'-цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» с 3'-5' цепи, где каждый А представляет собой немодифицированный рибонуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

В одном конкретном примере чередующийся мотив в смысловой цепи представляет собой «АВАВАВ» с 5'-3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи представляет собой «ВАВАВА» с 3'-5' цепи, где каждый А представляет собой 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, и каждый В представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид.

Молекула дцРНК согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфотиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может возникать на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или на обеих цепях в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может возникать на каждом нуклеотиде в смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может возникать в чередующемся порядке на смысловой цепи или антисмысловой цепи; либо смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат модификации межнуклеотидных связей в чередующемся порядке. Порядок чередования модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и порядок чередования модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может иметь сдвиг относительно порядка чередования модификации межнуклеотидной связи на антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК содержит фосфотиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в области

липкого конца. Например, область липкого конца содержит два нуклеотида, имеющих фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Также могут быть выполнены модификации межнуклеотидных связей для связывания нуклеотидов липких концов с концевыми спаренными нуклеотидами в пределах дуплексной области. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды липкого конца могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и необязательно могут существовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие нуклеотид липкого конца со спаренным нуклеотидом, который находится рядом с нуклеотидом липкого конца. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут существовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, в которых два из трех нуклеотидов являются нуклеотидами липкого конца и третий представляет собой спаренный нуклеотид рядом с нуклеотидом липкого конца. Предпочтительно, указанные три концевых нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь молекулы дцРНК содержит 1-10 блоков из двух-десяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из двух фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из трех фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и

фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из четырех фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из шести фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из семи фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из восьми фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных

связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из девяти фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из указанных фосфотиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфотиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфотиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 концевых положений смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи на одном конце или на обоих концах смысловой или антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 нуклеотидов внутренней области дуплекса каждой из смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфотиоатной, метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 8-16 дуплексной области, считая от 5'-конца смысловой цепи; молекула дцРНК может необязательно дополнительно содержать одну или более фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах 1-10 концевых положений.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах положения 1-5 и от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в пределах положения 18-23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и от одной до пяти фосфотиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в пределах положений 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 20 и 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 21 и 22 смысловой цепи (считая от 5'-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 22 и 23 смысловой цепи (считая от 5'-конца) и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфотиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца) и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфотиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 23 и 23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

Согласно некоторым вариантам реализации соединение согласно настоящему изобретению имеет некоторый профиль хиральных центров остова. Согласно некоторым вариантам реализации обычный профиль хиральных центров остова содержит по меньшей мере 5 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. Согласно некоторым вариантам реализации обычный профиль хиральных центров остова содержит по меньшей мере 6

Согласно некоторым вариантам реализации соединение согласно настоящему изобретению содержит блок, представляющий собой стереохимический блок. Согласно некоторым вариантам реализации блок представляет собой блок Rp в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Rp. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок представляет собой блок Rp. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Rp. Согласно некоторым вариантам реализации блок представляет собой блок Sp в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Sp. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок представляет собой блок Sp. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Sp. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные олигонуклеотиды содержат как блоки Rp, так и блоки Sp. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные олигонуклеотиды содержат один или более блоков Rp, но не содержат блоки Sp. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные олигонуклеотиды содержат один или более блоков Sp, но не содержат блоки Rp. Согласно некоторым вариантам реализации предложенные олигонуклеотиды содержат один или более блоков PO, в которых каждая межнуклеотидная связь представляет собой природную фосфатную связь.

Согласно некоторым вариантам реализации соединение согласно настоящему изобретению содержит 5'-блок, представляющий собой блок Sp, в котором каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 5'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждый фрагмент сахара содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок представляет собой блок Sp, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь, и каждый фрагмент сахара содержит 2'-F-модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым

вариантам реализации 3'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. Согласно некоторым вариантам реализации 3'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев.

Согласно некоторым вариантам реализации соединение согласно настоящему изобретению содержит некоторый тип нуклеозида в области или за олигонуклеотидом следует конкретный тип межнуклеотидной связи, например, природная фосфатная связь, модифицированная межнуклеотидная связь, Rp-хиральная межнуклеотидная связь, Sp-хиральная межнуклеотидная связь и т. д. Согласно некоторым вариантам реализации за А следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за А следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за А следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за U следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за U следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за U следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за C следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за C следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за C следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за G следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за G следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за G следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за C и U следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за C и U следует Rp. Согласно некоторым вариантам реализации за C и U следует природная фосфатная связь (PO). Согласно некоторым вариантам реализации за А и G следует Sp. Согласно некоторым вариантам реализации за А и G следует Rp.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, и между нуклеотидными положениями 22 и 23, причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 пар нуклеотидов в длину; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22, и между нуклеотидными положениями 22 и 23, причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса,

расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 пар нуклеотидов в длину; (vii) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 пар нуклеотидов в длину; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vii) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 пар нуклеотидов в длину; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3, антисмысловая цепь содержит фосфотиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23, причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и при этом указанная дцРНК необязательно дополнительно имеет по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфотиоатных межнуклеотидных связей; (v) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; (vi) дцРНК содержит дуплексную область из 12-40 пар нуклеотидов в длину; и (vii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит несовпадение(я) с мишенью, в пределах дуплекса или их комбинации. Несовпадение может возникать в области липкого конца или в дуплексной области. Пару оснований можно ранжировать на основании ее склонности способствовать диссоциации или плавлению (например, на основании свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самый простой подход заключается в изучении пар на основе отдельной пары, хотя также можно использовать анализ следующей соседней пары или сходный анализ). С точки зрения содействия диссоциации: А:U предпочтительнее, чем G:C; G:U предпочтительнее, чем G:C; и I:C предпочтительнее, чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические пары или отличные от канонических пары (как описано в другом месте в настоящем документе) являются предпочтительными по сравнению с каноническими (А:Т, А:U, G:C) парами; и пары, которые включают универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническими парами.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в пределах дуплексных областей с 5'-конца антисмысловой цепи, которая может быть независимо выбрана из группы: А:U, G:U, I:C, и несовпадающие пары, например, неканонические пары или отличные от канонических пары или пары, которые включают универсальное основание, чтобы способствовать диссоциации антисмысловой цепи, на 5'-конце дуплекса.

Согласно некоторым вариантам реализации нуклеотид в положении 1 в пределах дуплексной области с 5'-конца в антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из А, dА, dU, U и dТ. В качестве альтернативы, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в пределах дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

Было обнаружено, что введение 4'-модифицированного или 5'-модифицированного нуклеотида на 3'-конце фосфодифирной (PO), фосфотиоатной (PS) или фосфодитиоатной (PS2) связи динуклеотида в любом положении одноцепочечного или двухцепочечного олигонуклеотида может оказывать стерический эффект на межнуклеотидную связь и, следовательно, защищать или стабилизировать ее против нуклеаз.

Согласно некоторым вариантам реализации 5'-модифицированный нуклеозид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кРНК. Например, 5'-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кРНК. Алкильная группа в 5'-положении рибозного сахара может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации 4'-модифицированный нуклеозид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кДНК. Например, 4'-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кДНК. Алкильная группа в 4'-положении рибозного сахара может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер. В качестве альтернативы 4'-*O*-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной кДНК. 4'-*O*-алкил рибозного сахара может представлять собой рацемат или хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации 5'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцДНК, и такая модификация поддерживает или повышает активность дцДНК. 5'-алкил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации 4'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцДНК, и такая модификация поддерживает или повышает активность дцДНК. 4'-алкил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации 4'-*O*-алкилированный нуклеозид вводят в любом положении на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцДНК, и такая модификация поддерживает или повышает активность дцДНК. 5'-алкил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер. Примерный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может представлять собой либо рацемат, либо хирально чистый *R* или *S*-изомер.

Согласно некоторым вариантам реализации молекула дцДНК согласно настоящему изобретению может содержать 2'-5'-связи (с 2'-H, 2'-ОН и 2'-ОМе и с Р=О или Р=S). Например, модификации 2'-5'-связей можно применять, чтобы способствовать устойчивости к нуклеазе или ингибировать связывание смысловой цепи с антисмысловой цепью или можно применять на 5'-конце смысловой цепи для предотвращения активации смысловой цепи под действием RISC.

Согласно другому варианту реализации молекула дцДНК согласно настоящему изобретению может содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-H, 2'-ОН и 2'-ОМе). Например, эти модификации L-сахаров можно применять, чтобы способствовать

устойчивости к нуклеазе или ингибировать связывание смысловой цепи с антисмысловой цепью, или можно применять на 5'-конце смысловой цепи для предотвращения активации смысловой цепи под действием RISC.

В различных публикациях описана мультимерная кРНК, которую всю можно применять с дцРНК согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, US 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, которые полностью включены в настоящий документ.

Как более подробно описано ниже, агент РНКи, который содержит конъюгаты одного или более углеводных фрагментов с агентом РНКи, может оптимизировать одно или более свойств агента РНКи. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице агента РНКи. Например, рибозный сахар одной или более рибонуклеотидных субъединиц агента на основе дцРНК может быть заменен другим фрагментом, например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называется в настоящем документе модифицированной субъединицей с заменой рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы кольца представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или более атомов кольца могут представлять собой гетероатом, например, азот, кислород, серу. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или более колец, например, конденсированные кольца. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему, или он может содержать одну или более двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. 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». «Точка присоединения к остову» в контексте настоящего документа относится к функциональной группе рибонуклеиновой кислоты, например, гидроксильной группе, или обычно к связи, доступной и подходящей для включения носителя в остов, например, фосфатный или модифицированный фосфатный, например, содержащий серу, остов. «Связывающая точка присоединения» (TAP) в некоторых вариантах реализации относится к составному атому кольца циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), который соединяет выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранный фрагмент соединен посредством промежуточной связи с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или обычно обеспечивает связь, которая подходит для

включения или связывания другого химического соединения, например, лиганда с составным кольцом.

Агенты РНКи могут быть конъюгированы с лигандом посредством носителя, причем указанный носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; 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 сериного остова или диэтаноламинового остова.

Согласно определенным конкретным вариантам реализации агент РНКи для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой агент, выбранный из группы агентов, перечисленных в любой из Таблиц 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10А, 10В, 10С, 10D, 11 и 12. Указанные агенты могут дополнительно содержать лиганд.

IV. иРНК, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК в случае иРНК согласно настоящему изобретению включает химическое связывание иРНК с одним или более лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение указанной иРНК, например, в клетку. Такие фрагменты включают, но не ограничиваются перечисленными, липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (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), простой тиоэфир, например, берил-S-третилтиол (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, додекандиоловые или ундециловые остатки (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, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 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 адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитильный фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилкоксихолестерина (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

Согласно определенным вариантам реализации лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни агента иРНК, в которого он включен. Согласно некоторым вариантам реализации лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, клеточного или органного компартмента, ткани, органа или участка тела, по

сравнению, например, с соединением, не имеющим такого лиганда. Типичные лиганды не будут участвовать в дуплексном спаривании в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту); или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическую полиаминокислоту. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли-L-лактида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли-2-этилакриловую кислоту, полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примерные полиамины включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический полиамин, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или α -спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, нацеливающий на клетки или ткани агент, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, который связывается с указанным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD. Согласно определенным вариантам реализации лиганд представляет собой поливалентную галактозу, например, N-ацетилгалактозамин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), сшивающие линкеры (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, ЭДТА), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, пирен-1-масляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексилловую группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)лихолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил, или феноксазин) и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, пептид Tat), алкилирующие агенты, фосфат, амино, меркапто, PEG (например,

PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоактивной меткой маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), усилители транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридина и имидазола, комплексы Eu³⁺ тетраазамакроциклов), динитрофенил, ПХ или ЩФ.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины или пептиды, например, молекулы, обладающие специфичной аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с указанным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор киназы p38 MAP или активатор NF- κ B.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение агента иРНК в клетку, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов или промежуточных филаментов клетки. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин или миосервин.

Согласно некоторым вариантам реализации лиганд, присоединенный к иРНК, описанной в настоящем документе, действует в качестве модулятора фармакокинетики (модулятора ФК). Модуляторы ФК включают липофильные соединения, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, связывающие белки агенты, PEG, витамины и т. д. Примерные модуляторы ФК включают, но не ограничиваются перечисленными, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т. д. Известно, что олигонуклеотиды, которые содержат ряд фосфотиоатных связей, также связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды, состоящие из примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько фосфотиоатных связей в остове, также приемлемы для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, в качестве ФК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связывают сывороточные компоненты (например, сывороточные белки), также подходят для применения в качестве ФК-модулирующих лигандов в вариантах реализации, описанных в настоящем документе.

Конъюгированные с лигандами иРНК согласно настоящему изобретению можно синтезировать с использованием олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, например, полученную в результате

присоединения связывающей молекулы на олигонуклеотид (описано ниже). Указанный реактивный олигонуклеотид может быть подвергнут непосредственной реакции с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируются как несущие любую из множества защитных групп, или лигандами, которые имеют присоединенный к ним связывающий фрагмент.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах согласно настоящему изобретению, могут быть получены удобным и рутинным образом с помощью хорошо известной методики твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems® (Фостер-Сити, Калифорния). Для такого синтеза можно дополнительно или альтернативно использовать любые другие средства, известные в данной области техники. Также известно, что подобные методики применяют для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандом олигонуклеотидах и несущих молекулу лиганда специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидов согласно настоящему изобретению олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с использованием стандартных нуклеотидных или нуклеозидных предшественников, или нуклеотидных или нуклеозидных конъюгированных предшественников, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотид или нуклеозид-конъюгат, которые уже несут молекулу лиганда, или ненуклеозидных несущих лиганд строительных блоков.

При использовании предшественников нуклеотид-конъюгат, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез специфичных в отношении последовательности связанных нуклеозидов, как правило, завершают, а затем проводят реакцию молекулы лиганда со связывающим фрагментом с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации олигонуклеотида или связанные нуклеозиды согласно настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые являются коммерчески доступными и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

А. Липидные конъюгаты

Согласно определенным вариантам реализации лиганд или конъюгат представляет собой липид или основанную на липиде молекулу. Такой липид или основанная на липиде молекула, как правило, может связывать сывороточный белок, такой как сывороточный альбумин человека (HSA). Связывающий HSA лиганд обеспечивает возможность распределения конъюгата в целевую ткань, например, в отличную от почки целевую ткань организма. Например, целевая ткань может представлять собой печень, включая паренхимальные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связываться с HSA, также можно применять в качестве лигандов. Например, можно применять напроксен или

аспирин. Липид или основанный на липиде лиганд может (a) повышать устойчивость к деградации конъюгата, (b) увеличивать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану, или (c) может применяться для корректировки связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для модулирования, например, контроля (например, ингибирования) связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липид или лиганд на основе липида, который сильнее связывается с HSA, будет менее вероятно нацелен на почку и, следовательно, менее вероятно, будет выведен из организма. Липид или лиганд на основе липида, который менее сильно связывается с HSA, можно применять для нацеливания конъюгата на почку.

Согласно определенным вариантам реализации лиганд на основе липида связывает HSA. Например, лиганд может связывать HSA с достаточной аффинностью так, что распределение конъюгата в ткани, отличной от ткани почки, повышается. Однако аффинность, как правило, не настолько сильна, что связывание HSA и лиганда не может быть обращено.

Согласно определенным вариантам реализации лиганд на основе липида слабо связывается с HSA или совсем не связывается так, что повышается распределение конъюгата в почку. Другие фрагменты, которые нацелены в клетки почки, также можно применять вместо лиганда на основе липида или в дополнение к нему.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается целевой клеткой, например, пролиферирующей клеткой. Они особенно применимы для лечения расстройств, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, раковых клеток. Примерные витамины включают витамины А, Е и К. Другие примерные витамины включают витамин В, например, фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

В. Агенты для проникновения в клетки

В другом аспекте лиганд представляет собой агент для проникновения в клетку, такой как спиральный агент для проникновения в клетку. Согласно определенным вариантам реализации агент является амфипатическим. Примерный агент представляет собой пептид, такой как tat или antennopedia. Если агент представляет собой пептид, он может быть модифицирован, включая пептидилмиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральный агент, как правило, представляет собой α -спиральный агент и может иметь липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем документе олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, сходную с природным пептидом. Присоединение пептида и пептидомиметиков к агентам иРНК может влиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, посредством усиления

распознавания и всасывания клетками. Пептид или фрагмент пептидомиметика может иметь примерно 5-50 аминокислот в длину, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид для проникновения в клетки, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tyr, Trp или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой дендримерный пептид, ограниченный пептид или сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность мембранной транслокации (MTS). Примерный гидрофобный MTS-содержащий пептид представляет собой RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: _). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: _)), содержащий гидрофобную MTS, также может представлять собой нацеливающий фрагмент. Пептидный фрагмент может представлять собой пептид для «доставки», который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: _)) и белка *Antennapedia* дрозофил (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: _)) способны функционировать в качестве пептидов для доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки «одна гранула-одно соединение» (ОВОС) (Lam *et al.*, *Nature*, 354:82-84, 1991). Как правило, пептид или пептидомиметик, присоединенный к агенту на основе дцПНК посредством включенного мономерного звена, представляет собой нацеливающий на клетку пептид, такой как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Длина пептидного фрагмента может находиться в диапазоне от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, например, для повышения стабильности или направления конформационных свойств. Можно применять любую из структурных модификаций, описанных ниже.

Пептид RGD для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован, чтобы облегчить нацеливание на конкретную ткань(и). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрина. Предпочтительные конъюгаты данного лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

Пептидный фрагмент RGD можно применять для нацеливания на конкретный тип клеток, например, опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или опухолевая клетка рака молочной железы (Zitzmann *et al.*, *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Пептид RGD может способствовать нацеливанию агента на основе дцПНК на опухоли из

ряда других тканей, включая легкое, почку, селезенку или печень (Aoki *et al.*, *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Как правило, пептид RGD будет способствовать нацеливанию агента иРНК на почку. Пептид RGD может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован, чтобы способствовать нацеливанию на конкретные ткани. Например, гликозилированный пептид RGD может доставлять агент иРНК к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha_v\beta_3$ (Haubner *et al.*, *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001).

«Пептид для проникновения в клетку» способен проникать в клетку, например, в микробную клетку, такую как бактериальная или грибковая клетка, или в клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Проникающий в микробную клетку пептид может представлять собой, например, α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Secorin P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефензин, β -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид для проникновения в клетку также может включать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид для проникновения в клетку может представлять собой двусоставной амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена пептида слияния gp41 ВИЧ-1 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 31:2717-2724, 2003).

С. Конъюгаты углеводов

Согласно некоторым вариантам реализации композиций и способов согласно настоящему изобретению иРНК дополнительно содержит углеводов. Конъюгированные с углеводов иРНК являются предпочтительными для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, описанных в настоящем документе. В настоящем документе «углевод» относится к соединению, которое представляет собой либо углеводов как таковой, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, содержащих по меньшей мере 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; либо соединение, имеющее в качестве своей части углеводовный фрагмент, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, каждое из которых содержит по меньшей мере шесть атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара, содержащие два или три моносахаридных звена (например, C5, C6, C7 или C8).

Согласно определенным вариантам реализации углеводовный конъюгат содержит моносахарид.

Согласно определенным вариантам реализации моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Конъюгаты GalNAc, которые содержат одно или более производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), описаны, например, в US 8106022, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc служит в качестве лиганда, который нацеливает иРНК на конкретные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc нацеливает иРНК на клетки печени, например, играя роль лиганда для асиалогликопротеинового рецептора клеток печени (например, гепатоцитов).

Согласно некоторым вариантам реализации углеводный конъюгат содержит одно или более производных GalNAc. Производные GalNAc могут быть присоединены посредством линкера, например, двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с агентом иРНК (например, с 3'-концом смысловой цепи) посредством линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи. Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc конъюгирован с агентом иРНК (например, с 5'-концом смысловой цепи) посредством линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством четырехвалентного линкера.

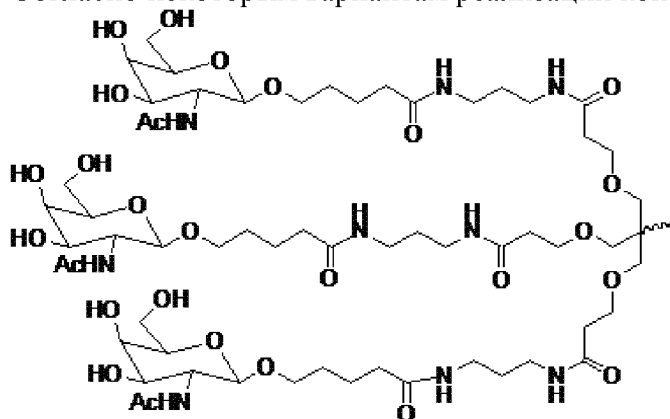
Согласно определенным вариантам реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенное к агенту иРНК. Согласно определенным вариантам реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного агента РНКи посредством множества одновалентных линкеров.

Согласно некоторым вариантам реализации, например, если две цепи агента иРНК согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество

неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера. Петля шпильки также может быть образована удлинённым липким концом в одной цепи дуплекса.

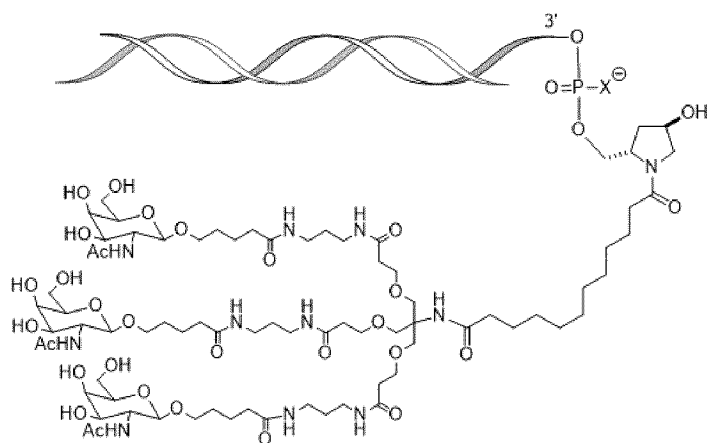
Согласно некоторым вариантам реализации, например, если две цепи агента иРНК согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера. Петля шпильки также может быть образована удлинённым липким концом в одной цепи дуплекса.

Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат GalNAc представляет собой

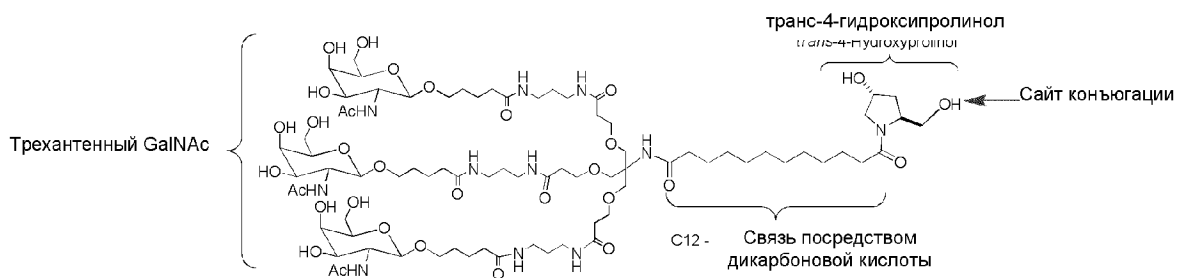


Формула II.

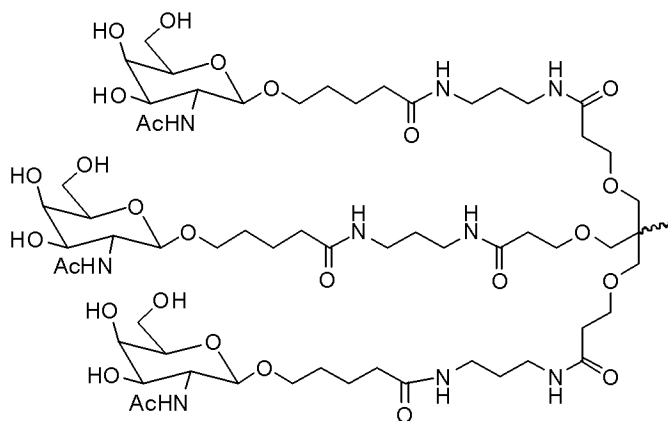
Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи присоединен к углеводному конъюгату посредством линкера, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S



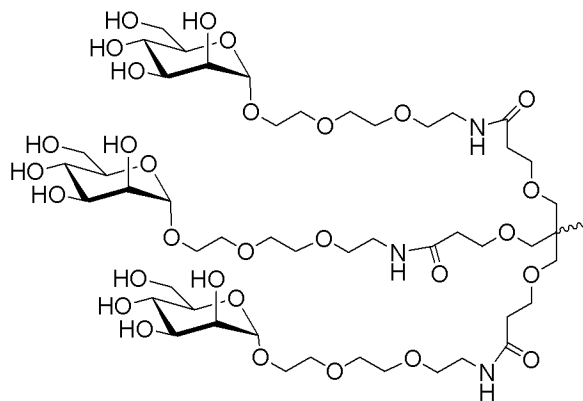
Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи конъюгирован с L96, как определено в Таблице 1 и показано ниже:



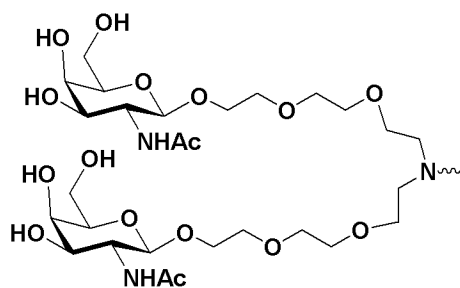
Согласно определенным вариантам реализации углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



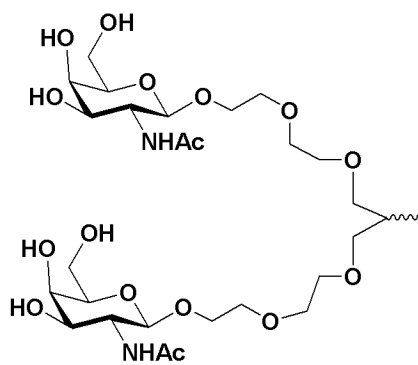
Формула II,



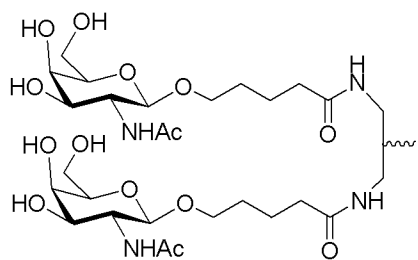
Формула III,



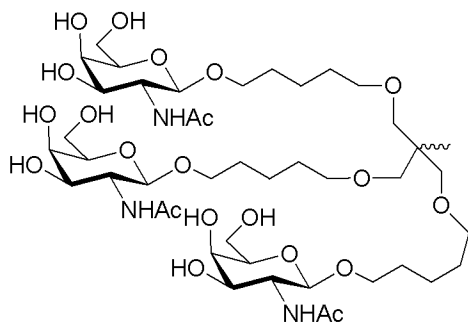
Формула IV,



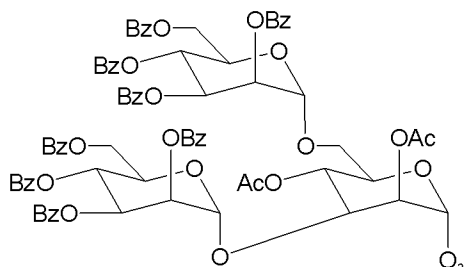
Формула V,



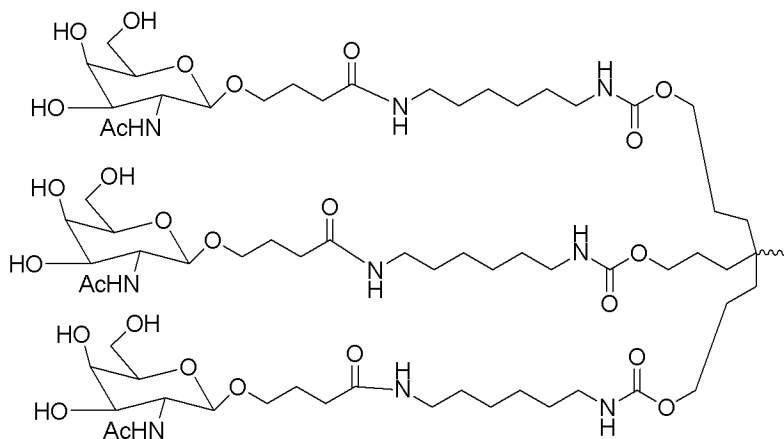
Формула VI,



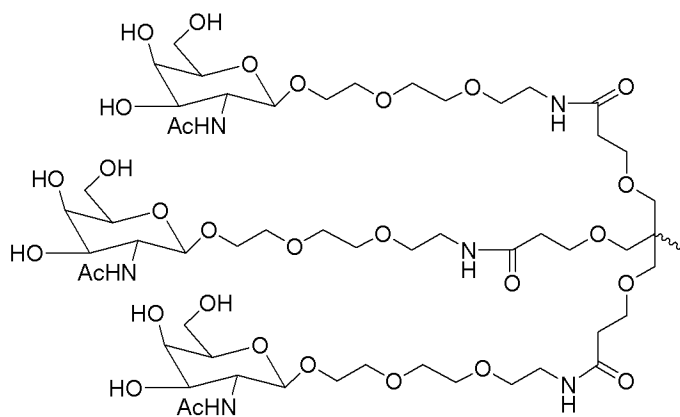
Формула VII,



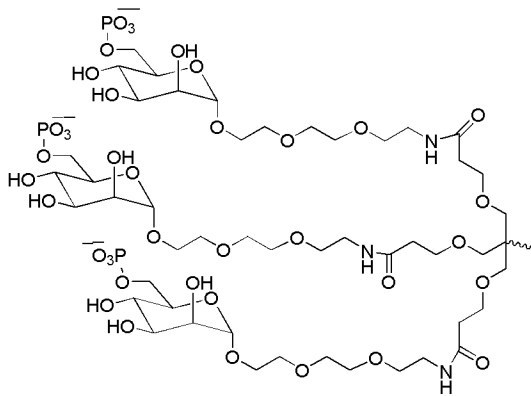
Формула VIII,



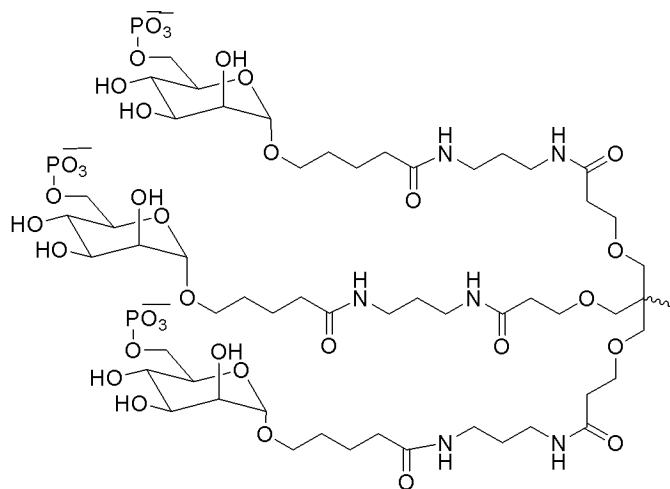
Формула IX,



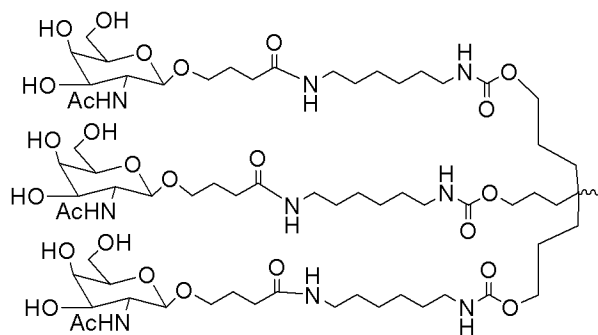
Формула X,



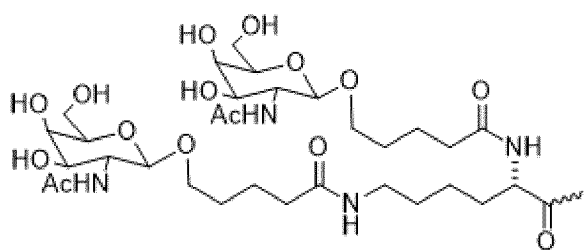
Формула XI,



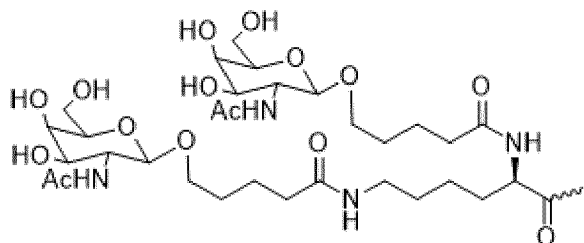
Формула XII,



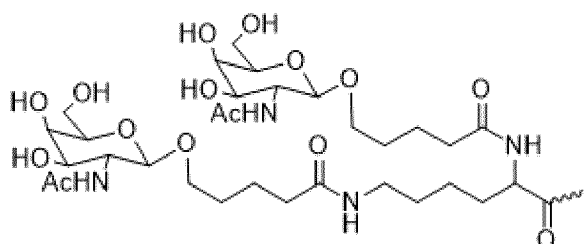
Формула XIII,



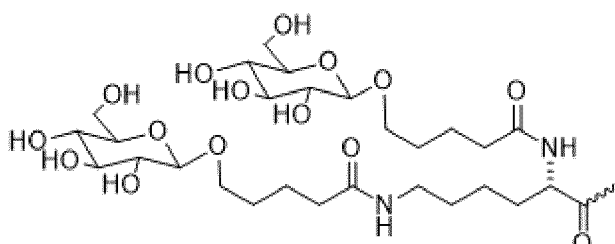
Формула XIV,



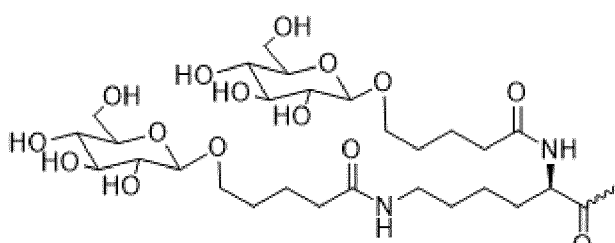
Формула XV,



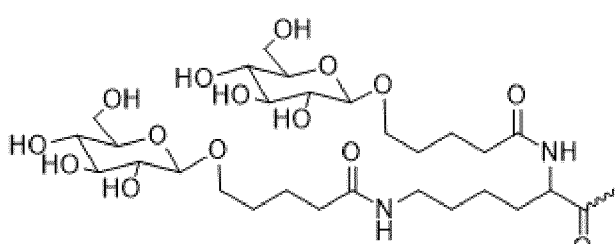
Формула XVI,



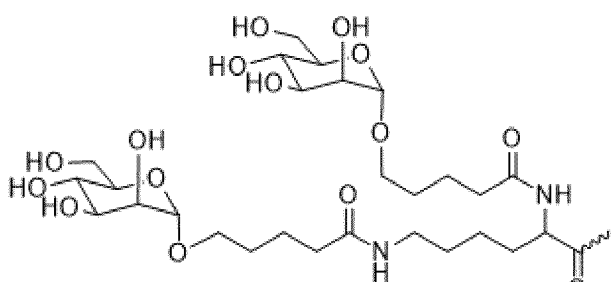
Формула XVII,



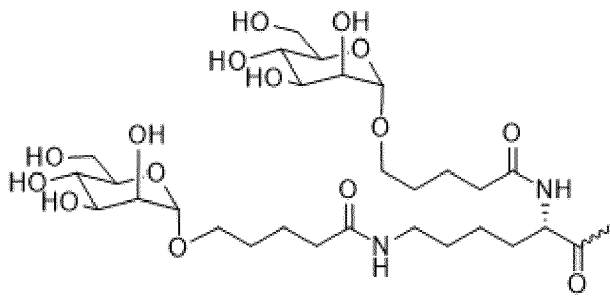
Формула XVIII,



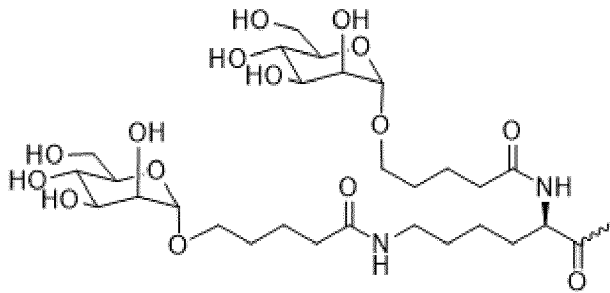
Формула XIX,



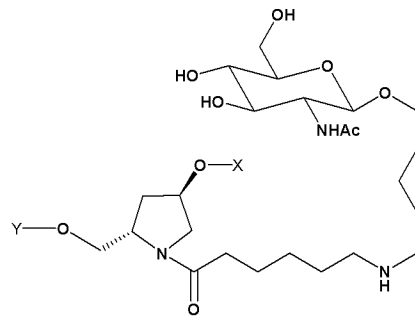
Формула XX,



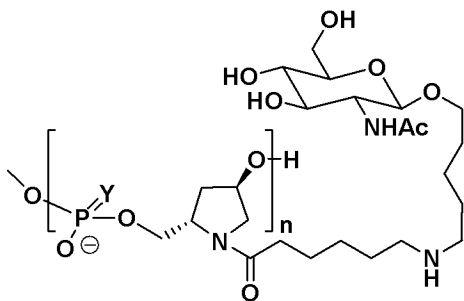
Формула XXI,



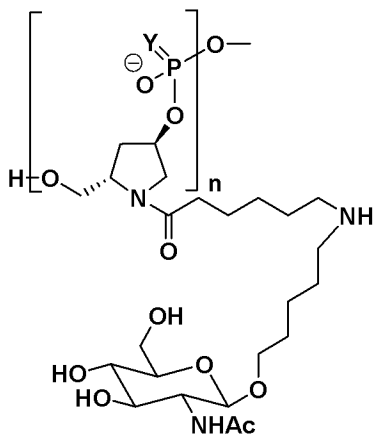
Формула XXII,



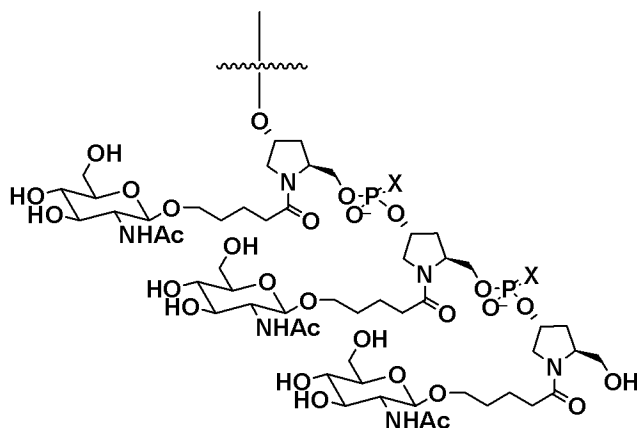
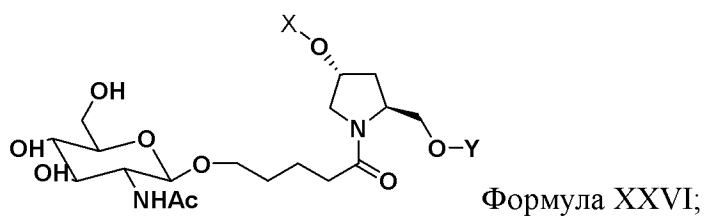
Формула XXIII;



, где Y представляет собой O или S, и n представляет собой 3-6 (Формула XXIV);

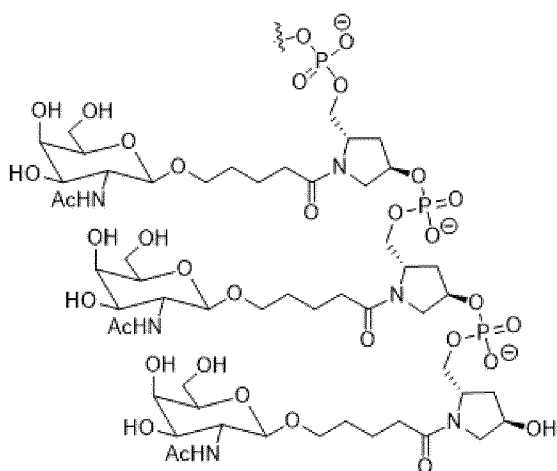
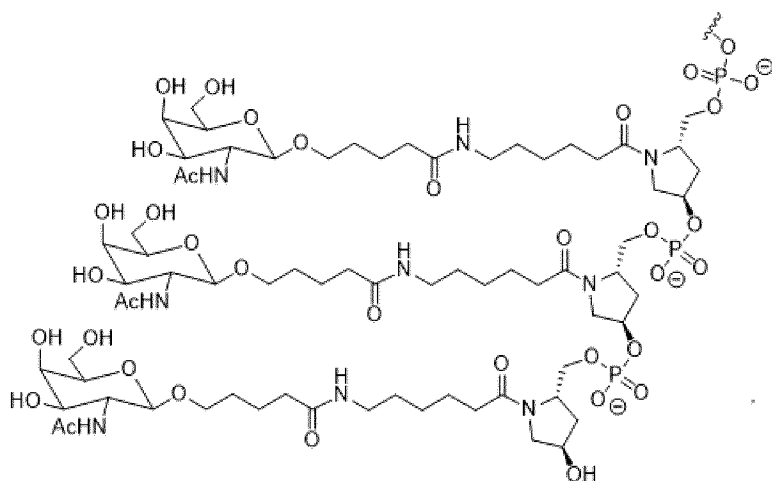


, где Y представляет собой O или S, и n представляет собой 3-6 (Формула XXV);

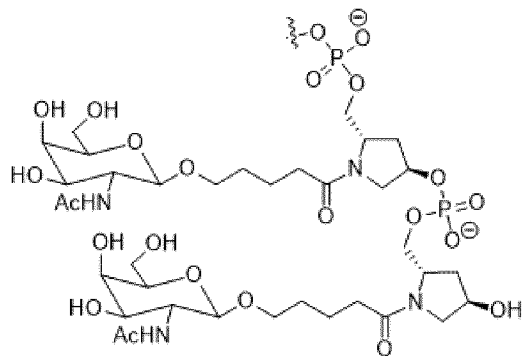
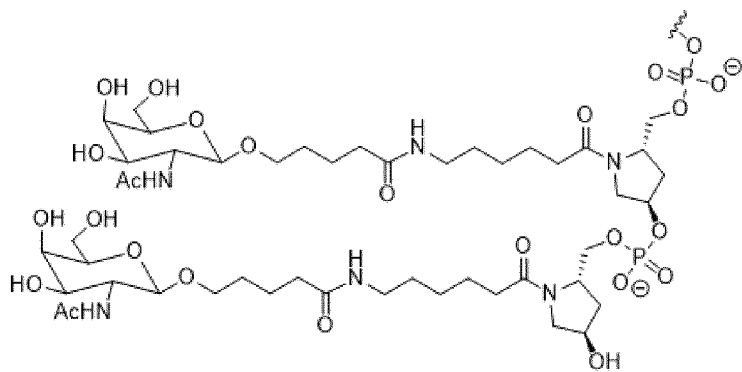


, где X представляет собой O

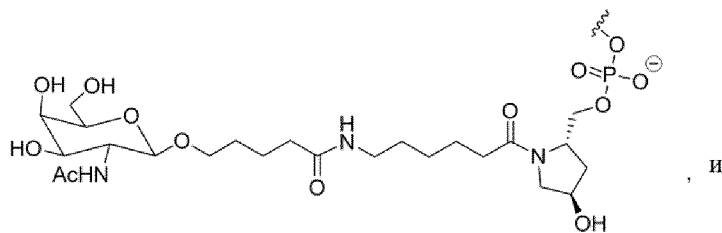
или S (Формула XXVII);



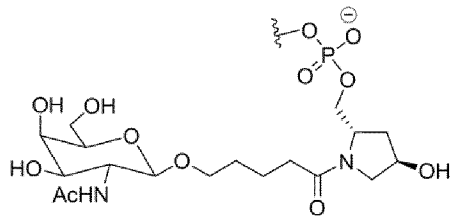
Формула XXVII; Формула XXIX;



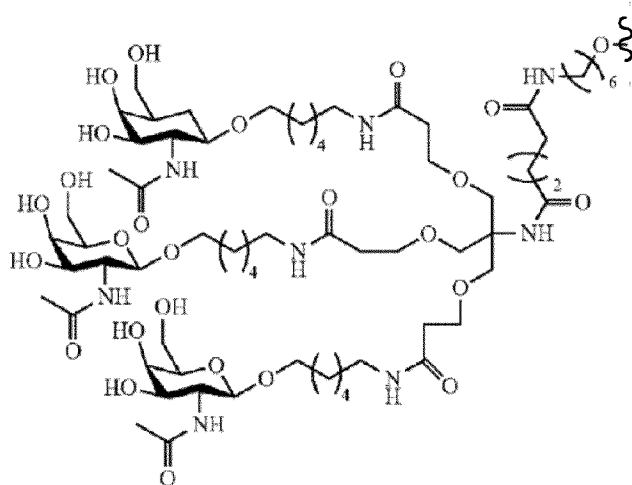
Формула XXX; Формула XXXI;



и

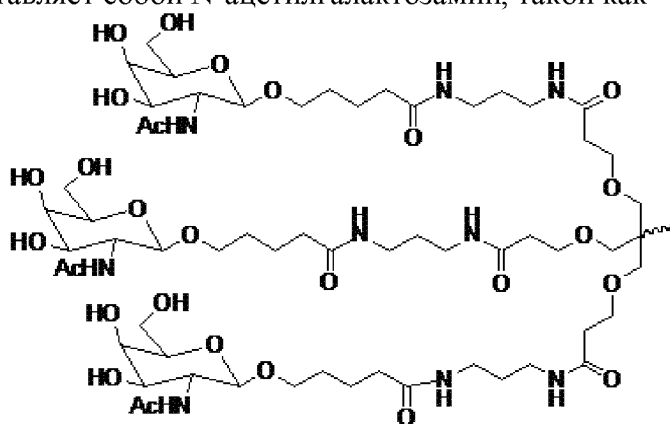


Формула XXXII; Формула XXXIII.



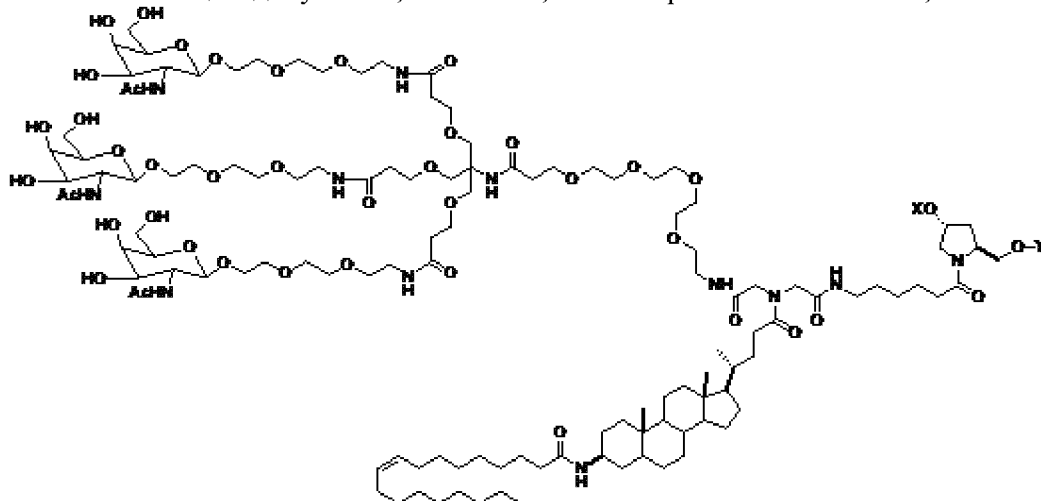
Формула XXXIV.

Согласно определенным вариантам реализации углеводный конъюгат для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению представляет собой моносахарид. Согласно определенным вариантам реализации моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как



Формула II.

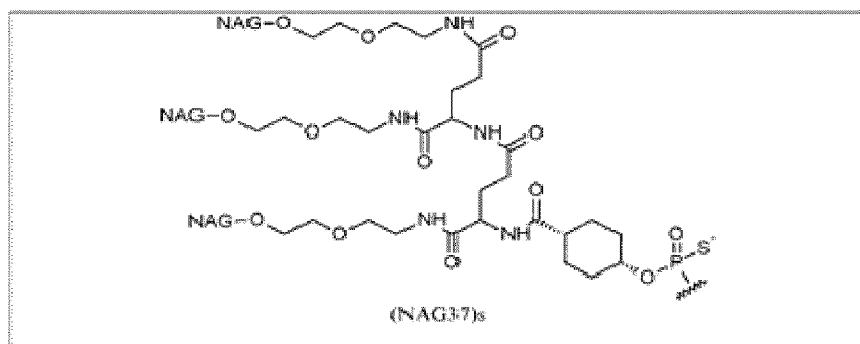
Другой типичный углеводный конъюгат для применения в вариантах реализации, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается этим,



(Формула XXXVI),

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

Согласно некоторым вариантам реализации подходящий лиганд представляет собой лиганд, раскрытый в WO 2019/055633, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно одному варианту реализации лиганд содержит структуру, представленную ниже:



Согласно определенным вариантам реализации агенты РНКи согласно настоящему изобретению могут включать лиганды GalNAc, даже если в настоящее время предполагается, что такие лиганды GalNAc имеют ограниченное значение для предпочтительного интратекального/ЦНС пути(ей) доставки согласно настоящему изобретению.

Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством одновалентного линкера. Согласно некоторым вариантам реализации GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством двухвалентного линкера. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к агенту иРНК согласно настоящему изобретению посредством трехвалентного линкера.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат один или более GalNAc или производных GalNAc, присоединенных к агенту иРНК. GalNAc может быть присоединен к любому нуклеотиду посредством линкера на смысловой цепи или антисмысловой цепи. GalNAc может быть присоединен к 5'-концу смысловой цепи, 3'-концу смысловой цепи, 5'-концу антисмысловой цепи или 3'-концу антисмысловой цепи. Согласно одному варианту реализации GalNAc присоединен к 3'-концу смысловой цепи, например, посредством трехвалентного линкера.

Согласно другим вариантам реализации двухцепочечные агенты РНКи согласно настоящему изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного агента РНКи посредством множества линкеров, например, одновалентных линкеров.

Согласно некоторым вариантам реализации, например, если две цепи агента иРНК согласно настоящему изобретению являются частью одной более крупной молекулы и соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи с образованием петли шпильки, содержащей множество неспаренных нуклеотидов, каждый неспаренный нуклеотид в петле шпильки может

независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное посредством одновалентного линкера.

Согласно некоторым вариантам реализации углеводный конъюгат дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, описанных выше, таких как, но не ограничиваясь этим, модулятор ФК или пептид для проникновения в клетку.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают те, которые описаны в WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

D. Линкеры

Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат или лиганд, описанный в настоящем документе, может быть присоединен к олигонуклеотиду иРНК с помощью различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин «линкер» или «связывающая группа» означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно соединяет две части соединения. Линкеры, как правило, содержат непосредственную связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепь атомов, таких как, но не ограничиваясь перечисленными, 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, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, в которых один или более метиленов могут быть прерваны или оканчиваются O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероцикл; где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. Согласно определенным вариантам реализации линкер представляет собой примерно 1-24 атома, 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 представляет собой группу, которая является достаточно стабильной за пределами клетки, но которая при попадании в целевую клетку

расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживал вместе. Согласно предпочтительному варианту реализации расщепляемая связывающая группа расщепляется по меньшей мере примерно 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 примерно в 100 раз быстрее в целевой клетке или в первом референсном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или во втором референсном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления условий, обнаруженных в крови или сыворотке крови).

Расщепляемые связывающие группы восприимчивы к расщепляющим агентам, например, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Обычно расщепляющие агенты более распространены или обнаруживаются на более высоких уровнях или более активны внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, например, окисляющие или восстанавливающие ферменты или восстанавливающие агенты, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать расщепляемую в окислительно-восстановительных условиях связывающую группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, например, те, которые приводят к рН, составляющему пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой связывающую группу, действуя в качестве общей кислоты, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчивой к рН. рН сыворотки крови человека составляет 7,4, тогда как средний внутриклеточный рН немного ниже в диапазоне от примерно 7,1 до 7,3. Эндосомы имеют более кислый рН в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более кислый рН примерно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется при предпочтительном рН, что высвобождает катионный липид из лиганда внутри клетки или в желаемый компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую связывающую группу, которая может расщепляться конкретным ферментом. Тип расщепляемой связывающей группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, которая будет мишенью. Например, лиганд, нацеливающий на печень, может быть связан с катионным липидом посредством линкера, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легкого, коры почек и яичек.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно применять при нацеливании на типы клеток, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В целом, пригодность кандидатной расщепляемой связывающей группы можно оценить путем тестирования способности разрушающего агента (или условия) расщеплять кандидатную связывающую группу. Также будет желательным тестирование кандидатной расщепляемой связывающей группы на способность противостоять расщеплению в крови или при контакте с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определить относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым условиями, где первое условие выбрано, как указывающее на расщепление в целевой клетке, а второе условие выбрано, как указывающее на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке. Оценки можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в органной или тканевой культуре или у интактных животных. Может быть полезным проводить первоначальные оценки в бесклеточных или культуральных условиях и подтверждать путем дальнейших оценок у интактных животных. Согласно предпочтительным вариантам реализации пригодные кандидатные соединения расщепляются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

і. Расщепляемые в окислительно-восстановительных условиях связывающие группы

Согласно определенным вариантам реализации расщепляемая связывающая группа представляет собой расщепляемую в окислительно-восстановительных условиях связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой в восстанавливающих условиях связывающей группы является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатная расщепляемая связывающая группа подходящей «расщепляемой в восстанавливающих условиях связывающей группой» или, например, подходит ли она для применения с конкретным фрагментом иРНК и конкретным нацеливающим агентом, можно обратить внимание на способы, описанные в настоящем документе. Например, кандидата можно оценить путем инкубации с дитиотрептолом (ДТТ) или другим восстанавливающим агентом с применением реагентов, известных в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которая будет наблюдаться в клетке, например, целевой клетке. Кандидатов также можно оценивать в условиях, которые выбраны для имитации условий крови или сыворотки. В одном варианте кандидатные соединения расщепляются в крови не более чем примерно на 10%. Согласно другим вариантам реализации пригодные кандидатные соединения разрушаются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий). Скорость расщепления кандидатных соединений можно определить с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Расщепляемые связывающие группы на основе фосфата

Согласно определенным вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе фосфата. Расщепляемая связывающая группа на основе фосфата расщепляется агентами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примеры связывающих групп на основе фосфата представляют собой -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 реализации 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 реализации представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

iii. Расщепляемые кислотой связывающие группы

Согласно определенным вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой связывающую группу. Расщепляемая кислотой связывающая группа представляет собой связывающую группу, которая расщепляется в кислотных условиях. Согласно предпочтительным вариантам реализации расщепляемые кислотой связывающие группы расщепляются в кислой среде с рН примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже), или агентами, такими как ферменты, которые могут действовать в качестве общей кислоты. В клетке специфические органеллы с низким рН, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать среду расщепления для расщепляемых кислотой связывающих групп. Примеры расщепляемых кислотой связывающих групп включают, но не ограничиваются перечисленными, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу -C=NN-, C(O)O или -OC(O). В предпочтительном варианте реализации углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

iv. Расщепляемые связывающие группы на основе сложного эфира

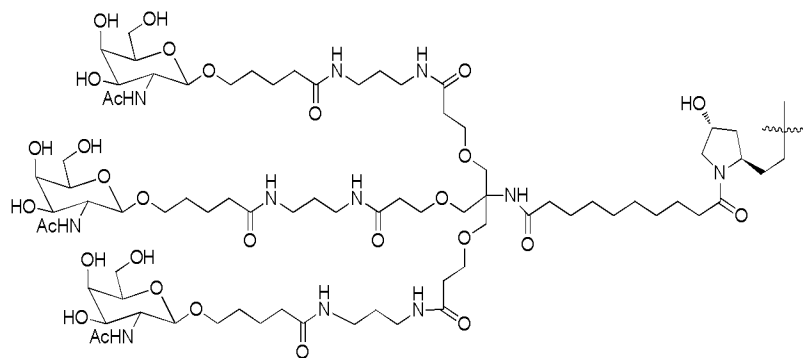
Согласно определенным вариантам реализации расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе сложного эфира. Расщепляемая связывающая группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложного эфира включают, но не ограничиваются перечисленными, сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемые связывающие группы на основе сложного эфира имеют общую формулу -C(O)O- или -OC(O)-. Указанных

кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

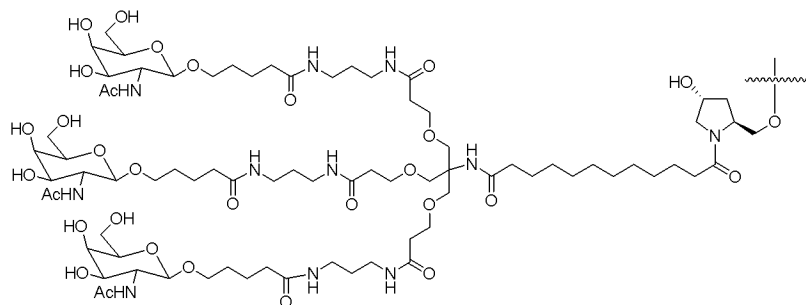
v. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида

Согласно еще одному варианту реализации 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 получением 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 алкинеленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничена пептидной связью (т. е. амидной связью), образованной между аминокислотами с получением пептидов и белков, и не включает полную амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида имеют общую формулу -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)- (SEQ ID NO: __), где RA и RB представляют собой группы R двух смежных аминокислот. Указанных кандидатов можно оценивать с применением способов, аналогичных тем, которые описаны выше.

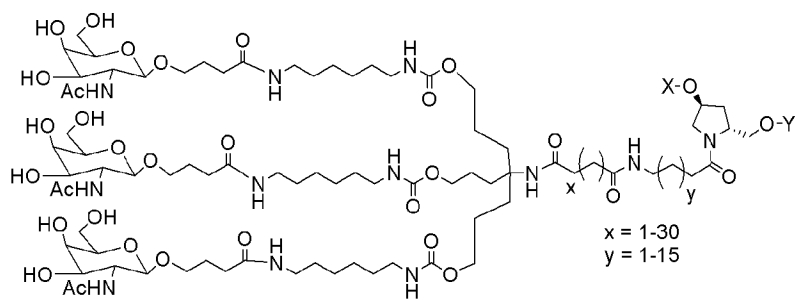
Согласно некоторым вариантам реализации иРНК согласно настоящему изобретению конъюгирована с углеводом посредством линкера. Неограничивающие примеры конъюгатов иРНК-углевод с линкерами композиций и способов согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются перечисленными,



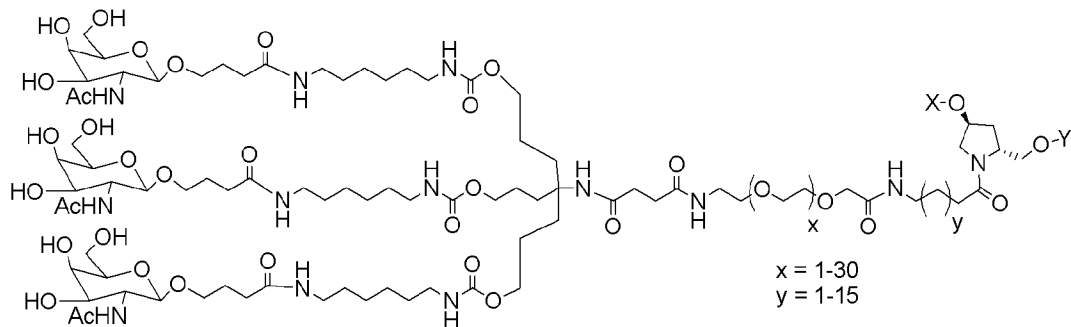
(Формула XXXVII),



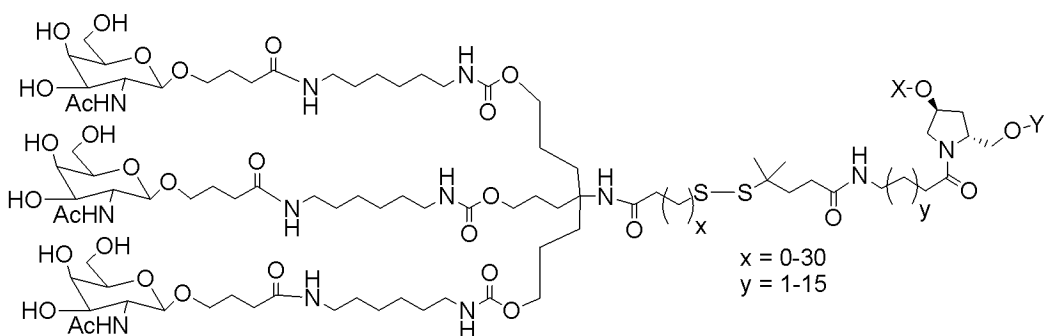
(Формула XXXVIII),



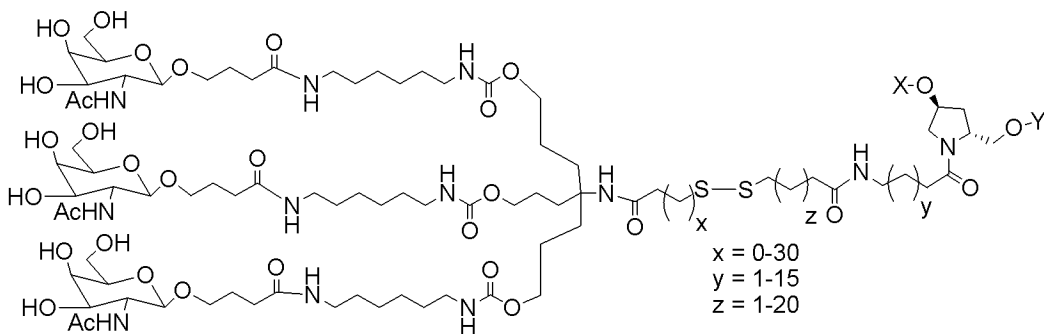
(Формула XXXIX),



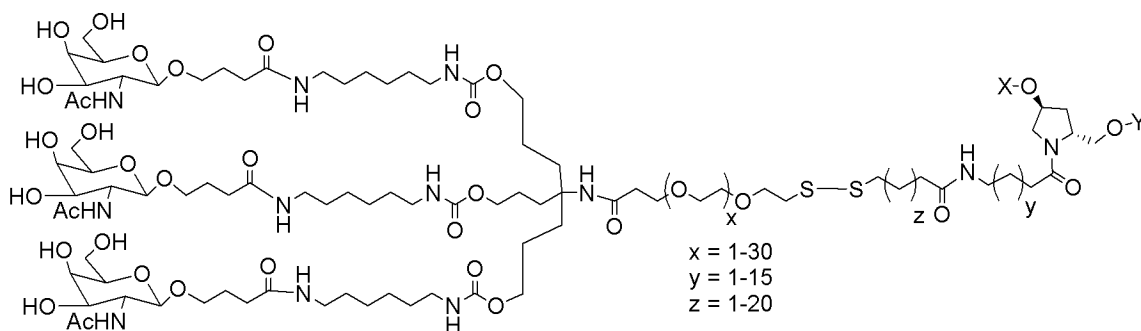
(Формула XL),



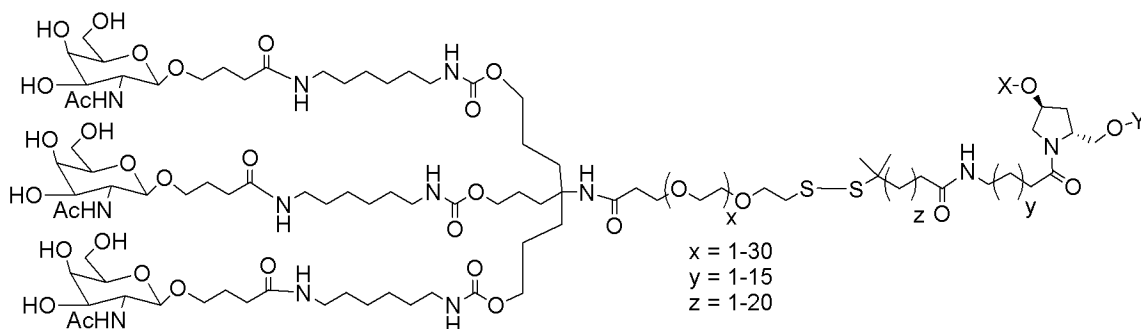
(Формула XLI),



(Формула XLII),



(Формула XLIII), и

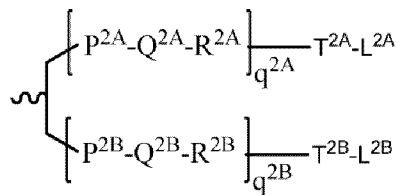


(Формула XLIV), если один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

Согласно определенным вариантам реализации композиций и способов согласно настоящему изобретению лиганд представляет собой одно или более производных «GalNAc» (N-ацетилгалактозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

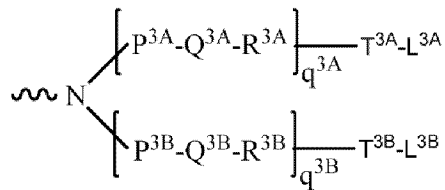
Согласно определенным вариантам реализации дцРНК согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XLV) - (XLVI):

Формула XXXXV

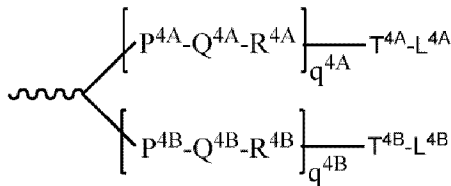


(IV)

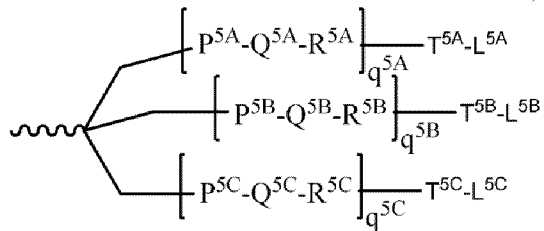
Формула XLVI



(V)



Формула XLVII



Формула XLVIII

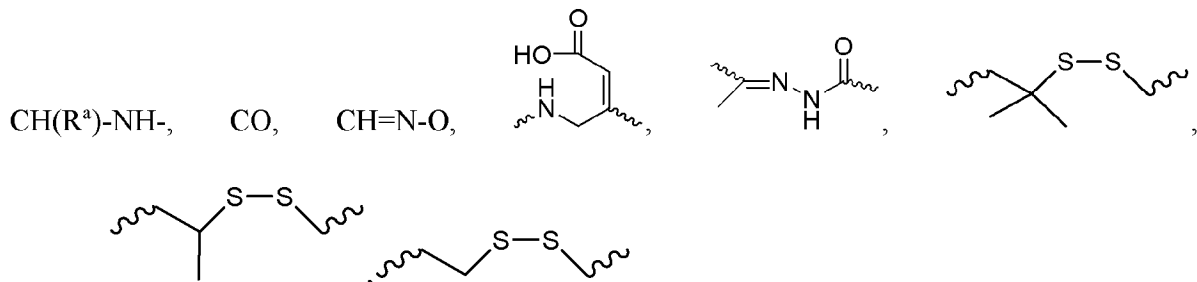
где:

$q^{2\text{A}}$, $q^{2\text{B}}$, $q^{3\text{A}}$, $q^{3\text{B}}$, $q^{4\text{A}}$, $q^{4\text{B}}$, $q^{5\text{A}}$, $q^{5\text{B}}$ и $q^{5\text{C}}$ представляют собой независимо для каждого случая 0-20, и где повторяющееся звено может быть одинаковым или отличающимся;

$P^{2\text{A}}$, $P^{2\text{B}}$, $P^{3\text{A}}$, $P^{3\text{B}}$, $P^{4\text{A}}$, $P^{4\text{B}}$, $P^{5\text{A}}$, $P^{5\text{B}}$, $P^{5\text{C}}$, $T^{2\text{A}}$, $T^{2\text{B}}$, $T^{3\text{A}}$, $T^{3\text{B}}$, $T^{4\text{A}}$, $T^{4\text{B}}$, $T^{4\text{A}}$, $T^{5\text{B}}$, $T^{5\text{C}}$ каждый независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

$Q^{2\text{A}}$, $Q^{2\text{B}}$, $Q^{3\text{A}}$, $Q^{3\text{B}}$, $Q^{4\text{A}}$, $Q^{4\text{B}}$, $Q^{5\text{A}}$, $Q^{5\text{B}}$, $Q^{5\text{C}}$ независимо для каждого случая отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, в котором один или более метиленов могут быть прерваны или терминированы одним или более из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

$R^{2\text{A}}$, $R^{2\text{B}}$, $R^{3\text{A}}$, $R^{3\text{B}}$, $R^{4\text{A}}$, $R^{4\text{B}}$, $R^{5\text{A}}$, $R^{5\text{B}}$, $R^{5\text{C}}$ каждый независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-

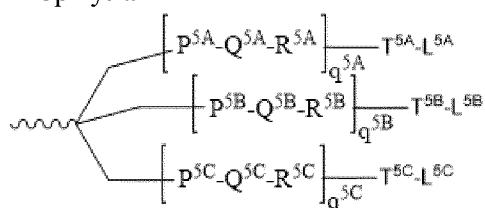


или гетероцикл;

$L^{2\text{A}}$, $L^{2\text{B}}$, $L^{3\text{A}}$, $L^{3\text{B}}$, $L^{4\text{A}}$, $L^{4\text{B}}$, $L^{5\text{A}}$, $L^{5\text{B}}$ и $L^{5\text{C}}$ представляют собой лиганд, т. е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет

собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно полезны для применения с агентами РНКи для ингибирования экспрессии целевого гена, например, те, которые имеют формулу (XLIX):

Формула XLIX



Formula (VII)

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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNAc, включают, но не ограничиваются перечисленными, структуры, приведенные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

Типичные патенты США, в которых раскрыто получение конъюгатов РНК, включают, но не ограничиваются перечисленными, патенты США №№ 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717, 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241, 5391723; 5416203, 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928; 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; и 8106022, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Не требуется, чтобы все положения в конкретном соединении были одинаково модифицированы, и в сущности более чем одна из вышеупомянутых модификаций может быть включена в одно соединение или даже в один нуклеозид в пределах иРНК. Настоящее изобретение также включает соединения иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» соединения иРНК или «химеры» в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения иРНК, предпочтительно агенты на основе дцРНК, которые содержат две или более химически отличающихся областей, каждая из которых состоит из по меньшей мере одного мономерного звена, т. е. нуклеотида в случае соединения дцРНК. Указанные иРНК, как правило, содержат по меньшей мере одну область, в которой РНК модифицирована так, чтобы придать иРНК повышенную устойчивость к деградации нуклеазой, повышенное клеточное поглощение или повышенную аффинность связывания с целевой нуклеиновой кислотой. Дополнительная область иРНК может служить субстратом для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера, РНКаза H представляет собой клеточную эндонуклеазу, которая

расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Таким образом, активация РНКазы Н приводит к расщеплению целевой РНК, значительно повышая тем самым эффективность ингибирования иРНК экспрессии генов. Следовательно, сопоставимые результаты часто могут быть получены с более короткими иРНК при использовании химерных дцРНК по сравнению с гибридизацией фосфотиоатных дезокси-дцРНК с той же целевой областью. Расщепление целевой РНК можно рутинно детектировать с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, связанных методик гибридизации нуклеиновых кислот, известных в данной области техники.

В определенных случаях РНК в случае иРНК может быть модифицирована группой, отличной от лиганда. Ряд молекул, отличных от лигандов, конъюгировали с иРНК с целью повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения иРНК, и процедуры для выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие фрагменты, отличные от лигандов, 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), холевую кислоту (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), простой тиозфир, например, гексил-S-тритилтиол (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, додекандиоловый или ундецильный остатки (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, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-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 адамантануксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитильный фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), или фрагмент октадециламина или гексиламинокарбонилхлестерина (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Типичные патенты Соединенных Штатов Америки, в которых раскрыто получение таких конъюгатов РНК, перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих амиолинкер в одном или более положениях последовательности. Затем проводят реакцию аминогруппы с конъюгируемой молекулой с использованием соответствующих реагентов для связывания или активации. Реакцию конъюгации можно выполнять либо с РНК, которая все еще связана с твердой подложкой, либо после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью ВЭЖХ, как правило, обеспечивает получение чистого конъюгата.

V. Доставка агента РНКи согласно настоящему изобретению

Доставка агента РНКи согласно настоящему изобретению в клетку, например, в клетку в организме субъекта, такого как субъект-человек, например, нуждающийся в этом субъект, такой как субъект, имеющий C9orf72-ассоциированное нарушение, например, C9orf72-ассоциированное заболевание, может быть достигнута несколькими различными

способами. Например, доставку можно выполнять путем приведения клетки в контакт с агентом РНКи согласно настоящему изобретению как *in vitro*, так и *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно выполнять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей агент РНКи, например, дцРНК. В качестве альтернативы, доставку *in vivo* можно выполнять опосредованно путем введения одного или более векторов, которые кодируют и управляют экспрессией агента РНКи. Эти альтернативы более подробно обсуждаются ниже.

В целом, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) можно адаптировать для применения с агентом РНКи согласно настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian RL., (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Для доставки *in vivo* факторы, которые необходимо учитывать для доставки агента РНКи, включают, например, биологическую стабильность доставляемого агента, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемого агента в целевой ткани. Неспецифические эффекты агента РНКи можно свести к минимуму путем локального введения, например, путем прямой инъекции или имплантации в ткань или путем местного введения препарата. Локальное введение в участок обработки обеспечивает максимальную локальную концентрацию агента, ограничивает воздействие агента на системные ткани, которые в противном случае могут быть повреждены агентом или которые могут разрушить агент, и позволяет вводить более низкую общую дозу агента РНКи. Несколько исследований показали успешный нокдаун генных продуктов при локальном введении агента РНКи. Например, было показано, что как внутриглазная доставка дцРНК VEGF путем интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, MJ. *et al.*, (2004) *Retina* 24:132-138), так и субретинальные инъекции мышам (Reich, SJ. *et al.* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предотвращают неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дегенерации. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция дцРНК у мышей приводит к уменьшению объема опухоли (Pille, J. *et al.* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлевать выживаемость несущих опухоль мышей (Kim, WJ. *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S. *et al.*, (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). Также было показано, что РНК-интерференция является успешной при локальной доставке в ЦНС с помощью прямой инъекции (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 в легкие с помощью интраназального введения (Howard, KA. *et al.*, (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X. *et al.*, (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V. *et al.*, (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). В случае системного введения агента РНКи для лечения заболевания РНК можно модифицировать или альтернативно доставлять с помощью системы доставки лекарственных средств; при этом оба способа обеспечивают предотвращение быстрой деградаци дцРНК эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут

обеспечивать нацеливание агента РНКи на целевую ткань и позволяют избежать нежелательных нецелевых эффектов (например, не желая быть связанным теорией, было установлено, что применение GNA, описанных в настоящем документе, дестабилизирует затравочную область дцРНК, что приводит к большему предпочтению таких дцРНК в отношении целевой эффективности, относительно нецелевых эффектов, так как такие нецелевые эффекты значительно ослаблены дестабилизацией такой затравочной области). Агенты РНКи можно модифицировать путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения клеточного поглощения и предотвращения деградации. Например, агент РНКи, направленный против АроВ, конъюгированный с липофильным фрагментом холестерина, был инъецирован системно мышам и привел к нокдауну мРНК аroВ как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J. *et al.*, (2004) *Nature* 432:173-178). Было показано, что конъюгация агента РНКи с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регрессию опухоли в модели рака предстательной железы на мышах (McNamara, JO. *et al.*, (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). Согласно альтернативному варианту реализации агент РНКи может быть доставлен с применением систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы агента РНКи (отрицательно заряженного), а также усиливают взаимодействия в отрицательно заряженной клеточной мембране, чтобы обеспечить эффективное поглощение агента РНКи клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связаны с агентом РНКи, либо индуцированы с образованием везикулы или мицеллы (см., например, Kim SH. *et al.*, (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), в которой заключен агент РНКи. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию агента РНКи при системном введении. Способы получения и введения комплексов катионное соединение-агент РНКи находятся в пределах возможностей специалиста 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 полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодные для системной доставки агентов РНКи, включают DOTAP (Sorensen, DR., *et al.* (2003), выше; Verma, UN. *et al.*, (2003), выше), олигофектамин, «твердые частицы нуклеиновая кислота-липид» (Zimmermann, TS. *et al.*, (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien, PY. *et al.*, (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A. *et al.*, (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet ME. *et al.*, (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia, DA. *et al.*, (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H. *et al.*, (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). Согласно некоторым вариантам реализации агент РНКи образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения

и фармацевтические композиции агентов РНКи и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способу снижения экспрессии целевого гена *C9orf72* в клетке, включающему приведение указанной клетки в контакт с двухцепочечным агентом РНКи согласно настоящему изобретению. Согласно одному варианту реализации клетка представляет собой внепеченочную клетку, необязательно клетку ЦНС.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения экспрессии целевого гена *C9orf72* у субъекта, включающему введение указанному субъекту двухцепочечного агента РНКи согласно настоящему изобретению.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта, имеющего расстройство ЦНС, включающему введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного агента РНКи, нацеленного на *C9orf72*, согласно настоящему изобретению, что обеспечивает лечение указанного субъекта. Примерные расстройства ЦНС, которые можно лечить с помощью способа согласно настоящему изобретению, включают *C9orf72*-ассоциированное заболевание.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечный агент РНКи вводят интратекально. С помощью интратекального введения двухцепочечного агента РНКи способ может обеспечить снижение экспрессии целевого гена *C9orf72* в ткани головного мозга (например, стриатуме) или позвоночника, например, в коре, мозжечке, шейном отделе позвоночника, поясничном отделе позвоночника и грудном отделе позвоночника.

Для удобства изложения составы, композиции и способы в этом разделе обсуждаются в основном в отношении модифицированных соединений киРНК. Однако можно понять, что эти составы, композиции и способы можно применять на практике с другими соединениями киРНК, например, немодифицированными соединениями киРНК, и такое практическое применение находится в пределах настоящего изобретения. Композиция, которая включает агент РНКи, может быть доставлена субъекту с помощью ряда путей. Примерные пути включают: интратекальный, внутривенный, местный, ректальный, анальный, вагинальный, назальный, легочной и глазной.

Агенты РНКи согласно настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, включают одно или более соединений агента РНКи и фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем документе выражение «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и тому подобное, которые являются совместимыми с введением фармацевтического средства. Применение таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какие-либо обычные среды или агент несовместимы с активным соединением, предусмотрено их

применение в композициях. В композиции также могут быть включены вспомогательные активные соединения.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить несколькими путями в зависимости от того, является ли желательным локальное или системное лечение, и от области, подлежащей обработке. Введение может быть местным (включая офтальмологическое, вагинальное, ректальное, интраназальное, трансдермальное), пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенное капельное вливание, подкожную, внутривенную или внутримышечную инъекцию или интратекальное или интравентрикулярное, или интрацеребровентрикулярное введение.

Путь и место введения могут быть выбраны так, чтобы улучшить нацеливание. Например, для нацеливания на мышечные клетки внутримышечная инъекция в представляющие интерес мышцы будет логическим выбором. Нацеливание на клетки легких можно осуществлять путем введения агента РНКи в форме аэрозоля. Нацеливание на сосудистые эндотелиальные клетки можно осуществлять путем нанесения агента РНКи в виде покрытия на баллонный катетер и механического введения РНК.

Составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут потребоваться или могут быть желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т. п. Также можно применять презервативы с покрытием, перчатки и т. п.

Композиции для перорального введения включают порошки или гранулы, суспензии или растворы в воде, сиропы, эликсиры или неводные среды, таблетки, капсулы, таблетки для рассасывания или пастилки. В случае таблеток носители, которые можно применять, включают лактозу, цитрат натрия и соли фосфорной кислоты. В таблетках обычно используются различные разрыхлители, такие как крахмал, и смазывающие агенты, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк. Для перорального введения в форме капсулы подходящие разбавители представляют собой лактозу и высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Если для перорального применения требуются водные суспензии, композиции нуклеиновой кислоты можно комбинировать с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При необходимости можно добавлять определенные подсластители или вкусоароматические агенты.

Композиции для интратекального или интравентрикулярного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки.

Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Интравентрикулярную инъекцию можно облегчить с помощью интравентрикулярного катетера, например, присоединенного к резервуару. Для

внутривенного применения общую концентрацию растворенных веществ можно контролировать, чтобы сделать препарат изотоническим.

Согласно одному варианту реализации введение композиции соединения киРНК, например, двухцепочечного соединения киРНК или соединения оциРНК, является парентеральным, например, внутривенным (например, в виде болюса или диффузионной инфузии), внутрикожным, внутривентральным, внутримышечным, интратекальным, интравентрикулярным, интрацеребровентрикулярным, внутричерепным, подкожным, через слизистую, буккальным, подъязычным, эндоскопическим, ректальным, пероральным, вагинальным, местным, легочным, интраназальным, уретральным или глазным. Введение может обеспечиваться субъектом или другим лицом, например, поставщиком медицинских услуг. Лекарственное средство может быть обеспечено в отмеренных дозах или в дозаторе, который доставляет отмеренную дозу. Выбранные способы доставки более подробно обсуждаются ниже.

А. Интратекальное введение.

Согласно одному варианту реализации двухцепочечный агент РНКи доставляют путем интратекальной инъекции (т. е. инъекции в спинномозговую жидкость, которая омывает ткань головного и спинного мозга). Интратекальную инъекцию агентов РНКи в спинномозговую жидкость можно выполнять в виде болюсной инъекции или посредством миниасосов, которые можно имплантировать под кожу, обеспечивая регулярную и постоянную доставку киРНК в спинномозговую жидкость. Циркуляция спинномозговой жидкости из сосудистого сплетения, где она продуцируется, происходит вниз вокруг спинного мозга и ганглиев дорсальных корешков, а затем вверх вокруг мозжечка и вокруг коры до арахноидальных грануляций, где жидкость может выходить из ЦНС, таким образом, в зависимости от размера, стабильности и растворимости инъецируемых соединений молекулы, доставленные интратекально, могут поражать мишени по всей ЦНС.

Согласно некоторым вариантам реализации интратекальное введение осуществляют посредством насоса. Насос может представлять собой хирургически имплантируемый осмотический насос. Согласно одному варианту реализации осмотический насос имплантируют в субарахноидальное пространство спинномозгового канала для облегчения интратекального введения.

Согласно некоторым вариантам реализации интратекальное введение осуществляют посредством системы интратекальной доставки для фармацевтического средства, включающей резервуар, содержащий некоторый объем фармацевтического агента, и насос, спроектированный для доставки части фармацевтического агента, содержащейся в резервуаре. Более подробную информацию об этой системе интратекальной доставки можно найти в WO 2015/116658, который полностью включен посредством ссылки.

Количество интратекально инъецируемых агентов РНКи может варьироваться для разных целевых генов, и подходящее количество, которое необходимо внести, может быть определено индивидуально для каждого целевого гена. Как правило, это количество

находится в диапазоне от 10 мкг до 2 мг, предпочтительно от 50 мкг до 1500 мкг, более предпочтительно от 100 мкг до 1000 мкг.

В. Кодированные векторы агента РНКи согласно настоящему изобретению

Агенты РНКи, нацеленные на ген *C9orf72*, могут быть экспрессированы из единиц транскрипции, вставленных в векторы ДНК или РНК (см., например, Couture, A, *et al.*, *TIG*. (1996), 12:5-10; WO 00/22113, WO 00/22114 и US 6054299). Экспрессия предпочтительно является устойчивой (месяцы или дольше), в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа целевой ткани или клетки. Эти трансгены могут быть введены в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующийся или неинтегрирующийся вектор. Трансген также может быть сконструирован таким образом, чтобы обеспечить его наследование в качестве внехромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1292).

Отдельную цепь или цепи агента РНКи можно транскрибировать с промотора на векторе экспрессии. Если две отдельные цепи должны быть экспрессированы для создания, например, дцРНК, два отдельных вектора экспрессии могут быть введены совместно (например, посредством трансфекции или инфекции) в целевую клетку. В качестве альтернативы, каждая отдельная цепь дцРНК может быть транскрибирована промоторами, оба из которых расположены на одной и той же экспрессионной плазмиде. Согласно одному варианту реализации дцРНК экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированными повторами, соединенных с помощью линкерной полинуклеотидной последовательности так, что дцРНК имеет структуру стебля и петли.

Векторы экспрессии агента РНКи обычно представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно применять для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии агента РНКи, описанного в настоящем документе. Доставка векторов, экспрессирующих агент РНКи, может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, высаженные из организма пациента, с последующим повторным введением в организм пациента, или любыми другими способами, которые обеспечивают введение в желаемую целевую клетку.

Вирусные векторные системы, которые можно применять со способами и композициями, описанными в настоящем документе, включают, но не ограничиваются перечисленными, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, лентивирусные векторы, вирус лейкоза мышей Молони, и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы SV 40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины или оспы птиц, например, оспы канареек или оспы птиц; и (j) хелпер-зависимый или «выпотрошенный» аденовирус. Дефектные по репликации вирусы также могут быть

предпочтительными. Различные векторы будут включены в геном клеток, но не обязательно. При необходимости конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы EPV и EBV. Конструкции для рекомбинантной экспрессии агента РНКи обычно будут требовать регуляторных элементов, например, промоторов, энхансеров и т. д., для обеспечения экспрессии агента РНКи в целевых клетках. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, известны в данной области техники.

VI. Композиции согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает композиции, включая фармацевтические композиции и составы, которые включают агенты РНКи согласно настоящему изобретению.

Например, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложены композиции, содержащие два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, содержащие агент РНКи, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие агент РНКи, можно применять для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью *C9orf72*, например, *C9orf72*-ассоциированного заболевания.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению являются стерильными. Согласно другому варианту реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению не содержат пирогенов.

Такие фармацевтические композиции изготавливают, исходя из способа доставки. Одним примером являются композиции, которые изготовлены для системного введения посредством парентеральной доставки, например, путем внутривенной (IV), внутримышечной (IM) или подкожной (subQ) доставки. Другим примером являются композиции, которые изготовлены для прямой доставки в ЦНС, например, путем интратекального или интравитреального, или интравентрикулярного, или интрацеребровентрикулярного введения, или с помощью интрапутей инъекции, необязательно путем инфузии в головной мозг (например, стриатум), например, посредством непрерывной инфузии с помощью насоса.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в дозировках, достаточных для ингибирования экспрессии гена *C9orf72*. В целом, подходящая доза агента РНКи согласно настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 200,0 миллиграммов на килограмм массы тела реципиента в сутки, как правило, в диапазоне от примерно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в сутки.

Режим с повторными дозами может включать введение терапевтического количества агента РНКи на регулярной основе, например, ежемесячно или один раз в шесть месяцев. Согласно определенным вариантам реализации агент РНКи вводят от примерно одного раза в квартал (т. е. примерно один раз в три месяца) до примерно двух раз в год.

После начального режима лечения (например, нагрузочной дозы) средства лечения можно вводить на менее частой основе.

Согласно другим вариантам реализации однократная доза фармацевтических композиций может обладать длительным действием так, что последующие дозы вводят с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 или более месяцев. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят один раз в месяц. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят от одного раза в квартал до двух раз в год.

Специалист в данной области техники поймет, что на дозировку и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, могут влиять определенные факторы, включая, но не ограничиваясь перечисленными, тяжесть заболевания или нарушения, предыдущие средства лечения, общее состояние здоровья или возраст субъекта, а также другие присутствующие заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократную обработку или ряд обработок.

Достижения в генетике мышей привели к созданию ряда моделей на мышах для исследования различных заболеваний человека, таких как ALS и FTD, при которых может быть получена польза от снижения экспрессии содержащего повторы *C9orf72*. Такие модели можно применять для *in vivo* тестирования агентов РНКи, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие модели на грызунах известны в данной области техники и включают, например, те, которые описаны в Cepeda, *et al.* (*ASN Neuro* (2010) 2(2):e00033) и Pouladi, *et al.* (*Nat Reviews* (2013) 14:708).

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить несколькими путями в зависимости от того, является ли желательным локальное или системное лечение, и от области, подлежащей обработке. Введение может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; подкожное введение, например, посредством имплантированного устройства; или внутрочерепное, например, путем интрапаренхимального, интратекального, интравентрикулярного или интрацеребровентрикулярного введения.

Агенты РНКи могут быть доставлены таким образом, чтобы обеспечить нацеливание на конкретную ткань, такую как ЦНС (например, нейрональную, глиальную или сосудистую ткань головного мозга) или тип клеток (например, нейрон).

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут потребоваться или могут быть желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т. п. Также можно применять презервативы с покрытием, перчатки и т. п. Подходящие составы для местного применения включают составы, в которых агенты РНКи, охарактеризованные в настоящем изобретении, смешаны с агентом для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие агенты и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидил DOPE этаноламин, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтанолламин DOTMA). Агенты РНКи, охарактеризованные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать комплексы с ними, в частности, катионные липосомы. В качестве альтернативы, агенты РНКи могут быть объединены в комплекс с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, но не ограничиваются перечисленными, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C1-20 алкиловый сложный эфир (например, изопропилмиристенат IPM), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в US 6747014, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Составы агентов РНКи, содержащие мембранные молекулярные агрегаты

Агент РНКи для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению может быть изготовлен для доставки в мембранном молекулярном агрегате, например, в липосоме или мицелле. В настоящем документе термин «липосома» относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, сгруппированных по меньшей мере в один бислой, например, в один бислой или во множество бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию агента РНКи. Липофильный материал изолирует водную внутреннюю часть от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию агента РНКи, хотя в некоторых примерах она может. Липосомы можно применять для переноса и

доставки активных ингредиентов в место действия. Поскольку липосомальная мембрана структурно сходна с биологическими мембранами, при внесении липосом в ткань липосомальный бислой сливается с бислоем клеточных мембран. По мере прогрессирования слияния липосомы и клетки внутреннее водное содержимое, которое включает агент РНКи, доставляется в клетку, где агент РНКи может специфично связываться с целевой РНК и может опосредовать РНКи. В некоторых случаях липосомы также специфично нацелены, например, для направления агента РНКи на конкретные типы клеток.

Липосому, содержащую агент РНКи, можно получить с помощью ряда способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяется в детергенте таким образом, что мицеллы образуются с липидным компонентом. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может иметь высокую критическую концентрацию мицеллообразования и может быть неионогенным. Примерные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Затем препарат агента РНКи добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы на липиде взаимодействуют с агентом РНКи и конденсируются вокруг агента РНКи с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, с помощью диализа, с получением липосомального препарата агента РНКи.

При необходимости во время реакции конденсации может быть добавлено соединение-носитель, которое способствует конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может представлять собой полимер, отличный от нуклеиновой кислоты (например, спермин или спермидин). pH также может быть скорректирован для облегчения конденсации.

Способы получения стабильных носителей для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов носителя для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Образование липосомы также может включать один или более аспектов примерных способов, описанных в Felgner, P. L. *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:7413-7417; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham *et al.*, (1965) *M. Mol. Biol.* 23:238; Olson *et al.*, (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 557:9; Szoka *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194; Mayhew *et al.*, (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775:169; Kim *et al.*, (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 728:339; и Fukunaga *et al.*, (1984) *Endocrinol.* 115:757. Обычно используемые методики для получения липидных агрегатов подходящего размера для применения в качестве носителей для доставки включают ультразвуковое воздействие и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer *et al.*, (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 858:161). Микрофлюидизацию можно применять, если желательны стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew *et al.*, (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 775:169). Эти способы легко адаптируют для упаковки препаратов агента РНКи в липосомы.

Липосомы делятся на два широких класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновой кислоты с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс нуклеиновая кислота/липосома связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализуется в эндосому. Из-за кислого рН в эндосоме липосомы разрываются, высвобождая свое содержимое в цитоплазму клетки (Wang *et al.* (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:980-985).

Липосомы, которые являются рН-чувствительными или отрицательно заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты, а не образуют комплекс с ними. Поскольку как нуклеиновая кислота, так и липид одинаково заряжены, происходит отталкивание, а не образование комплекса. Тем не менее, некоторое количество нуклеиновой кислоты захватывается в водной внутренней части этих липосом. рН-чувствительные липосомы использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в монослой клеток в культуре. В целевых клетках детектировалась экспрессия экзогенного гена (Zhou *et al.* (1992) *Journal of Controlled Release*, 19:269-274).

Один из основных типов липосомальной композиции включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина, полученного из природных источников. Нейтральные липосомные композиции, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомные композиции обычно образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные способные к слиянию липосомы образованы главным образом из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомальной композиции образуется из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC сои и PC яиц. Другой тип образуется из смесей фосфолипида или фосфатидилхолина, или холестерина.

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

Также исследовали неионогенные липосомальные системы для определения их применимости при доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Для доставки в дерму кожи мыши циклоспорина-А использовали неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-простой стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-простой стеариловый эфир). Результаты показали, что такие неионогенные липосомальные системы эффективно облегчали отложение циклоспорина А в различные слои кожи (Hu *et al.*, (1994) *S.T.P. Pharma. Sci.*, 4(6):466).

Липосомы также включают «стерически стабилизированные» липосомы, термин который в контексте настоящего документа относится к липосомам, содержащим один или более специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в кровотоке по сравнению с липосомами, не содержащими таких специализированных липидов. Примеры стерически стабилизированных липосом представляют собой те, в которых часть образующей везикулу липидной части липосомы (А) содержит один или более гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G_{M1} , или (В) дериватизирована одним или более гидрофильными полимерами, такими как фрагмент полиэтиленгликоля (PEG). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, в данной области техники полагают, что по меньшей мере для стерически стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-дериватизированные липиды, увеличенный период полужизни в кровотоке этих стерически стабилизированных липосом обусловлен сниженным поглощением в клетки ретикулоэндотелиальной системы (Allen *et al.*, (1987) *FEBS Letters*, 223:42; Wu *et al.*, (1993) *Cancer Research*, 53:3765).

Различные липосомы, содержащие один или более гликолипидов, известны в данной области техники. Papahadjopoulos *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1987), 507:64) сообщили о способности моносиалоганглиозиды G_{M1} , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола улучшать период полужизни липосом в крови. Эти результаты были объяснены Gabizon *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1988), 85,:6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба за авторством Allen *et al.*, раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{M1} или сульфатный сложный эфир галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb *et al.*) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim *et al.*).

Согласно одному варианту реализации используют катионные липосомы. Преимущество катионных липосом заключается в возможности слияния с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя они и не способны так эффективно сливаться с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo* и могут быть применены для доставки агентов РНКи в макрофаги.

Дополнительные преимущества липосом включают следующие: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразлагаемыми; липосомы могут включать широкий спектр водорастворимых и липидорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные агенты РНКи в их внутренних компартментах от метаболизма и деградации (Rosoff, в «Pharmaceutical Dosage Forms», Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важные соображения при получении липосомных составов включают заряд липидной поверхности, размер везикулы и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N, N,N-триметиламмония (DOTMA) можно применять для образования небольших липосом, которые спонтанно взаимодействуют с нуклеиновой

кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран культуры клеток ткани, что приводит к доставке агента РНКи (см., например, Felgner, P. L. *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:7413-7417, и патент США № 4897355, где описан DOTMA и его применение с ДНК).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеоилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP) можно применять в комбинации с фосфолипидом с образованием ДНК-комплексирующих везикул. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективный агент для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры ткани, который содержит положительно заряженные липосомы DOTMA, которые спонтанно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. При использовании достаточно положительно заряженных липосом общий заряд в полученных комплексах также является положительным. Положительно заряженные комплексы, полученные таким образом, спонтанно прикрепляются к отрицательно заряженным поверхностям клеток, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры ткани. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеоилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан («DOTAP») (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что фрагменты олеоида связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие описанные катионные липидные соединения включают те, которые были конъюгированы с различными фрагментами, включая, например, карбоксиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения как 5-карбоксиспермилглицин диоктаолеоиламид («DOGS») (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин-5-карбоксиспермиламид («DPPEs») (см., например, патент США № 5171678).

Другой катионный липидный конъюгат включает дериватизацию липида холестерина («DC-Chol»), который был включен в состав липосом в комбинации с DOPE (см. Gao, X. and Huang, L., (1991) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280). Сообщалось, что липополилизин, полученный путем конъюгирования полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8). Для определенных клеточных линий эти липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, как полагают, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем композиции, содержащие DOTMA. Другие коммерчески доступные катионные липидные продукты включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, Ла-Холья, Калифорния) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомальные составы особенно подходят для местного введения, липосомы обладают несколькими преимуществами по сравнению с другими составами. Такие

преимущества включают сниженные побочные эффекты, связанные с высоким системным всасыванием вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в желаемой мишени и возможность введения агента РНКи в кожу. Согласно некоторым вариантам реализации липосомы применяют для доставки агента РНКи в эпидермальные клетки, а также для усиления проникновения агента РНКи в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно наносить местно. Была описана местная доставка лекарственных средств, изготовленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner *et al.*, (1992) *Journal of Drug Targeting*, vol. 2,405-410 и du Plessis *et al.*, (1992) *Antiviral Research*, 18:259-265; Mannino, R. J. and Fould-Fogerite, S., (1998) *Biotechniques* 6:682-690; Itani, T. *et al.*, (1987) *Gene* 56:267-276; Nicolau, C. *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 149:157-176; Straubinger, R. M. and Papahadjopoulos, D. (1983) *Meth. Enzymol.* 101:512-527; Wang, C. Y. and Huang, L., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855).

Также исследовали неионогенные липосомальные системы для определения их применимости при доставке лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-простой стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-простой стеариловый эфир), использовали для доставки лекарственного средства в дерму кожи мыши. Такие составы с агентом РНКи можно применять для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают агенты РНКи, могут быть получены с высокой степенью деформируемости. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через поры, которые меньше среднего радиуса липосомы. Например, трансферосомы представляют собой тип деформируемых липосом. Трансферосомы можно получать путем добавления активаторов кромок поверхности, обычно поверхностно-активных веществ, в стандартную липосомальную композицию. Трансферосомы, которые включают агент РНКи, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции с целью доставки агента РНКи в кератиноциты в коже. Чтобы пересечь интактную кожу млекопитающих, липидные везикулы должны проходить через ряд мелких пор, каждая из которых имеет диаметр менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, из-за липидных свойств эти трансферосомы могут быть самооптимизирующимися (адаптирующимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и часто могут достигать своих мишеней без фрагментации и часто самозагружаются.

Другие составы, пригодные согласно настоящему изобретению, описаны в предварительной заявке на патент США с серийным номером 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 на патент № РСТ/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, которые пригодны согласно настоящему изобретению.

Трансферосомы, еще один тип липосом, представляют собой высокодеформируемые липидные агрегаты, которые являются привлекательными кандидатами в качестве носителей для доставки лекарственных средств. Трансферосомы могут быть описаны как липидные капли, которые являются настолько деформируемыми, что они легко способны проникать через поры, которые меньше, чем капли. Трансферосомы адаптируются к среде, в которой они используются, например, они являются самооптимизирующимися (адаптирующимися к форме пор в коже), самовосстанавливающимися, часто достигают своих мишеней без фрагментации и часто самозагружаются. Для получения трансферосом можно добавлять активаторы кромок поверхности, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомальной композиции. Трансферосомы использовали для доставки сывороточного альбумина в кожу. Было показано, что опосредуемая трансферосомами доставка сывороточного альбумина является такой же эффективной, как и подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, такие как те, которые описаны в настоящем документе, в частности, в эмульсиях (включая микроэмульсии) и липосомах. Наиболее распространенным способом классификации и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как «голова») обеспечивает наиболее подходящие средства для классификации различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, ее классифицируют как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах и могут использоваться в широком диапазоне значений pH. В целом, их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до примерно 18 в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные эфиры глицерина, сложные эфиры полиглицерина, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. В данный класс также включены неионогенные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-полимеры. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее популярными членами класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

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

карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламидами аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными членами класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и мыла.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при ее растворении или диспергировании в воде, поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают соли четвертичного аммония и этоксилированные амины. Соли четвертичного аммония являются наиболее часто используемыми членами этого класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести как положительный, так и отрицательный заряд, 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 лекарственных продуктах, составах и эмульсиях (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Агент РНКи для применения в способах согласно настоящему изобретению также может быть обеспечен в виде мицеллярных составов. «Мицеллы» определены в настоящем документе как конкретный тип молекулярного агрегата, в котором амфипатические молекулы сгруппированы в сферической структуре таким образом, что все гидрофобные части молекул направлены внутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Обратная группировка существует, если среда является гидрофобной.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции кРНК, C₈-C₂₂-алкилсульфата щелочного металла и соединений, образующих мицеллы. Примерные соединения, образующие мицеллы, включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло примулы вечерней, ментол, тригидроксиоксохоланилглицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, полиоксиэтиленовые простые эфиры и их аналоги, полидоканолалкиловые простые эфиры и их аналоги, хенодзоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Образующие мицеллы соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться при по существу любом типе перемешивания ингредиентов, но для получения мицелл меньшего размера необходимо энергичное перемешивание.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию кнРНК и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают с по меньшей мере тремя соединениями, образующими мицеллы, с образованием смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают путем перемешивания композиции кнРНК, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из соединений, образующих мицеллы, с последующим добавлением оставшихся соединений, образующих мицеллы, с энергичным перемешиванием.

Фенол или м-крезол могут быть добавлены в смешанную мицеллярную композицию для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы, фенол или м-крезол могут быть добавлены вместе с ингредиентами, образующими мицеллы. Изотонический агент, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав можно помещать в аэрозольный дозатор, и дозатор заправляют пропеллентом. Пропеллент, находящийся под давлением, находится в жидкой форме в дозаторе. Соотношения ингредиентов регулируют таким образом, чтобы водная и пропеллентная фазы становились одной, т. е. существует одна фаза. Если есть две фазы, необходимо встряхнуть дозатор перед распределением части содержимого, например, через дозирующий клапан. Распределяемая доза фармацевтического агента выталкивается из дозирующего клапана в виде мелкодисперсного спрея.

Пропелленты могут включать хлорфторуглероды, водородосодержащие фторуглероды, простой диметилловый эфир и простой диэтиловый эфир. Согласно определенным вариантам реализации можно применять HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов могут быть определены посредством относительно простых экспериментов. Для всасывания через полость рта часто желательно увеличить, например, по меньшей мере в два или в три раза, дозировку для введения путем инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

В. Липидные частицы

Агенты РНКи, например, дцРНК согласно настоящему изобретению, могут быть полностью инкапсулированы в липидный состав, например, LNP или другую частицу нуклеиновой кислоты и липида.

В настоящем документе термин «LNP» относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты и липида. LNP, как правило, содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частицы (например, PEG-липидный конъюгат). LNP являются чрезвычайно подходящими для системного применения, поскольку они характеризуются увеличенной продолжительностью жизни в кровотоке после внутривенной (в/в) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, в участках, физически отделенных от места введения). LNP включают «pSPLP», которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующего агента и нуклеиновой

кислоты, как изложено в WO 00/03683. Частицы согласно настоящему изобретению, как правило, имеют средний диаметр от примерно 50 нм до примерно 150 нм, более типично от примерно 60 нм до примерно 130 нм, более типично от примерно 70 нм до примерно 110 нм, наиболее типично от примерно 70 нм до примерно 90 нм и являются по существу нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, присутствующие в частицах нуклеиновой кислоты и липида согласно настоящему изобретению, являются устойчивыми к деградации нуклеазой в водном растворе. Частицы нуклеиновой кислоты и липида и их способ получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации патента США № 2010/0324120 и WO 96/40964.

Согласно одному варианту реализации соотношение липид/лекарственное средство (соотношение масса/масса) (например, соотношение липид/дцРНК) будет находиться в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 50:1, от примерно 1:1 до примерно 25:1, от примерно 3:1 до примерно 15:1, от примерно 4:1 до примерно 10:1, от примерно 5:1 до примерно 9:1 или от примерно 6:1 до примерно 9:1. Диапазоны, которые являются промежуточными для указанных выше диапазонов, также предусмотрены как часть настоящего изобретения.

Определенные конкретные составы LNP для доставки агентов РНК и описаны в данной области техники, включая, например, составы LNP01, описанные в WO 2008/042973, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные примерные составы липид-дцРНК указаны ниже.

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:киРНК
SNALP-1	1,2-Дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:киРНК ~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:киРНК ~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:киРНК ~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:киРНК ~11:1

LNP07	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:киРНК ~6:1
LNP08	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:киРНК ~11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК 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:киРНК 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (МС3)	МС-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанидиил)дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК: 33:1
LNP14	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 40/15/40/5 Липид:киРНК: 11:1
LNP15	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Липид:киРНК: 11:1
LNP16	МС3	МС3/DSPC/холестерин/PEG-DMG

		50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/35/5 Липид:киРНК: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:киРНК: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин

PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средней мол. массой 2000)

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средней мол. массой 2000)

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристилоксипропиламин (PEG со средней мол. массой 2000)

Содержащие SNALP (1,2-Дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA)) составы описаны в WO 2009/127060, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Содержащие XTC составы описаны в WO 2010/088537, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Содержащие MC3 составы описаны, например, в публикации патента США № 2010/0324120, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Содержащие ALNY-100 составы описаны в WO 2010/054406, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Содержащие C12-200 составы, описаны в WO 2010/129709, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Могут быть желательными загустители, вкусоароматические агенты, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие агенты или связывающие агенты. Согласно некоторым вариантам реализации пероральные составы представляют собой составы, в которых дцРНК, охарактеризованные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или более улучшающими проникновение поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты или сложные эфиры или их соли, желчные кислоты или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). Согласно некоторым вариантам реализации применяют комбинации усилителей проникновения, например, жирных кислот/солей в комбинации с желчными кислотами/солями. Одна примерная комбинация представляет собой натриевую соль лауриновой кислоты, каприновую кислоту и UDCA. Дополнительные усилители проникновения включают полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый простой эфир. ДцРНК, охарактеризованные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в гранулированной форме, включающей распыленные высушенные частицы, или в комплексе с образованием микрочастиц или наночастиц. Агенты, образующие комплекс с дцРНК, включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-derivatized полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие агенты включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен P(TDAE), полиаминостирол (например, p-амино), полиметилцианоакрилат, полиэтилцианоакрилат, полибутилцианоакрилат,

полиизобутилцианоакрилат, полиизогексилцианоакрилат, DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли-D, L-молочную кислоту, поли-DL-молочную-со-гликолевую кислоту (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы для перорального применения дцРНК и их получение подробно описаны в патенте США 6887906, US 2003/0027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхимального (в головной мозг), интратекального, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, но не ограничиваясь перечисленными, усилители проникновения, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются перечисленными, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Указанные композиции могут быть созданы из множества компонентов, которые включают, но не ограничиваются перечисленными, предварительно образованные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. При лечении АРР-ассоциированных заболеваний или нарушений особенно предпочтительными являются составы, которые нацелены на головной мозг.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению, которые могут быть удобно представлены в единичной лекарственной форме, могут быть получены в соответствии с общепринятыми методиками, хорошо известными в фармацевтической отрасли. Такие методики включают этап соединения активных ингредиентов с фармацевтическим(и) носителем(ями) или вспомогательным(и) веществом(ами). В целом, составы получают путем равномерного и тщательного соединения активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкодисперсными твердыми носителями или и тем, и другим, а затем, при необходимости, придания формы продукту.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть изготовлены в виде любой из множества возможных лекарственных форм, таких как, но не ограничиваясь перечисленными, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции согласно настоящему изобретению также могут быть изготовлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

С. Дополнительные составы

Эмульсии

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены и изготовлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, представляют собой гетерогенные

системы одной жидкости, диспергированной в другой в виде капель, обычно превышающих 0,1 мкм в диаметре (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; 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 смешанные и диспергированные друг с другом. В целом, эмульсии могут быть типа «вода-в-масле» (в/м) или «масло-в-воде» (м/в). Если водная фаза тщательно распределена и диспергирована в виде мельчайших капель в объемной масляной фазе, полученная композиция называется эмульсией «вода-в-масле» (в/м). В качестве альтернативы, если масляная фаза тщательно распределена и диспергирована в виде мельчайших капель в объемной водной фазе, полученная композиция называется эмульсией «масло-в-воде» (м/в). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты в дополнение к диспергированным фазам, и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, либо в масляной фазе, либо в виде отдельной фазы само по себе. Фармацевтические вспомогательные вещества, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также при необходимости могут присутствовать в эмульсиях. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят более чем из двух фаз, такие как, например, эмульсии типа «масло-в-воде-в-масле» (м/в/м) и «вода-в-масле-в-воде» (в/м/в). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которых не обеспечивают простые бинарные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капли эмульсии м/в заключают мелкие капли воды, представляют собой эмульсию в/м/в. Подобным образом, система масляных капель, заключенная в глобулы воды, стабилизированные в масляной непрерывной фазе, обеспечивает эмульсию м/в/м.

Эмульсии характеризуются незначительной термодинамической стабильностью или ее отсутствием. Часто диспергированная или прерывистая фаза эмульсии хорошо диспергирована во внешней или непрерывной фазе и поддерживается в этой форме посредством эмульгаторов или вязкости состава. Любая из фаз эмульсии может представлять собой полутвердое вещество или твердое вещество, как в случае мазевых основ и кремов эмульсионного типа. Другие способы стабилизации эмульсий предусматривают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую из фаз эмульсии. Эмульгаторы в широком смысле можно разделить на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбирующие основы и мелкодисперсные 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 поверхностно-активные агенты, нашли широкое применение при изготовлении эмульсий и 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, как правило, являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильного и гидрофобного характера поверхностно-активного вещества называется гидрофильно-липофильным балансом (HLB) и является ценным инструментом для классификации и отбора поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на различные классы в зависимости от характера гидрофильной группы: неионогенные, 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 эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбционные основы обладают гидрофильными свойствами так, что они могут всасывать воду с образованием эмульсий в/м, сохраняя при этом свою полутвердую консистенцию, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин. Также в качестве хороших эмульгаторов применяются мелкодисперсные твердые вещества, в частности, в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. К ним относятся полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный алюмосиликат и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилтристеарат.

Большой ряд неэмульгирующих материалов также включен в эмульсионные составы и вносит вклад в свойства эмульсий. К ним относятся жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, 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 камеди и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, аравийская камедь, агар, альгиновая кислота, каррагинан, гуаровая 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 прочных межфазных пленок вокруг капель диспергированной фазы и увеличения вязкости внешней фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, эти составы часто включают консерванты. Обычно используемые консерванты, включенные в эмульсионные составы, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония, хлорид бензалкония, сложные эфиры *p*-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют в эмульсионные составы для предотвращения ухудшения характеристик состава. Применяемые антиоксиданты могут представлять собой поглотители свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстанавливающие агенты, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и антиоксидантные синергические соединения, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их изготовления 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). Эмульсионные составы для пероральной доставки широко используются из-за легкости изготовления, а также эффективности с точки зрения всасывания и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минерального масла, маслорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира входят в число материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий м/в.

ii. Микроэмульсии

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиции агентов РНКи и нуклеиновых кислот изготовлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного соединения, которая

представляет собой единый оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (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). Как правило, микроэмульсии представляют собой системы, которые получают путем сначала диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, обычно среднецепочечного спирта с образованием прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также описаны как термодинамически стабильные, изотропно чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизированы с помощью межфазных пленок поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, стр. 185-215). Микроэмульсии обычно получают посредством комбинации трех-пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, ко-ПАВ и электролит. Тип микроэмульсии «вода-в-масле» (в/м) или «масло-в-воде» (м/в) зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества, а также от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активных веществ (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм был тщательно исследован и дал специалисту в данной области техники исчерпывающие знания о том, как изготавливать 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 обычными эмульсиями преимущество микроэмульсий заключается в обеспечении солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств в составе термодинамически стабильных капель, которые образовались спонтанно.

Поверхностно-активные вещества, используемые при приготовлении микроэмульсий, включают, но не ограничиваются перечисленными, ионные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые простые эфиры, сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот, монолаурат тетраглицерина (ML310), моноолеат тетраглицерина (MO310), моноолеат гексаглицерина (PO310), пентаолеат гексаглицерина (PO500), монокапрат декаглицерина (MCA750), моноолеат декаглицерина (MO750), секвиолеат декаглицерина (SO750), декаолеат декаглицерина (DAO750), отдельно или в комбинации с ко-ПАВ. Ко-ПАВ, обычно короткоцепочечный спирт, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит

для увеличения межфазной текучести посредством проникновения в пленку поверхностно-активного вещества и, следовательно, создания нарушенной пленки из-за пустого пространства, созданного среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения ко-ПАВ, и не содержащие спирта самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы известны в данной области техники. Водная фаза, как правило, может представлять собой, но не ограничивается этим, воду, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать, но не ограничивается этим, такие материалы как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные моно-, ди- и триглицериды (C8-C12), полиоксиэтилированные сложные эфиры глицерина и жирных кислот, жирные спирты, полигликолизированные глицириды, насыщенные полигликолизированные C8-C10-глицириды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации лекарственного средства и повышенного всасывания лекарственных средств. Было предложено использование микроэмульсий на основе липидов (как м/в, так и в/м) для повышения биодоступности лекарственных средств при пероральном введении, включая пептиды (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Преимущества микроэмульсий заключаются в обеспечении улучшенной солюбилизации лекарственного средства, защите лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможном усилении всасывания лекарственного средства посредством индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести и проницаемости мембраны, легкости получения, легкости перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, повышении клинической активности и уменьшении токсичности (см., например, патенты США №№ 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho *et al.*, J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться спонтанно, когда их компоненты приводят в контакт при температуре окружающей среды. Это может быть особенно предпочтительным при изготовлении термолабильных лекарственных средств, пептидов или агентов РНКи. Микроэмульсии также были эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как в косметических, так и в фармацевтических приложениях. Ожидается, что микроэмульсионные композиции и составы согласно настоящему изобретению будут способствовать повышению системного всасывания агентов РНКи и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшат локальное клеточное поглощение агентов РНКи и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии согласно настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как моностеарат сорбитана (Grill 3), Labrasol и усилители проникновения, для улучшения свойств состава и для усиления всасывания агентов РНКи и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Усилители

проникновения, применяемые в микроэмульсиях согласно настоящему изобретению, можно классифицировать по принадлежности к одной из пяти широких категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие вещества, отличные от ПАВ (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из этих классов обсуждается выше.

iii. Микрочастицы

Агент РНКи согласно настоящему изобретению может быть включен в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы могут быть получены путем высушивания распылением, но также могут быть получены с помощью других способов, включающих лиофилизацию, выпаривание, высушивание в псевдооживленном слое, высушивание в вакууме или комбинацию этих методик.

iv. Усилители проникновения

Согласно одному варианту реализации в настоящем изобретении применяют различные усилители проникновения для обеспечения эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности, агентов РНКи, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствует в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только липидорастворимые или липофильные лекарственные средства легко пересекают клеточные мембраны. Было обнаружено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут пересекать клеточные мембраны, если мембрану, подлежащую пересечению, обрабатывают усилителем проникновения. Помимо содействия диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны усилители проникновения также усиливают проникновение липофильных лекарственных средств.

Усилители проникновения могут быть классифицированы по принадлежности к одной из пяти широких категорий, т.е., поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие вещества, отличные от ПАВ (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 вышеупомянутых классов усилителей проникновения более подробно описан ниже.

Поверхностно-активные вещества (или «поверхностно-активные агенты») представляют собой химические соединения, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или поверхностное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего усиливается всасывание агентов РНКи через слизистую оболочку. В дополнение к солям желчных кислот и жирным кислотам усилители проникновения включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый простой 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 эмульсии перфторорганических соединений, таких как FC-43. (Takahashi *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Различные жирные кислоты и их производные, которые действуют как усилители проникновения, 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_{1-20} алкиловые сложные эфиры (например, метил, изопропил и трет-бутил), а также их моно- и диглицериды (т.е., олеат, лаурат, капрат, миристан, 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 дисперсии и всасыванию липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Различные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют в качестве усилителей проникновения. Таким образом, термин «соли желчных кислот» включает любой из встречающихся в природе компонентов 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 (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый простой эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, стр. 92; Swinyard, глава 39 в: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, стр. 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 агенты, применяемые в связи с настоящим изобретением, могут быть определены как соединения, которые удаляют ионы металлов из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего усиливается всасывание агентов РНКи через слизистую оболочку. Что касается их применения в качестве усилителей проникновения в настоящем изобретении, хелатирующие агенты имеют дополнительное

преимущество, заключающееся в выполнении функции ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют иона двухвалентного металла для катализа и, таким образом, ингибируются хелатирующими агентами (Jarrett, J. *Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие агенты включают, но не ограничиваются перечисленными, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацильные производные бета-дикетонов (энамины) (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, стр. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

В настоящем документе усиливающие проникновение нехелатирующие соединения, отличные от ПАВ, могут быть определены как соединения, которые проявляют незначительную активность в качестве хелатирующих агентов или поверхностно-активных веществ, но которые, тем не менее, усиливают всасывание агентов РНКи через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Данный класс усилителей проникновения включает, например, ненасыщенные циклические мочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалкана (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92); и нестероидные противовоспалительные агенты, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Агенты, которые усиливают поглощение агентов РНКи на клеточном уровне, также могут быть добавлены к фармацевтическим и другим композициям согласно настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi *et al.*, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (WO 97/30731), также, как известно, усиливают клеточное поглощение дцРНК.

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот можно применять другие агенты, включая гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

Вспомогательные вещества

В отличие от соединения-носителя «фармацевтический носитель» или «вспомогательное вещество» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или более нуклеиновых кислот животному. Вспомогательное вещество может быть жидким или твердым и выбрано с учетом планируемого способа введения с тем, чтобы обеспечить желаемый объем, консистенцию и т. д. при комбинировании с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают, но не

ограничиваются перечисленными, связывающие агенты (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т. д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т. д.); разрыхлители (например, крахмал, крахмалгликолят натрия и т. д.); и смачивающие агенты (например, лаурилсульфат натрия и т. д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают во вредные взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, также можно применять для изготовления композиций согласно настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются перечисленными, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Составы для местного введения 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 применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают во вредные взаимодействия с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают, но не ограничиваются перечисленными, воду, солевые растворы, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

Другие компоненты

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях, с их уровнями использования, установленными в данной области техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, локальные анестетики или противовоспалительные агенты, или могут содержать дополнительные материалы, подходящие для физического изготовления различных лекарственных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, вкусоароматические агенты, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загущающие агенты и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны

чрезмерно мешать разным видам биологической активности компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и, при необходимости, смешивать со вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для корректировки осмотического давления, буферами, красителями, вкусоароматическими агентами или ароматическими веществами и т. п., которые не вступают во вредные взаимодействия с нуклеиновой кислотой(кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

Согласно некоторым вариантам реализации фармацевтические композиции, охарактеризованные в настоящем изобретении, включают (a) один или более агентов РНКи и (b) один или более агентов, которые функционируют посредством механизма, отличного от РНКи, и которые можно применять при лечении C9orf72-ассоциированного нарушения. Примеры таких агентов включают, но не ограничиваются перечисленными, ингибиторы моноаминов, резерпин, противосудорожные агенты, антипсихотические агенты и антидепрессанты.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или у экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции). Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Соединения, для которых наблюдаются высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными.

Данные, полученные из анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при установлении диапазона дозировки для применения у людей. Дозировка композиций, охарактеризованных в настоящем документе, обычно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED₅₀ с незначительной токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах указанного диапазона в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, охарактеризованных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально оценить на основании анализов клеточной культуры. Доза может быть установлена в моделях на животных для достижения некоторого диапазона циркулирующих концентраций соединения в плазме или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, для достижения уменьшенной концентрации полипептида), который включает IC₅₀ (т. е. концентрацию тестируемого соединения, которая обеспечивает полумаксимальное ингибирование симптомов), как определено в культуре клеток. Такая информация может быть использована для более точного

определения полезных доз у людей. Уровни в плазме можно измерить, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, обсуждавшемуся выше, агенты РНКи, охарактеризованные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными агентами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредуемых экспрессией нуклеотидного повтора. В любом случае, врач, проводящий введение, может регулировать количество и время введения агента РНКи на основании результатов, наблюдаемых при применении стандартных показателей эффективности, известных в данной области техники или описанных в настоящем документе.

VII. Наборы

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложены наборы, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав соединения киРНК, например, двухцепочечного соединения киРНК, или соединения оциРНК (например, предшественника, например, более крупного соединения киРНК, которое может быть процессировано в соединение оциРНК, или ДНК, которая кодирует соединение киРНК, например, двухцепочечное соединение киРНК или соединение оциРНК, или его предшественника).

Такие наборы включают один или более агентов на основе дцРНК и инструкции по применению, например, инструкции по введению профилактически или терапевтически эффективного количества агента(ов) на основе дцРНК. Агент на основе дцРНК, может находиться во флаконе или предварительно заполненном шприце. Наборы могут необязательно дополнительно содержать средства для введения агента на основе дцРНК (например, устройство для инъекции, такое как предварительно заполненный шприц), или средства для измерения ингибирования *C9orf72* (например, средства для измерения ингибирования мРНК *C9orf72*, белка *C9orf72* и/или активности *C9orf72*). Такие средства для измерения ингибирования *C9orf72* могут включать средства для получения образца от субъекта, такого как, например, образец СМЖ и/или плазмы крови. Наборы согласно настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

Согласно определенным вариантам реализации отдельные компоненты фармацевтического состава могут быть обеспечены в одном контейнере. В качестве альтернативы, может быть желательным обеспечение компонентов фармацевтического состава по отдельности в двух или более контейнерах, например, один контейнер для препарата соединения киРНК, и по меньшей мере другой для соединения-носителя. Набор может быть упакован в виде нескольких различных конфигураций, таких как один или более контейнеров в одной коробке. Разные компоненты можно объединять, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно объединять в соответствии со способом, описанным в настоящем документе, например, для

приготовления и введения фармацевтической композиции. Набор также может включать устройство для доставки.

VII. Способы ингибирования экспрессии *C9orf72*

Согласно настоящему изобретению также предложены способы ингибирования экспрессии или снижения уровня гена *C9orf72* или транскрипта, ассоциированного с локусом *C9orf72*, в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с агентом РНКи, например, двухцепочечным агентом РНКи, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии или снижения уровня *C9orf72* или транскрипта, ассоциированного с локусом *C9orf72*, в клетке, что ингибирует экспрессию или снижает уровень *C9orf72* или снижает количество транскрипта, ассоциированного с локусом *C9orf72*, в клетке. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения *C9orf72* преимущественно ингибируется в клетках ЦНС (например, головного мозга).

Согласно некоторым вариантам реализации способы включают приведение клетки в контакт с двумя или более агентами на основе дцРНК, нацеленными на *C9orf72*. Согласно определенным вариантам реализации способов, включающих два или более агентов на основе дцРНК, указанные два или более агентов на основе дцРНК могут присутствовать в одной и той же композиции, в отдельных композициях или в любой их комбинации.

Согласно одному варианту реализации способов, которые включают приведение клетки в контакт с двумя или более агентами на основе дцРНК, нацеленными на *C9orf72*, по меньшей мере один агент на основе дцРНК нацелен на антисмысловую цепь *C9orf72* и по меньшей мере один агент на основе дцРНК нацелен на смысловую цепь *C9orf72*.

Согласно некоторым вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на смысловую цепь *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению, включающих два или более агентов на основе дцРНК, содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, выбранные из группы, состоящей из

а) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 5, 6, 10B и 10D;

б) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; или 62-84 SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

с) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5197-5219; 5226-5248; 5233-5255; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; или 6048-6070 SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере

15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

d) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

e) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; и

f) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 8, 9, 10B и 10D,

причем указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно определенным вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на смысловую цепь *C9orf72*, например, смысловую последовательность экзона или интрона *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению, включающих два или более агентов на основе дцРНК, представляют собой агенты на основе дцРНК, раскрытые в РСТ публикации WO 2021/119226, полное содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на антисмысловую цепь *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению, включающих два или более агентов на основе дцРНК, содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, выбранные из группы, состоящей из

a) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:13, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов,

отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

b) антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2, 3, 10A, 10C, 11 и 12; и

c) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336; 27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; или 27573717-27573739 SEQ ID NO: 13;

d) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-27573740 SEQ ID NO: 13, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

причем указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно некоторым вариантам реализации способы согласно настоящему изобретению включают приведение клетки в контакт с композицией, содержащей два или более, например 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, например, любыми двумя или более агентами на основе дцРНК, выбранными из группы агентов на основе дцРНК в Таблицах 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10A, 10B, 10C, 10D, 11 и 12.

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению, которые включают приведение клетки в контакт с двумя или более агентами на основе дцРНК, описанными в настоящем документе, например, любыми двумя или более, например, 2, 3 или 4, агентами на основе дцРНК, выбранными из группы агентов на основе дцРНК в Таблицах 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10A, 10B, 10C, 10D, 11 и 12, указанная клетка может быть приведена в контакт с первым агентом (или композицией, содержащей первый агент) в первый момент времени, со вторым агентом (или композицией, содержащей второй агент) во второй момент времени, третьим агентом (или композицией, содержащей третий агент) в третий момент времени и четвертым агентом (или композицией, содержащей четвертый агент) в четвертый момент времени; или указанная клетка может быть приведена в контакт со всеми агентами (или композицией, содержащей все агенты) одновременно. В качестве

альтернативы, клетка может быть приведена в контакт с первым агентом (или композицией, содержащей первый агент) в первый момент времени и вторым, третьим и/или четвертым агентом (или композицией, содержащей второй, третий и/или четвертый агент) во второй момент времени. Также предусмотрены другие комбинации приведения клетки в контакт с двумя или более агентами (или композициями, содержащими два или более агентов на основе дцРНК) согласно настоящему изобретению.

Приведение клетки в контакт с агентом РНКи, например, двухцепочечным агентом РНКи, можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт с агентом РНКи *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например, субъекта-человека, в контакт с агентом РНКи. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакт *in vitro* и *in vivo*.

Приведение клетки в контакт может быть прямым или опосредованным, как обсуждалось выше. Кроме того, приведение клетки в контакт может быть выполнено посредством нацеливающего лиганда, включая любой лиганд, описанный в настоящем документе или известный в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, лиганд GalNAc или любой другой лиганд, который направляет агент РНКи на представляющий интерес сайт.

Термин «ингибирование» в контексте настоящего документа используется взаимозаменяемо со «снижением», «сайленсингом», «отрицательной регуляцией», «подавлением» и другими подобными терминами и включает любой уровень ингибирования. Согласно определенным вариантам реализации уровень ингибирования, например, для агента РНКи согласно настоящему изобретению, можно оценить в условиях культуры клеток, например, в которых клетки в культуре клеток трансфицируют посредством трансфекции, опосредуемой LipofectamineTM, в концентрации 10 нМ или менее, 1 нМ или менее и т. д. вблизи клетки. Нокдаун в случае конкретного агента РНКи можно определить путем сравнения уровней до обработки в культуре клеток и уровней после обработки в культуре клеток, необязательно также путем сравнения с клетками, одновременно подвергнутыми обработке имеющей случайную последовательность формой или другой формой контрольного агента РНКи. Таким образом, нокдаун в культуре клеток, например, на примерно 50%, можно идентифицировать как свидетельство того, что произошло «ингибирование» или «снижение», «отрицательная регуляция» или «подавление» и т. д. Явным образом предусмотрено, что оценку уровней целевой мРНК или кодируемого белка (и, следовательно, степени «ингибирования» и т. д., вызванного агентом РНКи согласно настоящему изобретению) также можно оценивать в системах *in vivo* для агентов РНКи согласно настоящему изобретению в условиях, контролируемых надлежащим образом, как описано в данной области техники.

Выражение «ингибирование экспрессии гена *C9orf72*» или «ингибирование экспрессии *C9orf72*» в контексте настоящего документа включает ингибирование экспрессии или снижение уровня любого гена *C9orf72* (такого как, например, ген *C9orf72*

мышь, ген *C9orf72* крысы, ген *C9orf72* обезьяны или ген *C9orf72* человека), а также вариантов или мутантов гена *C9orf72*, который кодирует белок *C9orf72*, например, гена *C9orf72*, характеризующегося экспансией гексануклеотидного повтора в интроне гена. Таким образом, ген *C9orf72* может представлять собой ген *C9orf72* дикого типа, мутантный ген *C9orf72* или трансгенный ген *C9orf72* в контексте подвергнутой генетическим манипуляциям клетки, группы клеток или организма.

Выражение «снижение уровня или количества транскрипта, ассоциированного с локусом *C9orf72*» или «нокдаун транскрипта, ассоциированного с локусом *C9orf72*» включает ингибирование экспрессии или снижение уровня или количества в клетке антисмысловой цепи *C9orf72* или смысловой цепи *C9orf72* (например, транскрипта смысловой цепи или антисмысловой цепи *C9orf72*, характеризующегося экспансией гексануклеотидных повторов).

«Ингибирование экспрессии гена *C9orf72*» включает любой уровень ингибирования гена *C9orf72*, например, по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена *C9orf72*, такое как ингибирование по меньшей мере на 20%. Согласно определенным вариантам реализации ингибирование составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или предпочтительно по меньшей мере 50%. Согласно другим вариантам реализации ингибирование составляет не более 50%, например, не более 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%.

Экспрессию гена *C9orf72* можно оценить на основании уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена *C9orf72*, например, уровня мРНК *C9orf72* (например, смысловой мРНК, антисмысловой мРНК, общей мРНК *C9orf72*, содержащей повторы смысловой мРНК *C9orf72* и/или содержащей повторы антисмысловой мРНК *C9orf72*) или уровня белка *C9orf72* (например, общего белка *C9orf72*, белка *C9orf72* дикого типа или белка, характеризующегося экспансией повтора), или, например, уровня содержащих смысловую или антисмысловую цепь очагов и/или уровня aberrантного белка с дипептидными повторами.

Ингибирование можно оценить по уменьшению абсолютного или относительного уровня одной или более из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который используется в данной области техники, например, исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный у подобного субъекта, в клетке или образце, который не подвергают обработке или обрабатывают контролем (таким как, например, только контрольный буфер или контрольный неактивный агент).

Например, согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению экспрессия гена *C9orf72* (например, оцененная по содержащим смысловую или антисмысловую цепь очагам и/или уровню aberrантного белка с дипептидными повторами) ингибируется по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже уровня детектирования анализа. Согласно другим вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению экспрессия гена

C9orf72 (например, оцененная по уровню экспрессии мРНК или белка) ингибируется не более чем на 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%. Согласно определенным вариантам реализации способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии *C9orf72*, например, продемонстрированное клинически значимым исходом после лечения субъекта агентом для снижения экспрессии *C9orf72*.

Ингибирование экспрессии гена *C9orf72* может проявляться снижением количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которой ген *C9orf72* транскрибируется и которая подверглась обработке (например, путем приведения клетки или клеток в контакт с агентом РНКи согласно настоящему изобретению или путем введения агента РНКи согласно настоящему изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали) таким образом, что экспрессия гена *C9orf72* ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичной первой клетке или группе клеток, но не подвергшейся такой обработке (контрольная(ые) клетка(и), не обработанная(ые) агентом РНКи или не обработанная(ые) агентом РНКи, нацеленным на представляющий интерес ген). Степень ингибирования может быть выражена в виде:

$$\frac{(\text{РНК в контрольных клетках}) - (\text{РНК в обработанных клетках})}{\text{РНК в контрольных клетках}} \times 100\%$$

РНК в контрольных клетках

Согласно другим вариантам реализации ингибирование экспрессии гена *C9orf72* можно оценить по уменьшению параметра, который функционально связан с экспрессией гена *C9orf72*, например, экспрессией белка *C9orf72*, содержащими смысловую или бессмысловую цепь очагами и/или уровнем аберрантного белка с дипептидными повторами. Сайленсинг гена *C9orf72* можно определить в любой клетке, экспрессирующей *C9orf72*, будь то эндогенный или гетерологичный из конструкции для экспрессии, и с помощью любого анализа, известного в данной области техники.

Ингибирование экспрессии белка *C9orf72* может проявляться снижением уровня белка *C9orf72* (или функционального параметра, например, описанного в настоящем документе), который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объясняется выше, для оценки подавления мРНК ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогично выражено в виде процента от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Контрольная клетка или группа клеток, которую можно применять для оценки ингибирования экспрессии гена *C9orf72*, включает клетку или группу клеток, которая еще не была приведена в контакт с агентом РНКи согласно настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток может быть получена от отдельного

субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) до лечения субъекта агентом РНКи.

Уровень мРНК *C9orf72*, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определить с помощью любого способа, известного в данной области техники для оценки экспрессии мРНК. Согласно одному варианту реализации уровень экспрессии *C9orf72* в образце определяют путем детектирования транскрибированного полинуклеотида или его части, например, мРНК гена *C9orf72*. РНК может быть экстрагирована из клеток с применением методик экстракции РНК, включая, например, применение кислотной экстракции фенолом/гуанидинизотиоцианатом (RNazol B; Biogenesis), с помощью наборов для получения РНК RNeasy™ (Qiagen®) или RAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализа, в которых применяется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные кинетические анализы, ОТ-ПЦР, анализы с защитой от РНКаз, Нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализ с использованием микромассива. Специфичные в отношении цепи мРНК *C9orf72* можно детектировать с применением методов количественной ОТ-ПЦР и/или капельной цифровой ПЦР, описанных, например, в Jiang, *et al. выше*, Lagier-Tourenne, *et al., выше* и Jiang, *et al., выше*. Циркулирующую мРНК *C9orf72* можно детектировать с применением способов, описанных в WO2012/177906, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии *C9orf72* определяют с применением зонда на основе нуклеиновой кислоты. Термин «зонд» в контексте настоящего документа относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретной нуклеиновой кислотой или белком *C9orf72* или их фрагментом. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть намеренно сконструированы так, чтобы содержать метку. Примеры молекул, которые можно применять в качестве зондов, включают, но не ограничиваются ими, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную мРНК можно применять в анализах гибридизации или амплификации, которые включают, но не ограничиваются перечисленными, Саузерн- и Нозерн-анализы, анализы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и массивы зондов. Один способ определения уровней мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК *C9orf72*. Согласно одному варианту реализации мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем прогона выделенной мРНК на агарозном геле и переноса мРНК из геля в мембрану, такую как нитроцеллюлоза. Согласно альтернативному варианту реализации зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например, в генном чиповом массиве Affymetrix®. Специалист в данной области техники может легко адаптировать известные способы детектирования мРНК для применения в определении уровня мРНК *C9orf72*.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии *C9orf72* в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или применение обратной транскриптазы (для получения кДНК), например, для мРНК в образце, например, с помощью ОТ-ПЦР (экспериментальный вариант реализации, изложенный в Mullis, 1987, патент США № 4683202), цепную лигазную реакцию (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), самоподдерживаемую репликацию последовательности (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), систему транскрипционной амплификации (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-бета репликазу (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), репликацию по типу катящегося кольца (Lizardi *et al.*, патент США № 5854033) или любой другой способ амплификации нуклеиновых кислот с последующим детектированием амплифицированных молекул с применением методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Эти схемы детектирования особенно полезны для детектирования молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. Согласно конкретным аспектам настоящего изобретения уровень экспрессии *C9orf72* определяют с помощью количественной флуорогенной ОТ-ПЦР (т. е. системы TaqMan™), с помощью анализа люциферазы Dual-Glo® или с помощью другого способа, признанного в данной области техники, для измерения экспрессии *C9orf72* или уровня мРНК.

Уровень экспрессии мРНК *C9orf72* можно отслеживать с применением мембранного блоттинга (например, используемого в гибридизационном анализе, таком как Нозерн-, Саузерн-, дот-блот и т. п.), или микролунок, пробирок для образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии *C9orf72* также может включать применение зондов на основе нуклеиновых кислот в растворе.

Согласно некоторым вариантам реализации уровень экспрессии мРНК оценивают с помощью анализов разветвленной ДНК (bDNA) или ПЦР в режиме реального времени (кПЦР). Применение данного способа ПЦР описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в настоящем документе. Такие способы также можно применять для детектирования нуклеиновых кислот *C9orf72*.

Уровень экспрессии белка *C9orf72* можно определить с применением любого способа, известного в данной области техники для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одинарную или двойную), иммуноэлектрофорез, Вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА), иммунофлуоресцентные анализы,

электрохемилюминесцентные анализы и т.п. Такие анализы также можно применять для детектирования белков, указывающих на наличие или репликацию белков *C9orf72*.

Уровень содержащих смысловую или антисмысловую цепь очагов и уровень aberrантного белка с дипептидными повторами можно оценить с применением способов, хорошо известных обычному специалисту в данной области техники, включая, например, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), иммуногистохимию и иммуноанализ (см., например, Jiang, *et al. выше*). Согласно некоторым вариантам реализации эффективность способов согласно настоящему изобретению в лечении *C9orf72*-ассоциированного заболевания оценивают по уменьшению уровня мРНК *C9orf72* (например, путем оценки уровня *C9orf72* в образце СМЖ и/или образце плазмы крови, с помощью биопсии головного мозга или иным образом).

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению агент РНКи вводят субъекту таким образом, что агент РНКи доставляется в конкретный сайт в организме субъекта. Ингибирование экспрессии *C9orf72* можно оценить с использованием измерений уровня или изменения уровня мРНК *C9orf72* (например, смысловой мРНК, антисмысловой мРНК, общей мРНК *C9orf72*, содержащей повторы смысловой мРНК *C9orf72* и/или содержащей повторы антисмысловой мРНК *C9orf72*), белка *C9orf72* (например, общего белка *C9orf72*, белка *C9orf72* дикого типа или белка, характеризующегося экспансией повтора), содержащих смысловую цепь очагов, содержащих антисмысловую цепь очагов, aberrантного белка с дипептидными повторами в образце, полученном из конкретного сайта в организме субъекта, например, клетки ЦНС. Согласно определенным вариантам реализации способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии *C9orf72*, например, продемонстрированное клинически значимым исходом после лечения субъекта агентом для снижения экспрессии *C9orf72*, таким как, например, стабилизация или ингибирование атрофии хвостатого ядра (например, при оценке с помощью объемной МРТ (vMRI)); стабилизация или снижение уровней легкой цепи нейрофиламентов (Nfl) в образце СМЖ от субъекта, снижение мРНК мутантного *C9orf72* или расщепленного мутантного белка *C9orf72*, например, чего-либо одного или обоих из мРНК или белка полноразмерного мутантного *C9orf72* и мРНК или белка расщепленного мутантного *C9orf72*, и стабилизация или улучшение оценки по Единой шкале оценки *C9orf72*-ассоциированного заболевания (UHDRS).

В настоящем документе термины, относящиеся к детектированию или определению уровня аналита, следует понимать, как означающие выполнение этапов для определения присутствия материала, например, белка, РНК. В настоящем документе способы детектирования или определения включают детектирование или определение уровня аналита, который ниже уровня детектирования для используемого способа.

IX. Способы лечения или предотвращения *C9orf72*-ассоциированных заболеваний

Способы, раскрытые в настоящем документе, обеспечивают терапевтическое снижение синтеза белков с дипептидными повторами, основного патогенного компонента

заболевания, ассоциированного с экспансией повторов *C9orf72*, при сохранении мРНК *C9orf72*, что позволяет избежать возможных нежелательных эффектов снижения уровня белка *C9orf72*, которые могут возникать при терапевтических стратегиях, таких как применение антисмысловых олигонуклеотидов, которые нацелены на первичный транскрипт *C9orf72* в ядре.

Некоторые из способов, раскрытых в настоящем документе, предназначены для ингибирования экспрессии или снижения уровня целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, содержащий множество последовательных копий гексануклеотидного повтора, в клетке. Целевая РНК *C9orf72* может представлять собой, например, РНК с патогенной экспансией гексануклеотидного повтора (имеющую, например, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 35, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 200, по меньшей мере примерно 300, по меньшей мере примерно 400 или по меньшей мере примерно 500 копий гексануклеотидного повтора). Такие способы могут включать введение в клетку любого из агентов на основе дцРНК, раскрытых в настоящем документе, что ингибирует экспрессию целевой РНК *C9orf72* в клетке.

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложены способы применения агента РНКи согласно настоящему изобретению или композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей агент РНКи согласно настоящему изобретению, для снижения уровня одного или более РНК-транскриптов *C9orf72* в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с дцРНК, двумя или более агентами на основе дцРНК, например, 2, 3 или 4, согласно настоящему изобретению, композицией (например, фармацевтической композицией), содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, или двумя или более, например, 2, 3 или 4, композициями (такими как фармацевтические композиции), каждая из которых независимо содержит агент на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, и поддержание клетки в течение времени, достаточного для деградации мРНК-транскрипта гена *C9orf72*, что снижает уровень одного или более РНК-транскриптов *C9orf72* в клетке.

Кроме того, согласно настоящему изобретению также предложены способы применения агента РНКи согласно настоящему изобретению или композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей агент РНКи согласно настоящему изобретению, для снижения уровня и/или ингибирования образования содержащих смысловую и антисмысловую цепь очагов в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с дцРНК согласно настоящему изобретению, двумя или более дцРНК, например, 2, 3 или 4, согласно настоящему изобретению, композицией (такой как фармацевтическая композиция), содержащей две или более, например, 2, 3 или 4, дцРНК согласно настоящему изобретению, или двумя или более, например, 2, 3 или 4, композициями (такими как фармацевтические композиции), каждая из которых независимо содержит агент на основе

дцРНК согласно настоящему изобретению, что снижает уровень содержащих смысловую и антисмысловую цепь *C9orf72* очагов в клетке.

Согласно настоящему изобретению также предложены способы применения агента РНКи согласно настоящему изобретению или композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей агент РНКи согласно настоящему изобретению, для снижения уровня и/или ингибирования образования aberrантного белка с дипептидными повторами в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с дцРНК согласно настоящему изобретению, двумя или более дцРНК, например, 2, 3 или 4, согласно настоящему изобретению, композицией (такой как фармацевтическая композиция), содержащей две или более, например, 2, 3 или 4, дцРНК согласно настоящему изобретению, или двумя или более, например, 2, 3 или 4, композициями (такими как фармацевтические композиции), каждая из которых независимо содержит агент на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, что снижает уровень aberrантного белка с дипептидными повторами в клетке.

Такие способы могут дополнительно включать оценку экспрессии целевой РНК *C9orf72* в клетке и/или оценку экспрессии зрелой мРНК *C9orf72* в клетке. Оценка может быть выполнена, например, с помощью количественных полимеразных цепных реакций с обратной транскрипцией для детектирования целевой РНК *C9orf72*. Однако может быть использован любой другой подходящий способ.

В способах согласно настоящему изобретению клетка может быть приведена в контакт *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в организме субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации способы включают приведение клетки в контакт с двумя или более агентами на основе дцРНК, нацеленными на *C9orf72*. Согласно определенным вариантам реализации способов, включающих два или более агентов на основе дцРНК, указанные два или более агентов на основе дцРНК могут присутствовать в одной и той же композиции, в отдельных композициях или в любой их комбинации.

Согласно одному варианту реализации способов, которые включают приведение клетки в контакт с двумя или более агентами на основе дцРНК, нацеленными на *C9orf72*, по меньшей мере один агент на основе дцРНК нацелен на антисмысловую цепь *C9orf72* и по меньшей мере один агент на основе дцРНК нацелен на смысловую цепь *C9orf72*.

Согласно некоторым вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на смысловую цепь *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению, включающих два или более агентов на основе дцРНК, содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, выбранные из группы, состоящей из

а) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов,

отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5,

b) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16,

c) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 5, 6, 10B и 10D;

d) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; 62-84 или 69-91 SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

e) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5197-5219; 5223-5245; 5226-5248; 5227-5249; 5233-5255; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; или 6048-6070 SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

f) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO: 15, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

g) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO: 1, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; и

h) антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 8 и 9,

причем указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Согласно определенным вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на смысловую цепь *C9orf72*, например, смысловую последовательность экзона или интрона *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению, включающих два или более агентов на основе дцРНК, представляют собой агенты на основе дцРНК, раскрытые в РСТ публикации WO 2021/119226, полное содержание которой включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Согласно определенным вариантам реализации подходящие агенты, нацеленные на антисмысловую цепь *C9orf72*, для применения в способах согласно настоящему изобретению, включающих два или более агентов на основе дцРНК, содержат смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, выбранные из группы, состоящей из

a) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:13, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

b) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 17, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 18,

c) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 19, и антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 20,

d) антисмысловой цепи, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи в любой из Таблиц 2, 3, 10A, 10C, 11 и 12; и

e) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336; 27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; или 27573717-27573739 SEQ ID NO: 13;

f) смысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-27573740 SEQ ID NO: 13, и антисмысловой цепи, содержащей по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14,

причем указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

Согласно некоторым вариантам реализации способы согласно настоящему изобретению включают приведение клетки в контакт с двумя или более, например 2, 3 или 4, агентами на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, например, любыми двумя или более агентами на основе дцРНК, выбранными из группы агентов на основе дцРНК в Таблицах 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10A, 10B, 10C, 10D, 11 и 12.

Согласно некоторым вариантам реализации смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

Клетка, подходящая для обработки с применением способов согласно настоящему изобретению, может представлять собой любую клетку, которая экспрессирует ген *C9orf72*, или клетку, которая экспрессирует ген *C9orf72*, характеризующийся экспансией гексануклеотидный повтор (например, GGGGCC). Клетка, подходящая для применения в способах согласно настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или клетка примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетку животного, отличного от примата (такую как клетка крысы или клетка мыши). Согласно одному варианту реализации клетка представляет собой клетку человека, например, клетку ЦНС человека. Согласно некоторым вариантам реализации клетка представляет собой

эмбрионы на стадии одной клетки животного, отличного от человека, эмбриональные стволовые клетки животного, отличного от человека, двигательные нейроны, полученные из эмбриональных стволовых клеток, клетки головного мозга, кортикальные клетки, нейрональные клетки, мышечные клетки, клетки сердца или зародышевые клетки.

Согласно некоторым вариантам реализации клетка может содержать локус *C9orf72*, содержащий патогенную экспансию гексануклеотидных повторов. Патогенная экспансия гексануклеотидных повторов представляет собой экспансию, состоящую из нескольких повторов GGGGCC (SEQ ID NO: 100) в промежуточной последовательности, разделяющей два предполагаемых первых некодирующих экзона (экзоны 1A и 1B) в гене *C9orf72*, которое ассоциировано с одним или обоими из следующих патологических показателей: (1) смысловую и антисмысловую РНК, содержащую повторы, можно визуализировать как отдельные очаги в нейронах и других клетках; и (2) белки с дипептидными повторами, поли(глицин-аланин), поли(глицин-пролин), поли(глицин-аргинин), поли(аланин-пролин) и поли(пролин-аргинин), синтезированные посредством ассоциированной с повторами трансляции, зависимой от кодона, отличного от AUG, из смысловой и антисмысловой РНК, содержащей повторы, можно детектировать в клетках. Число повторов может представлять собой большее число повторов, чем обычно наблюдают в локусе у индивидуума, который не имеет *C9orf72* ALS или *C9orf72* FTD. В качестве альтернативы, патогенная экспансия гексануклеотидных повторов может представлять собой экспансию (т. е. число повторов) в локусе *C9orf72* от субъекта, имеющего *C9orf72* ALS или *C9orf72* FTD. Патогенная экспансия гексануклеотидных повторов имеет множество повторов GGGGCC (SEQ ID NO: 100). Например, патогенная экспансия гексануклеотидных повторов может иметь, например, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 35, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 200, по меньшей мере примерно 300, по меньшей мере примерно 400 или по меньшей мере примерно 500 копий гексануклеотидного повтора.

Клетка может представлять собой клетку (например, нейрон или двигательный нейрон) от субъекта, который имеет или который подвержен риску развития заболевания, ассоциированного с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*, включая, например, *C9orf72* ALS или *C9orf72* FTD.

Клетки в способах, раскрытых в настоящем документе, могут представлять собой клетки любого типа, содержащие локус *C9orf72*. Локус *C9orf72* может содержать последовательность с экспансией гексануклеотидных повторов или последовательность с патогенной экспансией гексануклеотидных повторов, описанную в другом месте настоящего документа. Последовательность с экспансией гексануклеотидных повторов может содержать более 100 повторов гексануклеотидной последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 100.

Последовательность с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72* обычно представляет собой нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере две

копии (т. е. два повтора) гексануклеотидной последовательности GGGGCC, изложенной в SEQ ID NO: 100. В некоторых последовательностях с экспансией гексануклеотидных повторов данные повторы являются последовательными (смежными друг с другом без промежуточной последовательности). Последовательность с экспансией повторов может быть расположена, например, между первым некодирующим эндогенным экзоном и экзоном 2 эндогенного локуса *C9orf72*.

Последовательность с экспансией гексануклеотидных повторов может иметь любое число повторов. Например, последовательность с экспансией повторов может содержать более чем примерно 95 повторов, более чем примерно 96 повторов, более чем примерно 97 повторов, более чем примерно 98 повторов, более чем примерно 99 повторов, более чем примерно 100 повторов, более чем примерно 101 повтор, более чем примерно 102 повтора, более чем примерно 103 повтора, более чем примерно 104 повтора, более чем примерно 105 повторов, более чем примерно 150 повторов, более чем примерно 200 повторов, более чем примерно 250 повторов, более чем примерно 295 повторов, более чем примерно 296 повторов, более чем примерно 297 повторов, более чем примерно 298 повторов, более чем примерно 299 повторов, более чем примерно 300 повторов, более чем примерно 301 повтор, более чем примерно 302 повтора, более чем примерно 303 повтора, более чем примерно 304 повтора, более чем примерно 305 повторов, более чем примерно 350 повторов, более чем примерно 400 повторов, более чем примерно 450 повторов, более чем примерно 500 повторов, более чем примерно 550 повторов, более чем примерно 595 повторов, более чем примерно 596 повторов, более чем примерно 597 повторов, более чем примерно 598 повторов, более чем примерно 599 повторов, более чем примерно 600 повторов, более чем примерно 601 повтор, более чем примерно 602 повтора, более чем примерно 603 повтора, более чем примерно 604 повтора или более чем примерно 605 повторов. В качестве альтернативы, последовательность с экспансией повторов может содержать по меньшей мере примерно 95 повторов, по меньшей мере примерно 96 повторов, по меньшей мере примерно 97 повторов, по меньшей мере примерно 98 повторов, по меньшей мере примерно 99 повторов, по меньшей мере примерно 100 повторов, по меньшей мере примерно 101 повтор, по меньшей мере примерно 102 повтора, по меньшей мере примерно 103 повтора, по меньшей мере примерно 104 повтора, по меньшей мере примерно 105 повторов, по меньшей мере примерно 150 повторов, по меньшей мере примерно 200 повторов, по меньшей мере примерно 250 повторов, по меньшей мере примерно 295 повторов, по меньшей мере примерно 296 повторов, по меньшей мере примерно 297 повторов, по меньшей мере примерно 298 повторов, по меньшей мере примерно 299 повторов, по меньшей мере примерно 300 повторов, по меньшей мере примерно 301 повтор, по меньшей мере примерно 302 повтора, по меньшей мере примерно 303 повтора, по меньшей мере примерно 304 повтора, по меньшей мере примерно 305 повторов, по меньшей мере примерно 350 повторов, по меньшей мере примерно 400 повторов, по меньшей мере примерно 450 повторов, по меньшей мере примерно 500 повторов, по меньшей мере примерно 550 повторов, по меньшей мере примерно 595 повторов, по меньшей мере

примерно 596 повторов, по меньшей мере примерно 597 повторов, по меньшей мере примерно 598 повторов, по меньшей мере примерно 599 повторов, по меньшей мере примерно 600 повторов, по меньшей мере примерно 601 повтор, по меньшей мере примерно 602 повтора, по меньшей мере примерно 603 повтора, по меньшей мере примерно 604 повтора или по меньшей мере примерно 605 повторов. В конкретном примере последовательность с экспансией гексануклеотидных повторов содержит более чем примерно 100 повторов, более чем примерно 300 повторов, более чем примерно 600 повторов, по меньшей мере примерно 100 повторов, по меньшей мере примерно 300 повторов или по меньшей мере примерно 600 повторов.

Клетки могут находится *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Например, клетки могут находиться *in vivo* в организме животного. Клетки или животные могут быть мужского или женского пола. Клетки или животные могут быть гетерозиготными или гомозиготными по последовательности с экспансией гексануклеотидных повторов, вставленной в эндогенный локус *C9orf72*. Диплоидный организм имеет два аллеля в каждом генетическом локусе. Каждая пара аллелей представляет генотип конкретного генетического локуса. Генотипы описаны как гомозиготные, если в конкретном локусе присутствуют два идентичных аллеля, и как гетерозиготные, если два аллеля отличаются. Животные, отличные от человека, могут содержать гетерологичную последовательность с экспансией гексануклеотидных повторов, вставленную в эндогенный локус *C9orf72* в их геноме зародышевой линии.

Экспрессия *C9orf72* (например, оцениваемая по уровню смысловой мРНК, антисмысловой мРНК, общей мРНК *C9orf72*, содержащей повторы смысловой мРНК *C9orf72*, содержащей повторы антисмысловой мРНК *C9orf72*, общего белка *C9orf72* и/или содержащего повторы белка *C9orf72*) ингибируется в клетке на примерно 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50%. Согласно предпочтительным вариантам реализации экспрессия *C9orf72* ингибируется не более чем на 50%, например, не более чем на 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5%.

Уменьшение экспрессии целевой РНК *C9orf72* может происходить на любую величину. Ингибирование, оцениваемое по содержащим смысловую или антисмысловую цепь очагам и/или уровню аберрантного белка с дипептидными повторами), ингибируется в клетке на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, предпочтительно по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже уровня детектирования анализа.

Согласно некоторым вариантам реализации агент на основе дцРНК может ингибировать экспрессию целевой РНК *C9orf72*, такой как целевая РНК *C9orf72*, содержащая гексануклеотидный повтор, на по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80% или по меньшей мере примерно 90% (или до точки, в которой целевая РНК *C9orf72* не детектируется). Например, указанные уровни ингибирования могут иметь место в течение примерно 1 дня, в течение примерно 2 дней, в

течение примерно 3 дней, в течение примерно 4 дней, в течение примерно 5 дней, в течение примерно 6 дней, в течение примерно недели или в течение примерно 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор. Уменьшение может происходить, например, относительно клетки до обработки агентом на основе дцРНК или относительно контрольной клетки, которую не обрабатывали агентом на основе дцРНК.

В некоторых из способов агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению селективно ингибируют экспрессию целевой РНК *C9orf72*, такой как целевая РНК *C9orf72*, содержащая гексануклеотидный повтор, по сравнению с экспрессией зрелой матричной РНК *C9orf72*. Зрелая матричная РНК *C9orf72* в этом контексте представляет собой РНК-транскрипт *C9orf72*, который был сплайсирован и процессирован. Зрелая матричная РНК *C9orf72* состоит исключительно из экзонов и все интроны удалены. Агент на основе дцРНК селективно ингибирует экспрессию целевой РНК *C9orf72*, содержащей интронный гексануклеотидный повтор, по сравнению с экспрессией зрелой матричной РНК *C9orf72*, если относительное уменьшение экспрессии целевой РНК *C9orf72* больше, чем относительное уменьшение экспрессии зрелой матричной РНК *C9orf72* после введения агента на основе дцРНК в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*. Например, в определенных вариантах реализации агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению ингибируют экспрессию зрелой матричной РНК *C9orf72* на менее чем примерно 50%, менее чем примерно 40%, менее чем примерно 30%, менее чем примерно 20%, менее чем примерно 10% или менее чем примерно 5% (или, например, не оказывают какого-либо статистически значимого или функционально значимого эффекта на экспрессию). Например, указанные уровни ингибирования могут иметь место в течение примерно 1 дня, в течение примерно 2 дней, в течение примерно 3 дней, в течение примерно 4 дней, в течение примерно 5 дней, в течение примерно 6 дней, в течение примерно недели или в течение примерно 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор. Уменьшение может происходить, например, относительно клетки до обработки агентом на основе дцРНК или относительно контрольной клетки, которую не обрабатывали агентом на основе дцРНК.

Некоторые из способов, раскрытых в настоящем документе, предназначены для снижения синтеза белка с дипептидными повторами или уровня агрегатов белка с дипептидными повторами в клетке. Такие способы могут включать введение в клетку любого из агентов на основе дцРНК, раскрытых в настоящем документе, двух или более дцРНК, например, 2, 3 или 4, согласно настоящему изобретению, композиции (такой как фармацевтическая композиция), содержащей два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, или двух или более, например, 2, 3 или 4, композиций (таких как фармацевтические композиции), каждая из которых независимо содержит агент на основе дцРНК согласно настоящему изобретению, что снижает синтез белка с дипептидными повторами или уровень агрегатов белка с дипептидными повторами в клетке.

Такие способы могут дополнительно включать оценку присутствия агрегатов белка с дипептидными повторами (например, поли(глицин-аланин), поли(глицин-пролин), поли(глицин-аргинин), поли(аланин-пролин) и поли(пролин-аргинин)) в клетке. В конкретном примере белок с дипептидными повторами может представлять собой поли(глицин-аланин) и/или поли(глицин-пролин). Оценка может быть выполнена, например, с помощью иммуногистохимического анализа или анализа методом Вестерн-блоттинга для детектирования агрегатов белка с дипептидными повторами. Однако может быть использован любой другой подходящий способ.

Уменьшение синтеза белка с дипептидными повторами или уровня агрегатов белка с дипептидными повторами может происходить на любую величину. Например, агент на основе дцРНК может снижать синтез белка с дипептидными повторами или уровень агрегатов белка с дипептидными повторами на по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80% или по меньшей мере примерно 90% (или до точки, в которой агрегаты белка с дипептидными повторами не детектируются). Например, указанные уровни ингибирования могут иметь место в течение примерно 1 дня, в течение примерно 2 дней, в течение примерно 3 дней, в течение примерно 4 дней, в течение примерно 5 дней, в течение примерно 6 дней, в течение примерно недели или в течение примерно 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор. Уменьшение может происходить, например, относительно клетки до обработки агентом на основе дцРНК или относительно контрольной клетки, которую не обрабатывали агентом на основе дцРНК.

Такие способы могут дополнительно включать оценку присутствия ядерных и/или цитоплазматических очагов смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72* в клетке.

Уменьшение присутствия ядерных и/или цитоплазматических очагов смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72* может происходить на любую величину. Например, агент на основе дцРНК может снижать присутствие ядерных и/или цитоплазматических очагов смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72* на по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80% или по меньшей мере примерно 90% (или до точки, в которой ядерные и/или цитоплазматические очаги смысловой и/или антисмысловой РНК *C9orf72* не детектируются). Например, указанные уровни ингибирования могут иметь место в течение примерно 1 дня, в течение примерно 2 дней, в течение примерно 3 дней, в течение примерно 4 дней, в течение примерно 5 дней, в течение примерно 6 дней, в течение примерно недели или в течение примерно 24-48 часов после введения в клетку, экспрессирующую целевую РНК *C9orf72*, содержащую гексануклеотидный повтор. Уменьшение может происходить, например, относительно

клетки до обработки агентом на основе дцРНК или относительно контрольной клетки, которую не обрабатывали агентом на основе дцРНК.

Способы *in vivo* согласно настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей агент РНКи, причем указанный агент РНКи содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена *C9orf72* млекопитающего, подлежащего лечению. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту вводят две или более, например, 2, 3 или 4, композиции, каждая из которых независимо содержит агент РНКи согласно настоящему изобретению. Композиции могут быть одинаковыми или разными. Согласно другим вариантам реализации субъекту вводят композицию, содержащую два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК, каждый из которых независимо нацелен на часть гена *C9orf72*.

Если подлежащий лечению организм представляет собой млекопитающее, такое как человек, композицию можно вводить с помощью любых способов, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными, пероральный, внутривентрикулярный или парентеральный пути, включая внутривентрикулярное (например, интравентрикулярное, внутривентрикулярное и интратекальное), внутривенное, внутримышечное, интравитреальное, подкожное, чрескожное, воздушное (аэрозольное), назальное, ректальное и местное (включая буккальное и подъязычное) введение. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят путем подкожной инъекции. Согласно определенным вариантам реализации композиции вводят посредством интратекальной инъекции.

Согласно некоторым вариантам реализации введение осуществляют посредством инъекции депо. Инъекция депо может высвобождать агент РНКи стабильным образом в течение продолжительного периода времени. Таким образом, инъекция депо может снижать частоту введения доз, необходимую для получения желаемого эффекта, например, желаемого ингибирования *C9orf72* или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо также может обеспечивать более стабильные концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. Согласно предпочтительным вариантам реализации инъекция депо представляет собой подкожную инъекцию.

Согласно некоторым вариантам реализации введение осуществляют с помощью насоса. Насос может представлять собой внешний насос или хирургически имплантированный насос. Согласно определенным вариантам реализации насос представляет собой подкожно имплантированный осмотический насос. Согласно другим вариантам реализации насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос можно использовать для внутривентрикулярных, внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. Согласно предпочтительным вариантам реализации инфузионный насос представляет собой насос для подкожной инфузии. Согласно другим вариантам

реализации насос представляет собой хирургически имплантированный насос, который доставляет агент РНКи в ЦНС.

Способ введения может быть выбран в зависимости от того, является ли желательным локальное или системное лечение, и в зависимости от области, подлежащей обработке. Путь и место введения могут быть выбраны так, чтобы улучшить нацеливание.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения также предложены способы ингибирования экспрессии гена *C9orf72* у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, которая нацелена на ген *C9orf72* в клетке млекопитающего, что ингибирует экспрессию гена *C9orf72* в клетке. Согласно некоторым вариантам реализации дцРНК присутствует в композиции, такой как фармацевтическая композиция. Согласно некоторым вариантам реализации млекопитающему вводят два или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации каждый агент на основе дцРНК, вводимый субъекту, независимо присутствует в композиции. Согласно другим вариантам реализации млекопитающему вводят композицию, содержащую две или более, например, 2, 3 или 4, дцРНК согласно настоящему изобретению.

Снижение экспрессии гена можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области техники, и способов, например, кОТ-ПЦР, описанных в настоящем документе.

Снижение продукции белка можно оценить с помощью любых способов, известных в данной области техники, и способов, например, ИФА, описанных в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации образец биопсии ЦНС или образец спинномозговой жидкости (СМЖ) служит в качестве тканевого материала для отслеживания снижения экспрессии гена или белка *C9orf72* (или, следовательно, прокси).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены способы лечения субъекта, нуждающегося в этом. Способы лечения согласно настоящему изобретению включают введение агента РНКи согласно настоящему изобретению субъекту, например, субъекту, который может получить пользу от ингибирования экспрессии *C9orf72*, такому как субъект, который имеет экспансированный нуклеотидный повтор GGGGCC в интроне гена *C9orf72*, в терапевтически эффективном количестве агента РНКи, нацеленного на ген *C9orf72*, или фармацевтической композиции, содержащей агент РНКи, нацеленный на ген *C9orf72*. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту вводят терапевтически эффективное количество двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации каждый агент на основе дцРНК, вводимый субъекту, независимо присутствует в композиции. Согласно другим вариантам реализации субъекту вводят композицию, содержащую две или более, например, 2, 3 или 4, дцРНК согласно настоящему изобретению.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложены способы предотвращения, лечения или ингибирования прогрессирования *C9orf72*-

ассоциированного заболевания или нарушения (например, C9orf72-ассоциированного нарушения) у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любого агента РНКи, например, агентов на основе дцРНК, или фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, что обеспечивает предотвращение, лечение или ингибирование прогрессирования C9orf72-ассоциированного заболевания или нарушения у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту вводят терапевтически эффективное количество двух или более, например, 2, 3 или 4, агентов на основе дцРНК согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации каждый агент на основе дцРНК, вводимый субъекту, независимо присутствует в композиции. Согласно другим вариантам реализации субъекту вводят композицию, содержащую две или более, например, 2, 3 или 4, дцРНК согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам реализации способы предназначены для лечения субъекта, страдающего заболеванием, состоянием или нарушением, ассоциированным с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*. Такие способы также могут быть предназначены для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, который может получить пользу от снижения экспрессии целевой РНК *C9orf72*, содержащей гексануклеотидный повтор, содержащий множество последовательных копий SEQ ID NO: 100 (например, у субъекта, который имеет или который подвержен риску развития заболевания, состояния или нарушения, ассоциированного с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*). Целевая РНК *C9orf72* может представлять собой, например, РНК с патогенной экспансией гексануклеотидных повторов (имеющую, например, по меньшей мере примерно 30, по меньшей мере примерно 35, по меньшей мере примерно 40, по меньшей мере примерно 50, по меньшей мере примерно 60, по меньшей мере примерно 70, по меньшей мере примерно 80, по меньшей мере примерно 100, по меньшей мере примерно 200, по меньшей мере примерно 300, по меньшей мере примерно 400 или по меньшей мере примерно 500 копий гексануклеотидного повтора). Заболевание, состояние или нарушение, ассоциированное с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*, представляет собой то, которое вызвано или ассоциировано с экспансией гексануклеотидного повтора (GGGGCC; SEQ ID NO: 100) в 5'-некодирующей части гена *C9orf72*. Примеры включают боковой амиотрофический склероз (ALS) и лобно-височную деменцию (FTD). Признаки или симптомы, ассоциированные с FTD и/или ALS, включают, но не ограничиваются перечисленными, зависимое от длины повтора образование очагов РНК, секвестрацию специфичных РНК-связывающих белков, а также накопление и агрегацию белков с дипептидными повторами (например, поли(глицин-аланин), поли(глицин-пролин), поли(глицин-аргинин), поли(аланин-пролин) и поли(пролин-аргинин)), полученных в результате ассоциированной с повторами трансляции с кодона, отличного от AUG (AUG), в нейронах. Агенты на основе дцРНК согласно настоящему изобретению можно применять в способах терапевтического лечения и/или предотвращения признаков или симптомов, ассоциированных с FTD и/или

ALS, включая, но не ограничиваясь перечисленными, признаки и симптомы заболевания двигательных нейронов и признаки и симптомы деменции. Признаки и симптомы заболевания двигательных нейронов могут включать, например, спотыкание, падение предметов, патологическую усталость рук и/или ног, невнятную речь, мышечные судороги и подергивания, неконтролируемые периоды смеха или плача, а также затрудненное дыхание. Признаки и симптомы деменции могут включать, например, поведенческие изменения, изменения личности, проблемы с речью и языком и проблемы, связанные с движением.

Согласно некоторым вариантам реализации способов согласно настоящему изобретению, которые включают введение двух или более агентов на основе дцРНК, описанных в настоящем документе, например, любых двух или более, например, 2, 3 или 4, из агентов на основе дцРНК, выбранных из группы агентов на основе дцРНК в Таблицах 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10А, 10В, 10С, 10D, 11 и 12, субъекту можно вводить первый агент (или композицию, содержащую первый агент) в первый момент времени, второй агент (или композицию, содержащую второй агент) во второй момент времени, третий агент (или композицию, содержащую третий агент) в третий момент времени и четвертый агент (или композицию, содержащую четвертый агент) в четвертый момент времени; или субъекту можно вводить все агенты (или композицию, содержащую все агенты) одновременно. В качестве альтернативы, субъекту можно вводить первый агент (или композицию, содержащую первый агент) в первый момент времени и второй, третий и/или четвертый агент (или композицию, содержащую второй, третий и/или четвертый агент) во второй момент времени. Также предусмотрены другие комбинации приведения клетки в контакт с двумя или более агентами согласно настоящему изобретению.

Агент РНКи согласно настоящему изобретению можно вводить в виде «свободного агента РНКи». Свободный агент РНКи вводят в отсутствие фармацевтической композиции. «Голый» агент РНКи может находиться в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. Согласно одному варианту реализации буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего агент РНКи, можно регулировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

В качестве альтернативы, агент РНКи согласно настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомальный состав дцРНК.

Субъекты, которые могут получить пользу от снижения или ингибирования экспрессии гена *C9orf72*, представляют собой субъектов, имеющих *C9orf72*-ассоциированное заболевание, например, *C9orf72*-ассоциированное заболевание. Примерные *C9orf72*-ассоциированные заболевания включают, но не ограничиваются перечисленными, ALS, FTD, *C9ALS/FTD* и синдром, подобный болезни Хантингтона, обусловленный экспансиями *C9orf72*, паркинсонизм, оливопонтномозжечковую

дегенерацию, кортикобазальный синдром или болезнь Альцгеймера, например, субъекты, имеющие экспансированный гексануклеотидный повтор GGGGCC в интроне гена *C9orf72*.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложены способы применения агента РНКи или содержащей указанный агент фармацевтической композиции, например, для лечения субъекта, который может получить пользу от снижения или ингибирования экспрессии *C9orf72*, например, субъекта, имеющего *C9orf72*-ассоциированное нарушение, в комбинации с другими фармацевтическими средствами или другими терапевтическими способами, например, с известными фармацевтическими средствами или известными терапевтическими способами, такими как, например, те, которые в настоящее время применяются для лечения этих нарушений. Например, в определенных вариантах реализации агент РНКи, нацеленный на *C9orf72*, вводят в комбинации, например, с агентом, пригодным для лечения *C9orf72*-ассоциированного нарушения, описанным в другом месте настоящего документа или иным образом известным в данной области техники. Например, дополнительные агенты, подходящие для лечения субъекта, который может получить пользу от снижения экспрессии *C9orf72*, например, субъекта, имеющего *C9orf72*-ассоциированное нарушение, могут включать агенты, применяемые в настоящее время для лечения *C9orf72*-ассоциированных заболеваний. Агент РНКи и дополнительные терапевтические агенты можно вводить одновременно или в одной и той же комбинации, например, интратекально, или дополнительный терапевтический агент можно вводить как часть отдельной композиции или в отдельные моменты времени или с помощью другого способа, известного в данной области техники или описанного в настоящем документе.

Примерные дополнительные терапевтические средства включают, например, ингибитор моноаминов, например, тетрабеназин (Ксеназин), дейтетрабеназин (Аустедо) и резерпин, противосудорожное средство, например, вальпроевую кислоту (депакот, депакен, депакон) и клоназепам (клонопин), антипсихотический агент, например, рисперидон (риспердал) и галоперидол (галдол), и антидепрессант, например, пароксетин (паксил).

Согласно одному варианту реализации способ включает введение композиции, охарактеризованной в настоящем документе, таким образом, что экспрессия целевого гена *C9orf72* уменьшается в течение по меньшей мере одного месяца. Согласно предпочтительным вариантам реализации экспрессия уменьшается в течение по меньшей мере 2 месяцев, 3 месяцев или 6 месяцев.

Предпочтительны агенты РНКи, пригодные для способов и композиций, охарактеризованных в настоящем документе, специфично нацелены на РНК (первичную или процессированную) целевого гена *C9orf72*. Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с применением агентов РНКи можно получать и выполнять, как описано в настоящем документе.

Введение дцРНК в соответствии со способами согласно настоящему изобретению может приводить к снижению тяжести, признаков, симптомов или маркеров таких

заболеваний или нарушений у пациента с *C9orf72*-ассоциированным нарушением. Под «снижением» в данном контексте подразумевается статистически значимое или клинически значимое уменьшение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или примерно 100%.

Эффективность лечения или предотвращения заболевания можно оценить, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптома, снижения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимой для поддержания терапевтического эффекта, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, подходящего для данного заболевания, которое лечат или которое является мишенью для предотвращения. Специалист в данной области техники может отслеживать эффективность лечения или предотвращения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения *C9orf72*-ассоциированного нарушения можно оценить, например, путем периодического отслеживания состояния субъекта. Сравнения более поздних показаний с первоначальными показаниями дают врачу показатель эффективности лечения. Специалист в данной области техники может отслеживать эффективность лечения или предотвращения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением агента РНКи, нацеленного на *C9orf72*, или его фармацевтической композиции, «эффективный против» *C9orf72*-ассоциированного нарушения указывает на то, что введение клинически подходящим образом приводит к благоприятному эффекту для по меньшей мере статистически значимой доли пациентов, например, улучшению симптомов, излечению, снижению интенсивности заболевания, продлению жизни, улучшению качества жизни, или другому эффекту, который в целом признан как положительный врачами, знакомыми с лечением *C9orf72*-ассоциированных нарушений и связанных с ними причин.

Терапевтический или профилактический эффект является очевидным, если наблюдается статистически значимое улучшение одного или более параметров статуса заболевания или отсутствие усугубления или отсутствие развития симптомов, которые можно было бы ожидать в противном случае. В качестве примера, благоприятное изменение по меньшей мере на 10% измеримого параметра заболевания и предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или более может указывать на эффективное лечение. Эффективность для данного лекарственного средства на основе агента РНКи или состава этого лекарственного средства также можно оценить с использованием экспериментальной модели на животных для данного заболевания, известной в данной области техники. При использовании экспериментальной модели на животных эффективность лечения подтверждается, если наблюдается статистически значимое снижение маркера или симптома.

В качестве альтернативы, эффективность может быть измерена по снижению степени тяжести заболевания, согласно определению специалистом в области диагностики

на основании клинически принятой шкалы оценки степени тяжести заболевания. Любое положительное изменение, приводящее, например, к уменьшению степени тяжести заболевания, измеренное с использованием подходящей шкалы, представляет надлежащее лечение с применением агента РНКи или состава агента РНКи, описанного в настоящем документе.

Субъектам можно вводить терапевтическое количество дцРНК, такое как от примерно 0,01 мг/кг до примерно 200 мг/кг.

Агент РНКи можно вводить интратекально, путем интравитреальной инъекции или путем внутривенной инфузии в течение определенного периода времени, на регулярной основе. Согласно определенным вариантам реализации после начального режима лечения средства лечения можно вводить менее часто. Введение агента РНКи может обеспечивать снижение уровней *C9orf72*, например, в клетке, ткани, крови, образце СМЖ или другом компартменте пациента. Согласно одному варианту реализации введение агента РНКи может обеспечивать снижение уровней *C9orf72*, например, в клетке, ткани, крови, образце СМЖ или другом компартменте пациента, не более чем на 50%.

Перед введением полной дозы агента РНКи пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% инфузионная реакция, и отслеживать нежелательные эффекты, такие как аллергическая реакция. В другом примере у пациента можно отслеживать нежелательные иммуностимулирующие эффекты, такие как повышенные уровни цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

В качестве альтернативы, агент РНКи можно вводить подкожно, т. е. путем подкожной инъекции. Одну или более инъекций можно применять для доставки субъекту желаемой, например, ежемесячной дозы агента РНКи. Инъекции можно повторять в течение некоторого периода времени. Введение можно повторять на регулярной основе. Согласно определенным вариантам реализации после начального режима лечения средства лечения можно вводить менее часто. Режим с повторными дозами может включать введение терапевтического количества агента РНКи на регулярной основе, например, ежемесячное введение или продление до одного раза в квартал, дважды в год, один раз в год. Согласно определенным вариантам реализации агент РНКи вводят от примерно одного раза в месяц до примерно одного раза в квартал (т. е. примерно один раз в три месяца).

Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящей заявке в значении, соответствующем обычному пониманию обычного специалиста в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Несмотря на то, что при практической реализации или тестировании агентов РНКи и способов, охарактеризованных в настоящем изобретении, могут применяться способы и материалы, сходные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, ниже описаны подходящие способы и материалы. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены посредством ссылки. В случае противоречия настоящее описание, включая определения,

имеет преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не предназначены для ограничения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Экспансия гексануклеотидных повторов в локусе гена *C9orf72*

Боковой амиотрофический склероз (ALS) и лобно-височная деменция (FTD) представляют собой разрушительные нейродегенеративные заболевания, которые вызывают заболевание двигательных нейронов в случае ALS и деменцию в случае FTD. Оба неизбежно смертельны. ALS и FTD могут представлять собой либо спонтанное, либо семейное (т. е. генетическое) заболевание. Наиболее частой генетической причиной ALS и FTD является экспансия гексануклеотидного повтора (GGGGCC; SEQ ID NO: 1) в 5'-некодирующей части гена *C9orf72*, который кодирует белок, функция которого не полностью понятна. У здоровых людей обычно имеется от нескольких до нескольких десятков гексануклеотидных повторов в их генах *C9orf72*, в то время как те, у кого развивается ALS и FTD, наследуют экспансию повторов от сотен до тысяч копий гексануклеотидного повтора только от одного из своих родителей. Генетические наблюдения позволяют предположить, что *C9orf72* ALS и FTD представляют собой преобладающие генетические заболевания и являются результатом приобретения патологической функции.

Неизвестно, как экспансия гексануклеотидных повторов *C9orf72* вызывает заболевание двигательных нейронов и деменцию, но два общих посмертных патологических наблюдения у пациентов с *C9orf72* ALS и FTLT ассоциированы с экспансией повторов: (1) смысловую и антисмысловую РНК, содержащую повторы, можно визуализировать как отдельные очаги в нейронах и других клетках посредством флуоресцентной гибридизации *in situ*; и (2) белки с дипептидными повторами, поли(глицин-аланин), поли(глицин-пролин), поли(глицин-аргинин), поли(аланин-пролин) и поли(пролин-аргинин), синтезированные посредством ассоциированной с повторами трансляции, зависимой от кодона, отличного от AUG, из смысловой и антисмысловой РНК, содержащей повторы, можно детектировать в клетках с помощью иммуногистохимии. Одна гипотеза, касающаяся заболевания, предполагает, что содержащие повторы РНК, визуализированные как очаги, нарушают метаболизм клеточных РНК путем блокирования РНК-связывающих белков. Вторая гипотеза, касающаяся заболевания, предполагает, что белки с дипептидными повторами оказывают широко распространенные токсические эффекты в отношении метаболизма РНК, протеостаза и нуклеоцитоплазматического транспорта. Оба патогенных механизма могут способствовать заболеванию. Если содержащие повторы РНК-транскрипты *C9orf72*, либо сами по себе, либо в качестве матриц для трансляции белков с дипептидными повторами, способствуют патогенезу при ALS и FTLT, то общая терапевтическая стратегия будет заключаться в разрушении РНК, содержащей повтор GGGGCC (смысловой РНК, содержащей повторы), и/или РНК, содержащей повторы GGCCCC (антисмысловой РНК, содержащей повторы), или

устранении ее способности транслироваться в смысловой и/или антисмысловой белок с дипептидными повторами.

Ген *C9orf72* продуцирует транскрипты с двух сайтов инициации транскрипции. Расположенный выше сайт иницирует транскрипцию с альтернативным некодирующим экзоном 1А, тогда как расположенный ниже сайт иницирует транскрипцию с альтернативным экзоном 1В. Оба экзона 1А и 1В могут быть сплайсированы до экзона 2, который содержит начало кодирующей белок последовательности. Патогенная экспансия гексануклеотидных повторов расположена между экзонами 1А и 1В. Таким образом, транскрипция, иницируемая с экзона 1А, может продуцировать РНК, содержащие повторы, тогда как инициация из экзона 1В - не может, если не проходит в антисмысловом направлении.

Как описано в РСТ заявке №: РСТ/US2020/064159, поданной 10 декабря 2020 г., чтобы смоделировать заболевание с экспансией повторов *C9orf72* у мышей, набор аллелей конструировали в эмбриональных стволовых (ES) клетках мыши, в которых фрагмент из гена *C9orf72* человека, включая часть экзона 1А, интронную последовательность между 1А и 1В, весь экзон 1В и часть расположенного ниже интрона, помещали точно в его гомологичное положение в одном аллеле гена *C9orf72* мыши. См., например, US 2018/0094267 и WO 2018/064600, каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. Набор экспансий гексануклеотидных повторов помещали в положение, обнаруженное в гене человека, которое варьировало от нормальных трех повторов до патологических 600 повторов.

Клоны ES-клеток мыши, несущие различные экспансии повторов, дифференцировали в двигательные нейроны в культуре для изучения эффектов экспансий на тип клеток, соответствующий ALS. При исследовании транскриптов, продуцируемых с генетически модифицированных гуманизированных аллелей *C9orf72*, обнаружили, что имело место переключение со сплайсированных транскриптов экзона 1В, которые преобладают в нормальном контроле с тремя повторами, на повышенное присутствие сплайсированных транскриптов экзона 1А в аллелях с более длинными экспансиями повторов. Также наблюдали накопление несплайсированных содержащих интрон транскриптов, содержание которых непосредственно коррелировало с длиной экспансии гексануклеотидных повторов, что позволяет предположить собственную прямую связь, при которой чем длиннее экспансия повторов, тем больше продуцируется транскриптов, содержащих повторы, из гена *C9orf72*. Нацеливание на содержащих повторы интронные транскрипты для разрушения или инактивации в качестве матриц для синтеза белков с дипептидными повторами при сохранении синтеза нормальной мРНК и белка *C9orf72*, как ожидается, будет безопасной и эффективной терапевтической стратегией для лечения заболевания, ассоциированного с экспансией повторов *C9orf72*.

Одним из возможных подходов к снижению уровня содержащих повторы РНК *C9orf72* является естественный процесс РНК-интерференции, в котором киРНК направляют расщепление целевой РНК посредством РНК-индуцированного комплекса сайленсинга с

последующим разрушением фрагментов расщепленной РНК с помощью клеточных нуклеаз. Однако РНК-интерференция представляет собой преимущественно цитоплазматический процесс, который, как ожидается, не будет воздействовать на РНК, хранящиеся в ядре. Содержащие интрон РНК обычно являются короткоживущими, либо в виде предшественников мРНК, которые быстро сплайсируются в зрелые мРНК, либо в виде сплайсированных интронов, которые быстро разрушаются в ядре. Следовательно, разумно ожидать, что содержащие интрон РНК не будут доступны для нацеливания посредством РНК-интерференции.

Однако было продемонстрировано, что киРНК, которые нацелены на интронные последовательности, прилегающие к экспансии повторов GGGGCC, способствовали снижению накопления содержащих интрон РНК *C9orf72*, оказывая при этом незначительное влияние на зрелую мРНК *C9orf72* или не оказывая его вовсе. Нацеленные на интрон киРНК также снижали продуцирование белков с дипептидными повторами. Эти неожиданные экспериментальные результаты показывают, что содержащие интрон РНК, которые накапливаются в клетках с экспансией гексануклеотидных повторов *C9orf72*, восприимчивы к РНК-интерференции. Результаты показывают, что значительная фракция содержащих интрон РНК *C9orf72*, ответственных за синтез белка с дипептидными повторами, находится в цитоплазме. Напротив, киРНК, которые были нацелены на кодирующую белок последовательность мРНК *C9orf72*, вызывали сильный нокдаун мРНК, но не оказывали влияния на содержащие интрон транскрипты и не снижали в значительной степени синтез белка с дипептидными повторами. Расхождение результатов между киРНК, нацеленными на интрон, и киРНК, нацеленными на мРНК, позволяет предположить, что два класса целевых последовательностей присутствуют в отдельных РНК, которые не связаны ковалентно.

Способы и композиции, раскрытые в настоящем документе, обеспечивают терапевтическое снижение синтеза белков с дипептидными повторами, основного патогенного компонента заболевания, ассоциированного с экспансией повторов *C9orf72*, при сохранении мРНК *C9orf72*, что позволяет избежать возможных нежелательных эффектов снижения уровня белка *C9orf72*, которые могут возникать при терапевтических стратегиях, таких как применение антисмысловых олигонуклеотидов, которые нацелены на первичный транскрипт *C9orf72* в ядре.

Пример 2. Разработка, синтез, отбор и оценка *in vitro* агентов РНКи

В данном примере описаны способы разработки, синтеза, отбора и оценки *in vitro* агентов РНКи *C9orf72*.

Источник реагентов

Если источник реагента конкретно не указан в настоящем документе, такой реагент может быть получен от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии при стандарте качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

Биоинформатика

киРНК, нацеленные на антисмысловую цепь интрона между экзонами 1А и 1В в гене *C9orf72* человека (номер доступа в GenBank NC_000009.12), конструировали с применением пользовательских скриптов R и Python. Подробные перечни немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей против *C9orf72* показаны в Таблице 2. Подробные перечни модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей против *C9orf72* показаны в Таблице 3.

киРНК, нацеленные на смысловую цепь экзона 1А гена *C9orf72* человека (номер доступа в GenBank NM_001256054.2), конструировали с применением пользовательских скриптов R и Python. киРНК, нацеленные на 3'-конец интронного повтора в смысловой цепи интрона между экзонами 1А и 1В в гене *C9orf72* человека (номер доступа в GenBank NG_031977.2), также конструировали с применением пользовательских скриптов R и Python. Подробные перечни немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей против *C9orf72* показаны в Таблице 5. Подробные перечни модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей против *C9orf72* показаны в Таблице 6.

Следует понимать, что по всей заявке название дуплекса без десятичного разделителя эквивалентно названию дуплекса с десятичным разделителем, которое просто ссылается на номер партии дуплекса. Например, AD-347430 является эквивалентом AD-347430.1.

Скрининг in vitro Cos-7 (вектор с двумя люциферазами psiCHECK2), BE(2)-C и Neuro-2a

Клеточная культура и трансфекции:

Cos-7 (АТСС) трансфицировали путем добавления 5 мкл 2 нг/мкл вектора psiCHECK2, несущего интрон 1 *C9orf72* (Blue Heron Biotechnology), разбавленного в Opti-MEM, 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл липофектамина 2000 на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 11668-019) к 5 мкл дуплексов киРНК на лунку с 4 повторами для каждого дуплекса киРНК в 384-луночный планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем в смесь киРНК добавляли тридцать пять мкл модифицированной Дульбекко среды Игла (ThermoFisher), содержащей $\sim 1 \times 10^3$ клеток. Клетки инкубировали в течение 48 часов с последующими измерениями уровня люциферазы светлячка (контроль трансфекции) и Renilla (слитой с целевой последовательностью). Выполняли эксперименты с использованием трех доз 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

Выделение общей РНК с помощью набора для выделения мРНК DYNABEADS:

РНК выделяли с применением автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с применением DYNABEAD (Invitrogen, № по каталогу 61012). В общих чертах, 70 мкл лизирующего/связывающего буфера и 10 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных частиц, добавляли в планшет с клетками. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной

температуре, а затем магнитные частицы захватывали и надосадочную жидкость удаляли. Связанную с гранулами РНК затем промывали 2 раза с использованием 150 мкл промывочного буфера А и один раз с использованием промывочного буфера В. Затем гранулы промывали с использованием 150 мкл элюирующего буфера, повторно захватывали и удаляли надосадочную жидкость.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК высокой емкости ABI (Applied Biosystems, Фостер-сити, Калифорния, США, № по каталогу 4368813):

Десять мкл мастер-смеси, содержащей 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X дНТФ, 1 мкл 10x случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H₂O на реакцию, добавляли к выделенной РНК, как описано выше. Планшеты запечатывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 минут при комнатной температуре с последующей 2-часовой инкубацией при 37°C.

ПЦР в режиме реального времени:

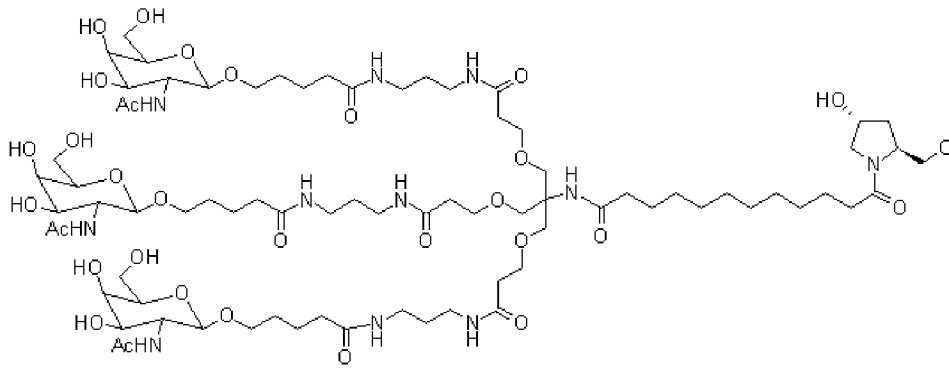
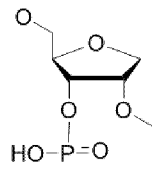
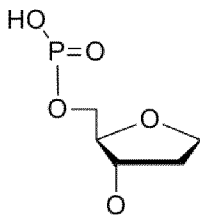
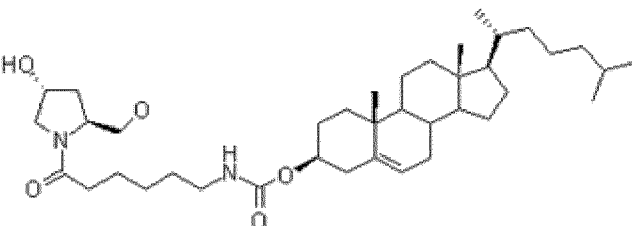
Два мкл кДНК и 5 мкл мастер-смеси зонда Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) добавляли либо к 0,5 мкл зонда GAPDH человека TaqMan (4326317E) и 0,5 мкл зонда *C9orf72* человека (Hs00376619_m1, Thermo), либо к 0,5 мкл зонда GAPDH мыши TaqMan (4352339E) и 0,5 мкл зонда *C9orf72* мыши (Mm01216837_m1, Thermo) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, № по каталогу 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали по меньшей мере два раза, и данные нормировали к клеткам, трансфицированным ненацеленной контрольной кРНК. Для расчета относительного кратного изменения данные, полученные в режиме реального времени, анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и нормировали к анализам, выполненным с клетками, трансфицированными ненацеленной контрольной кРНК.

Результаты скрининга агентов на основе дцРНК, перечисленных в Таблицах 2 и 3, в клетках Cos-7 показаны в Таблице 4 и на Фигурах 1 и 2. Результаты скрининга агентов на основе дцРНК, перечисленных в Таблицах 5 и 6, в клетках Cos-7 показаны в Таблице 7 и на Фигурах 3 и 4.

Таблица 1. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что указанные мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	Бета-L-аденозин-3'-фосфат
Abs	Бета-L-аденозин-3'-фосфотиоат
Af	2'-Фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-Фтораденозин-3'-фосфотиоат

As	Аденозин-3'-фосфотиоат
C	Цитидин-3'-фосфат
Cb	Бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cbs	Бета-L-цитидин-3'-фосфотиоат
Cf	2'-Фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-Фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	Цитидин-3'-фосфотиоат
G	Гуанозин-3'-фосфат
Gb	Бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	Бета-L-гуанозин-3'-фосфотиоат
Gf	2'-Фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-Фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	Гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-Метилуридин-3'-фосфотиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-Фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-Фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	Уридин-3'-фосфотиоат
N	любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь

L96	<p>N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил]-4-гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил)3</p> 
Y34	<p>2-гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (лишенная азотистого основания 2'-ОМе фураноза)</p> 
Y44	<p>инvertированная лишенная азотистых оснований ДНК (2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат)</p> 
L10	<p>N-(холестеринкарбоксамидокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-Chol)</p> 
(Agn)	S-изомер аденозингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Cgn)	S-изомер цитидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Ggn)	S-изомер гуанозингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
(Tgn)	S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
P	Фосфат
VP	Винилфосфонат

dA	2'-Дезоксиаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-Дезоксиаденозин-3'-фосфотиоат
dC	2'-Дезоксицитидин-3'-фосфат
dCs	2'-Дезоксицитидин-3'-фосфотиоат
dG	2'-Дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-Дезоксигуанозин-3'-фосфотиоат
dT	2'-Дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-Дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-Дезоксиуридин
dUs	2'-Дезоксиуридин-3'-фосфотиоат
(C2p)	Цитидин-2'-фосфат
(G2p)	Гуанозин-2'-фосфат
(U2p)	Уридин-2'-фосфат
(A2p)	Аденозин-2'-фосфат
(Ahd)	2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат
(Ahds)	2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфотиоат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфотиоат
(Ghd)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфат
(Ghds)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфотиоат

Таблица 2. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК, нацеленных на антисмысловую цепь интрона 1a *C9orf72* человека

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон в NG_3197 7.2	Диапазон в NC_000009.1 2	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон в NG_31977.2	Диапазон в NC_000009 .12
AD-1446206.1	CCGAGGCUCCCUUU UCUCGAA		5761-5781	27573086- 27573106	UUCGAGAAAAGGG AGCCUCGGGU		5761-5783	27573084- 27573106
AD-1446207.1	AGGCAAUCCACCA GUCGCUA		5591-5611	27573256- 27573276	UAGCGACUGGUGG AAUUGCCUGC		5591-5613	27573254- 27573276
AD-1446208.1	CACCAGUCGCUAGA GGCGAAA		5582-5602	27573265- 27573285	UUUCGCCUCUAGC GACUGGUGGA		5582-5604	27573263- 27573285
AD-1446209.1	ACCAGUCGCUAGAG GCGAAAA		5581-5601	27573266- 27573286	UUUUCGCCUCUAG CGACUGGUGG		5581-5603	27573264- 27573286
AD-1446210.1	CACCCAGCUUCGGU CAGAGAA		5555-5575	27573292- 27573312	UUCUCUGACCGAA GCUGGGUGUC		5555-5577	27573290- 27573312
AD-1446211.1	CCCAGCUUCGGUCA GAGAAAA		5553-5573	27573294- 27573314	UUUUCUCUGACCG AAGCUGGGUG		5553-5575	27573292- 27573314
AD-1446212.1	CAGCUUCGGUCAGA GAAAUGA		5551-5571	27573296- 27573316	UCAUUUCUCUGAC CGAAGCUGGG		5551-5573	27573294- 27573316
AD-1446213.1	GCUUCGGUCAGAGA AAUGAGA		5549-5569	27573298- 27573318	UCUCAUUUCUCUG ACCGAAGCUG		5549-5571	27573296- 27573318

AD-1446214.1	UCGGUCAGAGAAAU GAGAGGA		5546-5566	27573301- 27573321	UCCUCUCAUUUCU CUGACCGAAG		5546-5568	27573299- 27573321
AD-1446215.1	GGUCAGAGAAAUGA GAGGGAA		5544-5564	27573303- 27573323	UUCCCUCUCAUUU CUCUGACCGA		5544-5566	27573301- 27573323
AD-1446216.1	UCAGAGAAAUGAGA GGGAAAA		5542-5562	27573305- 27573325	UUUUCCCUCUCAU UUCUCUGACC		5542-5564	27573303- 27573325
AD-1446217.1	AGAGGGAAAGUAAA AAUGCGA		5531-5551	27573316- 27573336	UCGCAUUUUUACU UUCCCUCUCA		5531-5553	27573314- 27573336
AD-1446218.1	GAGGGAAAGUAAAA AUGCGUA		5530-5550	27573317- 27573337	UACGCAUUUUUAC UUUCCCUCUC		5530-5552	27573315- 27573337
AD-1446219.1	AGGGAAAGUAAAAA UGCGUCA		5529-5549	27573318- 27573338	UGACGCAUUUUUA CUUCCCUCUC		5529-5551	27573316- 27573338
AD-1446220.1	GGGAAAGUAAAAAU GCGUCGA		5528-5548	27573319- 27573339	UCGACGCAUUUUU ACUUCCCUC		5528-5550	27573317- 27573339
AD-1446221.1	GGAAAGUAAAAAUG CGUCGAA		5527-5547	27573320- 27573340	UUCGACGCAUUUU UACUUCCCUC		5527-5549	27573318- 27573340
AD-1446222.1	GAAAGUAAAAAUGC GUCGAGA		5526-5546	27573321- 27573341	UCUCGACGCAUUU UUACUUCCC		5526-5548	27573319- 27573341
AD-1446223.1	AAAGUAAAAAUGCG UCGAGCA		5525-5545	27573322- 27573342	UGCUCGACGCAUU UUUACUUCC		5525-5547	27573320- 27573342
AD-1446224.1	AAGUAAAAAUGCGU CGAGCUA		5524-5544	27573323- 27573343	UAGCUCGACGCAU UUUUACUUUC		5524-5546	27573321- 27573343

AD-1446225.1	AGUAAAAAUGCGUC GAGCUCA		5523-5543	27573324- 27573344	UGAGCUCGACGCA UUUUUACUUU		5523-5545	27573322- 27573344
AD-1446226.1	CGACUCCUGAGUUC CAGAGCA		5293-5313	27573554- 27573574	UGCUCUGGAACUC AGGAGUCGCG		5293-5315	27573552- 27573574
AD-1446227.1	GACUCCUGAGUUC AGAGCUA		5292-5312	27573555- 27573575	UAGCUCTGGAACU CAGGAGUCGC		5292-5314	27573553- 27573575
AD-1446228.1	ACUCCUGAGUUCCA GAGCUUA		5291-5311	27573556- 27573576	UAAGCUCUGGAAC UCAGGAGUCG		5291-5313	27573554- 27573576
AD-1446229.1	CUCCUGAGUUCAG AGCUUGA		5290-5310	27573557- 27573577	UCAAGCTCUGGAA CUCAGGAGUC		5290-5312	27573555- 27573577
AD-1446230.1	UCCUGAGUUCAG GCUUGCA		5289-5309	27573558- 27573578	UGCAAGCUCUGGA ACUCAGGAGU		5289-5311	27573556- 27573578
AD-1446231.1	CCUGAGUUCAGAG CUUGCUA		5288-5308	27573559- 27573579	UAGCAAGCUCUGG AACUCAGGAG		5288-5310	27573557- 27573579
AD-1446232.1	GAGUUCAGAGCUU GCUACAA		5285-5305	27573562- 27573582	UUGUAGCAAGCUC UGGAACUCAG		5285-5307	27573560- 27573582
AD-1446233.1	AGUUCAGAGCUUG CUACAGA		5284-5304	27573563- 27573583	UCUGUAGCAAGCU CUGGAACUCA		5284-5306	27573561- 27573583
AD-1446234.1	GUUCAGAGCUUGC UACAGGA		5283-5303	27573564- 27573584	UCCUGUAGCAAGC UCUGGAACUC		5283-5305	27573562- 27573584
AD-1446235.1	UUCAGAGCUUGCU ACAGGCA		5282-5302	27573565- 27573585	UGCCUGTAGCAAG CUCUGGAACU		5282-5304	27573563- 27573585

AD-1446236.1	UCCAGAGCUUGC CAGGCUA		5281-5301	27573566- 27573586	UAGCCUGUAGCA GCUCUGGAAC		5281-5303	27573564- 27573586
AD-1446237.1	CCAGAGCUUGC AGGCUGA		5280-5300	27573567- 27573587	UCAGCCTGUAGCA AGCUCUGGAA		5280-5302	27573565- 27573587
AD-1446238.1	CAGAGCUUGC GGCUGCA		5279-5299	27573568- 27573588	UGCAGCCUGUAGC AAGCUCUGGA		5279-5301	27573566- 27573588
AD-1446239.1	UACAGGCUGC GUUCCA		5269-5289	27573578- 27573598	UGGAAACAACCGC AGCCUGUAGC		5269-5291	27573576- 27573598
AD-1446240.1	GCUGCGGUUG CCUCCUA		5264-5284	27573583- 27573603	UAGGAGGGAAACA ACCGCAGCCU		5264-5286	27573581- 27573603
AD-1446241.1	CUGCGGUUG CUCCUUA		5263-5283	27573584- 27573604	UAAGGAGGGAAAC AACCGCAGCC		5263-5285	27573582- 27573604
AD-1446242.1	GCGGUUGUU CCUUGUA		5261-5281	27573586- 27573606	UACAAGGAGGGAA ACAACCGCAG		5261-5283	27573584- 27573606
AD-1446243.1	CGGUUGUU CUUGUUA		5260-5280	27573587- 27573607	UAACAAGGAGGGA ACAACCGCA		5260-5282	27573585- 27573607
AD-1446244.1	GUUGUU UGUUUUA		5258-5278	27573589- 27573609	UAAAACAAGGAGG GAAACAACCG		5258-5280	27573587- 27573609
AD-1446245.1	UUGUU GUUUUCA		5257-5277	27573590- 27573610	UGAAAACAAGGAG GGAAACAACC		5257-5279	27573588- 27573610
AD-1446246.1	UUCCUCCU UCUUCUA		5253-5273	27573594- 27573614	UAGAAGAAAACAA GGAGGGAAAC		5253-5275	27573592- 27573614

AD-1446247.1	UCCCUCCUUGUUUU CUUCUGA		5252-5272	27573595- 27573615	UCAGAAGAAAACA AGGAGGGAAA		5252-5274	27573593- 27573615
AD-1446248.1	CCCUCCUUGUUUUC UUCUGGA		5251-5271	27573596- 27573616	UCCAGAAGAAAAC AAGGAGGGAA		5251-5273	27573594- 27573616
AD-1446249.1	CCUCCUUGUUUUCU UCUGGUA		5250-5270	27573597- 27573617	UACCAGAAGAAAA CAAGGAGGGA		5250-5272	27573595- 27573617
AD-1446250.1	CUCCUUGUUUUCU CUGGUUA		5249-5269	27573598- 27573618	UAACCAGAAGAAA ACAAGGAGGG		5249-5271	27573596- 27573618
AD-1446251.1	CCUUGUUUUCUUCU GGUAAA		5247-5267	27573600- 27573620	UUUAACCAGAAGA AAACAAGGAG		5247-5269	27573598- 27573620
AD-1446252.1	CUUGUUUUCUUCUG GUAAUA		5246-5266	27573601- 27573621	UAUUAACCAGAAG AAAACAAGGA		5246-5268	27573599- 27573621
AD-1446253.1	UUGUUUUCUUCUGG UUAUCA		5245-5265	27573602- 27573622	UGAUUAACCAGAA GAAAACAAGG		5245-5267	27573600- 27573622
AD-1446254.1	UGUUUUCUUCUGGU UAAUCUA		5244-5264	27573603- 27573623	UAGAUUAACCAGA AGAAAACAAG		5244-5266	27573601- 27573623
AD-1446255.1	GUUUUCUUCUGGU AAUCUUA		5243-5263	27573604- 27573624	UAAGAUUAACCAG AAGAAAACAA		5243-5265	27573602- 27573624
AD-1446256.1	UUCUUCUGGUUAAU CUUUAUA		5240-5260	27573607- 27573627	UAUAAAGAUU AAC CAGAAGAAA		5240-5262	27573605- 27573627
AD-1446257.1	UCUUCUGGUUAAUC UUUAUCA		5239-5259	27573608- 27573628	UGAUUAAGAUUAA CCAGAAGAAA		5239-5261	27573606- 27573628

AD-1446258.1	CUUCUGGUUAAUCU UUAUCA		5238-5258	27573609- 27573629	UUGAUAAAGAUUA ACCAGAAGAA		5238-5260	27573607- 27573629
AD-1446259.1	UUCUGGUUAAUCUU UAUCAGA		5237-5257	27573610- 27573630	UCUGAUAAAGAUU AACCAGAAGA		5237-5259	27573608- 27573630
AD-1446260.1	UCUGGUUAAUCUUU AUCAGGA		5236-5256	27573611- 27573631	UCCUGAUAAAGAU UAACCAGAAG		5236-5258	27573609- 27573631
AD-1446261.1	CUGGUUAAUCUUUA UCAGGUA		5235-5255	27573612- 27573632	UACCUGAUAAAGA UUAACCAGAA		5235-5257	27573610- 27573632
AD-1446262.1	UGGUUAAUCUUUAU CAGGUCA		5234-5254	27573613- 27573633	UGACCUGAUAAAG AUUAACCAGA		5234-5256	27573611- 27573633
AD-1446263.1	GUUAAUCUUUAUCA GGUCUUA		5232-5252	27573615- 27573635	UAAGACCUGAUAA AGAUUAACCA		5232-5254	27573613- 27573635
AD-1446264.1	UUAUCUUUAUCAG GUCUUUA		5231-5251	27573616- 27573636	UAAAGACCUGAUA AAGAUUAACC		5231-5253	27573614- 27573636
AD-1446265.1	AAUCUUUAUCAGGU CUUUUCA		5229-5249	27573618- 27573638	UGAAAAGACCUGA UAAAGAUUAA		5229-5251	27573616- 27573638
AD-1446266.1	AUCUUUAUCAGGUC UUUUCUA		5228-5248	27573619- 27573639	UAGAAAAGACCUG AUAAAGAUUA		5228-5250	27573617- 27573639
AD-1446267.1	UCUUUAUCAGGUCU UUUCUUA		5227-5247	27573620- 27573640	UAAGAAAAGACCU GAUAAAGAUU		5227-5249	27573618- 27573640
AD-1446268.1	CUUUAUCAGGUCUU UUCUUGA		5226-5246	27573621- 27573641	UCAAGAAAAGACC UGAUAAAGAU		5226-5248	27573619- 27573641

AD-1446269.1	UUUAUCAGGUCUUU UCUUGUA		5225-5245	27573622- 27573642	UACAAGAAAAGAC CUGAUAAAGA		5225-5247	27573620- 27573642
AD-1446270.1	UUAUCAGGUCUUUU CUUGUUA		5224-5244	27573623- 27573643	UAACAAGAAAAGA CCUGAUAAAG		5224-5246	27573621- 27573643
AD-1446271.1	UAUCAGGUCUUUUC UUGUUCA		5223-5243	27573624- 27573644	UGAACAAGAAAAG ACCUGAUAAA		5223-5245	27573622- 27573644
AD-1446272.1	AUCAGGUCUUUUCU UGUUCAA		5222-5242	27573625- 27573645	UUGAACAAGAAAA GACCUGAUAA		5222-5244	27573623- 27573645
AD-1446273.1	UCAGGUCUUUUCUU GUUCACA		5221-5241	27573626- 27573646	UGUGAACAAGAAA AGACCUGAUA		5221-5243	27573624- 27573646
AD-1446274.1	CAGGUCUUUUCUUG UUCACCA		5220-5240	27573627- 27573647	UGGUGAACAAGAA AAGACCUGAU		5220-5242	27573625- 27573647
AD-1446275.1	GGUCUUUUCUUGUU CACCCUA		5218-5238	27573629- 27573649	UAGGGUGAACAAG AAAAGACCUG		5218-5240	27573627- 27573649
AD-1446276.1	UCUUUUCUUGUUCA CCCUCAA		5216-5236	27573631- 27573651	UUGAGGGUGAACA AGAAAAGACC		5216-5238	27573629- 27573651
AD-1446277.1	CUUUUCUUGUUCAC CCUCAGA		5215-5235	27573632- 27573652	UCUGAGGGUGAAC AAGAAAAGAC		5215-5237	27573630- 27573652
AD-1446278.1	UUUUCUUGUUCACC CUCAGCA		5214-5234	27573633- 27573653	UGCUGAGGGUGAA CAAGAAAAGA		5214-5236	27573631- 27573653
AD-1446279.1	UUCUUGUUCACCCU CAGCGAA		5212-5232	27573635- 27573655	UUCGCUGAGGGUG ACAAGAAAA		5212-5234	27573633- 27573655

AD-1446280.1	CCUCAGCGAGUACU GUGAGAA		5201-5221	27573646- 27573666	UUCUCACAGUACU CGCUGAGGGU		5201-5223	27573644- 27573666
AD-1446281.1	UCAGCGAGUACUGU GAGAGCA		5199-5219	27573648- 27573668	UGCUCUCACAGUA CUCGCUGAGG		5199-5221	27573646- 27573668
AD-1446282.1	CAGCGAGUACUGUG AGAGCAA		5198-5218	27573649- 27573669	UUGCUCTCACAGU ACUCGCUGAG		5198-5220	27573647- 27573669
AD-1446283.1	AGCGAGUACUGUGA GAGCAA		5197-5217	27573650- 27573670	UUUGCUCUCACAG UACUCGCUGA		5197-5219	27573648- 27573670
AD-1446284.1	GCGAGUACUGUGAG AGCAAGA		5196-5216	27573651- 27573671	UCUUGCTCUCACAG UACUCGCUG		5196-5218	27573649- 27573671
AD-1446285.1	CGAGUACUGUGAGA GCAAGUA		5195-5215	27573652- 27573672	UACUUGCUCUCAC AGUACUCGCU		5195-5217	27573650- 27573672
AD-1446286.1	GAGUACUGUGAGAG CAAGUAA		5194-5214	27573653- 27573673	UUACUUGCUCUCA CAGUACUCGC		5194-5216	27573651- 27573673
AD-1446287.1	AGUACUGUGAGAGC AAGUAGA		5193-5213	27573654- 27573674	UCUACUUGCUCUC ACAGUACUCG		5193-5215	27573652- 27573674
AD-1446288.1	UACUGUGAGAGCAA GUAGUGA		5191-5211	27573656- 27573676	UCACUACUUGCUC UCACAGUACU		5191-5213	27573654- 27573676
AD-1446289.1	AAAACAAAAACACA CACCUC		5155-5175	27573692- 27573712	UGAGGUGUGUGUU UUUGUUUUUC		5155-5177	27573690- 27573712
AD-1446290.1	ACACCUCCUAAACC CACACCA		5142-5162	27573705- 27573725	UGGUGUGGGUUUA GGAGGUGUGU		5142-5164	27573703- 27573725

AD-1446291.1	ACCUCCUAAACCCA CACCUGA		5140-5160	27573707- 27573727	UCAGGUGUGGGUU UAGGAGGUGU		5140-5162	27573705- 27573727
AD-1446292.1	CUCCUAAACCCACA CCUGCUA		5138-5158	27573709- 27573729	UAGCAGGUGUGGG UUUAGGAGGU		5138-5160	27573707- 27573729
AD-1446293.1	CCACACCUGCUCUU GCUAGAA		5129-5149	27573718- 27573738	UUCUAGCAAGAGC AGGUGUGGGU		5129-5151	27573716- 27573738
AD-1446294.1	CACACCUGCUCUUG CUAGACA		5128-5148	27573719- 27573739	UGUCUAGCAAGAG CAGGUGUGGG		5128-5150	27573717- 27573739
AD-1446295.1	ACACCUGCUCUUGC UAGACCA		5127-5147	27573720- 27573740	UGGUCUAGCAAGA GCAGGUGUGG		5127-5149	27573718- 27573740

Таблица 3. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК, нацеленных на антисмысловую цепь интрона 1a *C9orf72* человека

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:
AD-1446206.1	cscsgag(Ghd)CfuCfCfCfuuuucuc gsasa		VPusUfscgaGfaAfaFagggAfgCfcuc ggsgsu		ACCCGAGGCUCCCUUUUCU CGAG	
AD-1446207.1	asgsgca(Ahd)UfuCfCfAfccagucg csusa		VPusAfsngcGfcUfGfguggAfaUfugc cusgsc		GCAGGCAAUCCACCAGUC GCUA	
AD-1446208.1	csasca(Ghd)UfcGfCfUfagaggcg asasa		VPusUfsucgc(C2p)ucuagcGfaCfugg ugsgsa		UCCACCAGUCGCUAGAGGC GAAA	
AD-1446209.1	ascscag(Uhd)CfgCfUfAfgaggcga asasa		VPusUfsuucg(C2p)cucuagCfgAfcug gusgsg		CCACCAGUCGCUAGAGGCG AAAG	

AD-1446210.1	csasccc(Ahd)GfcUfUfCfggucagagsasa	VPusUfscucu(G2p)accgaaGfcUfgggugsusc	GACACCCAGCUUCGGUCAGAGAA
AD-1446211.1	cscscag(Chd)UfuCfGfGfucagagagasasa	VPusUfsuucu(C2p)ugaccgAfaGfcugggsusg	CACCCAGCUUCGGUCAGAGAAAU
AD-1446212.1	csasgcu(Uhd)CfGfUfCfagagaaausgsa	VPusCfsauuu(C2p)ucugacCfGfagcugsgsg	CCCAGCUUCGGUCAGAGAAUGA
AD-1446213.1	gscsuuc(Ghd)GfuCfAfGfagaaaugasgsa	VPusCfsucaUfuUfCfucugAfcCfgaagcsusg	CAGCUUCGGUCAGAGAAAUGAGA
AD-1446214.1	uscsggu(Chd)AfgAfGfAfaaugagagsgsa	VPusCfscucu(C2p)auuucuCfuGfaccgasasg	CUUCGGUCAGAGAAAUGAGAGGG
AD-1446215.1	gsgsuca(Ghd)AfgAfAfAfugagagaggsasa	VPusUfscucu(C2p)ucauuuUfuCfugaccsgsa	UCGGUCAGAGAAAUGAGAGAGGAA
AD-1446216.1	uscsgaga(Ghd)AfaAfUfGfagagggagasasa	VPusUfsuucc(C2p)ucucauUfuCfucugascsc	GGUCAGAGAAAUGAGAGAGGAAAG
AD-1446217.1	asgsagg(Ghd)AfaAfGfUfaaaaaugcsgsa	VPusCfsgcaUfuUfUfuacuUfuCfcccuscasa	UGAGAGGGAAAGUAAAAAAUGCGU
AD-1446218.1	gsasggg(Ahd)AfaGfUfAfaaaaugcgsusa	VPusAfsccgAfuUfUfuuuacUfuUfcccucsusc	GAGAGGGAAAGUAAAAAAUGCGUC
AD-1446219.1	asgsagg(Ahd)AfgUfAfAfaaaugcguscsa	VPusGfsaccCfaUfUfuuuuacUfuUfcccuscsu	AGAGGGAAAGUAAAAAAUGCGUCG
AD-1446220.1	gsgsgaa(Ahd)GfuAfAfAfaaugcgucsgsa	VPusCfsgacGfcAfUfuuuuAfcUfuucccsusc	GAGGGAAAGUAAAAAAUGCGUCGA

AD-1446221.1	gsgsaaa(Ghd)UfaAfAfAfaugcgu cgsasa		VPusUfscgaCfGcFafuuuuUfaCfuuu ccscsu		AGGGAAAGUAAAAAUGCGU CGAG	
AD-1446222.1	gsasaag(Uhd)AfaAfAfAfugcguc gasgsa		VPusCfsucgAfcGfCfauuuUfuAfcuu ucscsc		GGGAAAGUAAAAAUGCGUC GAGC	
AD-1446223.1	asasagu(Ahd)AfaAfAfUfgcgucg agscsa		VPusGfscucGfaCfGfcauuUfuUfacu uuscscc		GGAAAGUAAAAAUGCGUCG AGCU	
AD-1446224.1	asasgua(Ahd)AfaAfUfGfGfcgucga gcsusa		VPusAfsucgCfGfCfcauuUfuUfuac uususc		GAAAGUAAAAAUGCGUCGA GCUC	
AD-1446225.1	asgsuaa(Ahd)AfaUfGfCfGfcgucgag cuscsa		VPusGfsagcu(C2p)gacgcaUfuUfuua cususu		AAAGUAAAAAUGCGUCGAG CUCU	
AD-1446226.1	csgsacu(Chd)CfuGfAfGfuuccaga gscsa		VPusGfscucu(G2p)gaacucAfgGfagu cgscsg		CGCGACUCCUGAGUCCAG AGCU	
AD-1446227.1	gsascuc(Chd)UfgAfGfUfuccaga gcsusa		VPusAfsucguc(Tgn)ggaacuCfaGfgag ucsgsc		GCGACUCCUGAGUCCAGA GCUU	
AD-1446228.1	ascsucc(Uhd)GfaGfUfUfccagagc ususa		VPusAfsagcu(C2p)uggaacUfcAfgga guscsg		CGACUCCUGAGUCCAGAG CUUG	
AD-1446229.1	csusccu(Ghd)AfgUfUfCfcagagc uusgsa		VPusCfsaagc(Tgn)cuggaaCfuCfagga gsusc		GACUCCUGAGUCCAGAGC UUGC	
AD-1446230.1	uscscug(Ahd)GfuUfCfCfagagcu ugscsa		VPusGfscaag(C2p)ucuggaAfcUfcag gasgsu		ACUCCUGAGUCCAGAGCU UGCU	
AD-1446231.1	cscsuga(Ghd)UfuCfCfAfgagcuu gcsusa		VPusAfsgcaa(G2p)cucuggAfaCfuca ggsasg		CUCCUGAGUCCAGAGCUU GCUA	

AD- 1446232.1	gsasguu(Chd)CfaGfAfGfcuugcu acsasa		VPusUfsguag(C2p)aagcucUfgGfaac ucsasg		CUGAGUUCCAGAGCUUGCU ACAG	
AD- 1446233.1	asgsuuc(Chd)AfgAfGfCfuugcua casgsa		VPusCfsugua(G2p)caagcuCfuGfgaa cuscsa		UGAGUUCCAGAGCUUGCUA CAGG	
AD- 1446234.1	gsusucc(Ahd)GfaGfCfUfugcuac agsgsa		VPusCfscugUfaGfCfaagcUfcUfggaa csusc		GAGUUCCAGAGCUUGCUAC AGGC	
AD- 1446235.1	ususcca(Ghd)AfgCfUfUfgcuaca ggscsa		VPusGfscug(Tgn)agcaagCfuCfugg aascsu		AGUUCCAGAGCUUGCUACA GGCU	
AD- 1446236.1	uscscag(Ahd)GfcUfUfGfcuacag gcsusa		VPusAfsgccu(G2p)uagcaaGfcUfcug gasasc		GUUCCAGAGCUUGCUACAG GCUG	
AD- 1446237.1	cscsaga(Ghd)CfuUfGfCfuacagc usgsa		VPusCfsagcc(Tgn)guagcaAfgCfucu ggsasa		UUCCAGAGCUUGCUACAGG CUGC	
AD- 1446238.1	csasgag(Chd)UfuGfCfUfacagc gscsa		VPusGfscagc(C2p)uguagcAfaGfcuc ugsgsa		UCCAGAGCUUGCUACAGGC UGCG	
AD- 1446239.1	usascag(Ghd)CfuGfCfGfguuguu ucscsa		VPusGfsgaaa(C2p)aaccgcAfgCfcug uasgsc		GCUACAGGCUGCGGUUGUU UCCC	
AD- 1446240.1	gscsugc(Ghd)GfuUfGfUfuuccu ccsusa		VPusAfsaggag(G2p)gaaacaAfcCfzca gcsusu		AGGCUGCGGUUGUUUCCCU CCUU	
AD- 1446241.1	csusgcg(Ghd)UfuGfUfUfuccuc cususa		VPusAfsagga(G2p)ggaaacAfaCfcgc agscsc		GGCUGCGGUUGUUUCCUC CUUG	
AD- 1446242.1	gscsggu(Uhd)GfuUfUfCfccuccu ugsusa		VPusAfscaag(G2p)agggaaAfcAfac gcsasg		CUGCGGUUGUUUCCCUCCU UGUU	

AD- 1446243.1	csgsguu(Ghd)UfuUfCfCfcuccuu gususa		VPusAfsacaAfgGfAfgggaAfaCfaacc gscsa		UGCGGUUGUUUCCCUCUUGUUU	
AD- 1446244.1	gsusugu(Uhd)UfcCfCfUfccuugu uususa		VPusAfsaaaCfaAfGfgaggGfaAfaaa cscsg		CGGUUGUUUCCCUCUUGUUU	
AD- 1446245.1	ususguu(Uhd)CfcCfUfCfcuugu uuscsa		VPusGfsaaaAfcAfAfggagGfgAfaaa ascsc		GGUUGUUUCCCUCUUGUUU	
AD- 1446246.1	ususccc(Uhd)CfcUfUfGfuuuucu ucsusa		VPusAfsaaaGfaAfAfaaaGfgAfggg aasasc		GUUCCCUCUUGUUUUCUUGUUU	
AD- 1446247.1	uscscu(Chd)CfuUfGfUfuuuucu cusgsa		VPusCfsagaAfgAfAfaaaAfgGfagg gasasa		UUCCCUCUUGUUUUCUUGUUU	
AD- 1446248.1	cscscuc(Chd)UfuGfUfUfuucuc ugsgsa		VPusCfscagAfaGfAfaaaAfaGfgagg gsasa		UUCCCUCUUGUUUUCUUGUUU	
AD- 1446249.1	cscsucc(Uhd)UfgUfUfUfucuu ggsusa		VPusAfsccaGfaAfGfaaaaCfaAfggag gsgsa		UCCCUCUUGUUUUCUUGUUU	
AD- 1446250.1	csusccu(Uhd)GfuUfUfUfcuucug gususa		VPusAfsaccAfgAfAfgaaaAfcAfagga gsgsg		CCCUCUUGUUUUCUUGUUU	
AD- 1446251.1	cscsuug(Uhd)UfuUfCfUfucuggu uasasa		VPusUfsuaac(C2p)agaagaAfaAfaaa ggsasg		CUCCUUGUUUUCUUGUUU	
AD- 1446252.1	csusugu(Uhd)UfuCfUfUfcugguu aasusa		VPusAfsuuAfcCfAfgaagAfaAfaaa gsgsa		UCCUUGUUUUCUUGUUU	
AD- 1446253.1	ususguu(Uhd)UfcUfUfCfugguu auscsa		VPusGfsauuAfaCfCfagaaGfaAfaaa asgsg		CCUUGUUUUCUUGUUU	

AD- 1446254.1	usgsuuu(Uhd)CfuUfCfUfgguuaa ucsusa		VPusAfsgauUfaAfCfcagaAfgAfaaac asasg		CUUGUUUUCUUCUGGUUAA UCUU	
AD- 1446255.1	gsusuuu(Chd)UfuCfUfGfguuau cususa		VPusAfsagaUfuAfAfccagAfaGfaaaa csasa		UUGUUUUCUUCUGGUUAAU CUUU	
AD- 1446256.1	ususuuu(Chd)UfgGfUfUfaaucuu uasusa		VPusAfsuaaAfgAfUfuaacCfaGfaaga asasa		UUUUCUUCUGGUUAAUCUU UAUC	
AD- 1446257.1	uscsuuc(Uhd)GfgUfUfAfaucuuu auscsa		VPusGfsauaAfaGfAfuuaaCfcAfgaag asasa		UUUCUUCUGGUUAAUCUUU AUCA	
AD- 1446258.1	csusucu(Ghd)GfuUfAfAfucuuua ucsasa		VPusUfsgauAfaAfGfauuaAfcCfagaa gsasa		UUCUUCUGGUUAAUCUUUA UCAG	
AD- 1446259.1	ususcug(Ghd)UfuAfAfUfcuuuau casgsa		VPusCfsugaUfaAfAfgauuAfaCfcaga asgsa		UCUUCUGGUUAAUCUUUAU CAGG	
AD- 1446260.1	uscsugg(Uhd)UfaAfUfCfuuauc agsgsa		VPusCfscugAfuAfAfgauUfaAfcca gasasg		CUUCUGGUUAAUCUUUAUC AGGU	
AD- 1446261.1	csusggu(Uhd)AfaUfCfUfuuauca ggsusa		VPusAfsccug(Agn)uaaagaUfuAfac agsasa		UUCUGGUUAAUCUUUAUCA GGUC	
AD- 1446262.1	usgsguu(Ahd)AfuCfUfUfuaucag guscsa		VPusGfsaccu(G2p)auaaagAfuUfaac casgsa		UCUGGUUAAUCUUUAUCAG GUCU	
AD- 1446263.1	gsusuaa(Uhd)CfuUfUfAfucaggu cususa		VPusAfsagac(C2p)ugauaaAfgAfuua acscsa		UGGUUAAUCUUUAUCAGGU CUUU	
AD- 1446264.1	ususaau(Chd)UfuUfAfUfcagguc uususa		VPusAfsaaga(C2p)cugauaAfaGfauu aascsc		GGUUAAUCUUUAUCAGGUC UUUU	

AD- 1446265.1	asasucu(Uhd)UfaUfCfAfggucuu uuscsa		VPusGfsaaaAfgAfcfcugaUfaAfaagau usasa		UUAUCUUUAUCAGGUCUU UUCU	
AD- 1446266.1	asuscuu(Uhd)AfuCfAfGfgucuuu ucsusa		VPusAfsгааAfaGfAfcugAfuAfaag aususa		UAAUCUUUAUCAGGUCUUU UCUU	
AD- 1446267.1	uscsuuu(Ahd)UfcAfGfGfucuuuu cususa		VPusAfsagaAfaAfGfaccuGfaUfaaag asusu		AAUCUUUAUCAGGUCUUUU CUUG	
AD- 1446268.1	csusuua(Uhd)CfaGfGfUfcuuuuc uusgsa		VPusCfsaagAfaAfAfgaccUfgAfuaaa gsasu		AUCUUUAUCAGGUCUUUUC UUGU	
AD- 1446269.1	ususauu(Chd)AfgGfUfCfuuuucu ugsusa		VPusAfscaaGfaAfAfaagCfuGfauaa asgsa		UCUUUAUCAGGUCUUUUCU UGUU	
AD- 1446270.1	ususauc(Ahd)GfgUfCfUfuuuucu gususa		VPusAfsacaAfgAfAfaagaCfcUfgaua asasg		CUUUAUCAGGUCUUUUCU GUUC	
AD- 1446271.1	usasuca(Ghd)GfuCfUfUfuucuug uuscsa		VPusGfsaacAfaGfAfaaagAfcCfugau asasa		UUUAUCAGGUCUUUUCUUG UUCA	
AD- 1446272.1	asuscag(Ghd)UfcUfUfUfucuuugu ucsasa		VPusUfsgaaCfaAfGfaaaaGfaCfcuga usasa		UUAUCAGGUCUUUUCUUGU UCAC	
AD- 1446273.1	uscsagg(Uhd)CfuUfUfUfcuuguu cascsa		VPusGfsugaa(C2p)aagaaaAfgAfcu gasusa		UAUCAGGUCUUUUCUUGUU CACC	
AD- 1446274.1	csasggu(Chd)UfuUfUfCfuuguuc acscsa		VPusGfsguga(Agn)caagaaAfaGfacc ugsasu		AUCAGGUCUUUUCUUGUUC ACCC	
AD- 1446275.1	gsgsucu(Uhd)UfuCfUfUfguucac ccsusa		VPusAfsgggu(G2p)aacaagAfaAfaga ccsusg		CAGGUCUUUUCUUGUUCAC CCUC	

AD- 1446276.1	uscsuuu(Uhd)CfuUfGfUfucaccc ucsasa		VPusUfsgagg(G2p)ugaacaAfgAfaaa gascsc		GGUCUUUUCUUGUUCACCC UCAG	
AD- 1446277.1	csusuuu(Chd)UfuGfUfUfcacccu casgsa		VPusCfsugag(G2p)gugaacAfaGfaaa agsasc		GUCUUUUCUUGUUCACCCU CAGC	
AD- 1446278.1	ususuuu(Uhd)UfgUfUfCfaccuc agscsa		VPusGfscuga(G2p)ggugaaCfaAfgaa aasgsa		UCUUUUCUUGUUCACCCUC AGCG	
AD- 1446279.1	ususuuu(Ghd)UfuCfAfCfccucag cgsasa		VPusUfscgcu(G2p)aggugAfaCfaag aasasa		UUUUCUUGUUCACCCUCAG CGAG	
AD- 1446280.1	cscsuca(Ghd)CfGfUfUfacugug agsasa		VPusUfscuca(C2p)aguacuCfGfuga ggsgsu		ACCCUCAGCGAGUACUGUG AGAG	
AD- 1446281.1	uscsagc(Ghd)AfgUfAfCfugugag agscsa		VPusGfscucu(C2p)acaguaCfuCfGcu gasgsg		CCUCAGCGAGUACUGUGAG AGCA	
AD- 1446282.1	csasgcg(Ahd)GfuAfCfUfgugaga gcsasa		VPusUfsgcuc(Tgn)cacaguAfcUfegc ugsasg		CUCAGCGAGUACUGUGAGA GCAA	
AD- 1446283.1	asgscga(Ghd)UfaCfUfGfugagag casasa		VPusUfsugcu(C2p)ucacagUfaCfucg cusgsa		UCAGCGAGUACUGUGAGAG CAAG	
AD- 1446284.1	gscsgag(Uhd)AfcUfGfUfgagagc aasgsa		VPusCfsuugc(Tgn)cucacaGfuAfcuc gcsusg		CAGCGAGUACUGUGAGAGC AAGU	
AD- 1446285.1	csgsagu(Ahd)CfuGfUfGfagagca agsusa		VPusAfscuug(C2p)ucucacAfgUfacu cgscsu		AGCGAGUACUGUGAGAGCA AGUA	
AD- 1446286.1	gsasgua(Chd)UfgUfGfAfgagcaa gusasa		VPusUfsacuu(G2p)cucucaCfaGfuac ucsgsc		GCGAGUACUGUGAGAGCAA GUAG	

AD-1446287.1	asgsuac(Uhd)GfuGfAfGfagcaag uasgsa		VPusCfsuacUfuGfCfucucAfcAfguac uscsg		CGAGUACUGUGAGAGCAAG UAGU	
AD-1446288.1	usascug(Uhd)GfaGfAfGfcaagua gusgsa		VPusCfsacuAfcUfUfgcucUfcAfcagu ascsu		AGUACUGUGAGAGCAAGUA GUGG	
AD-1446289.1	asasaac(Ahd)AfaAfAfCfacacacc uscsa		VPusGfsaggu(G2p)uguguuUfuUfgu uuususc		GAAAAACAAAAACACACAC CUCC	
AD-1446290.1	ascsacc(Uhd)CfcUfAfAfaccaca cscsa		VPusGfsgugu(G2p)gguuuaGfgAfgg ugusgsu		ACACACCUCCUAAACCCAC ACCU	
AD-1446291.1	ascscuc(Chd)UfaAfAfCfccacacc usgsa		VPusCfsaggu(G2p)uggguuUfaGfgag gusgsu		ACACCUCCUAAACCCACACC UGC	
AD-1446292.1	csusccu(Ahd)AfaCfCfCfacaccug csusa		VPusAfsagcag(G2p)ugugggUfuUfag gagsgsu		ACCUCCUAAACCCACACCU GCUC	
AD-1446293.1	cscsaca(Chd)CfuGfCfUfcuugcua gsasa		VPusUfscuag(C2p)aagagcAfgGfugu ggsgsu		ACCCACACCUGCUCUUGCU AGAC	
AD-1446294.1	csascac(Chd)UfgCfUfCfuugcuag ascsa		VPusGfsucua(G2p)caagagCfaGfgug ugsgsg		CCCACACCUGCUCUUGCUA GACC	
AD-1446295.1	ascsacc(Uhd)GfcUfCfUfugcuaga cscsa		VPusGfsgucu(Agn)gcaagaGfcAfggu gusgsg		CCACACCUGCUCUUGCUAG ACCC	

Таблица 4. Скрининг однократной дозы агентов на основе дцРНК, нацеленных на антисмысловую цепь интрона 1а *C9orf72* человека, в клетках Cos-7

Дуплекс	10 нМ % оставшей ся мРНК*	СО	1 нМ % оставшей ся мРНК*	СО	0,1 нМ % оставшей ся мРНК*	СО
AD-1446206.1	45	9	65	12	85	18
AD-1446207.1	18	4	23	3	38	4
AD-1446208.1	51	5	52	8	68	15
AD-1446209.1	77	11	81	15	95	9
AD-1446210.1	81	24	98	10	102	10
AD-1446211.1	19	3	25	2	39	7
AD-1446212.1	64	11	61	6	83	7
AD-1446213.1	9	2	11	1	20	2
AD-1446214.1	18	1	23	3	30	5
AD-1446215.1	18	5	18	4	28	9
AD-1446216.1	15	3	18	4	28	5
AD-1446217.1	14	3	17	2	26	2
AD-1446218.1	12	1	15	1	22	7
AD-1446219.1	12	3	19	4	24	5
AD-1446220.1	15	4	21	3	28	5
AD-1446221.1	7	0	11	2	17	5
AD-1446222.1	10	2	16	4	26	6
AD-1446223.1	11	1	18	6	37	4
AD-1446224.1	15	2	20	3	34	7
AD-1446225.1	17	3	25	2	42	5
AD-1446226.1	19	4	22	3	28	2
AD-1446227.1	16	7	22	5	31	7
AD-1446228.1	25	8	28	6	42	9
AD-1446229.1	16	3	21	2	31	2
AD-1446230.1	21	2	20	6	28	3
AD-1446231.1	17	1	22	4	25	4
AD-1446232.1	11	2	18	4	22	2
AD-1446233.1	16	1	23	3	32	6

AD-1446234.1	18	3	26	3	34	7
AD-1446235.1	30	9	37	5	53	8
AD-1446236.1	66	12	82	11	105	25
AD-1446237.1	23	4	34	5	49	5
AD-1446238.1	44	8	41	12	49	7
AD-1446239.1	53	9	61	8	74	7
AD-1446240.1	25	5	33	8	44	4
AD-1446241.1	23	4	31	7	38	6
AD-1446242.1	12	2	16	4	26	3
AD-1446243.1	18	1	22	2	27	2
AD-1446244.1	53	7	44	7	51	16
AD-1446245.1	18	2	16	1	22	2
AD-1446246.1	7	1	10	1	13	3
AD-1446247.1	7	1	9	1	12	2
AD-1446248.1	5	1	6	1	9	3
AD-1446249.1	7	1	9	2	12	2
AD-1446250.1	12	1	14	2	17	4
AD-1446251.1	7	2	7	0	10	2
AD-1446252.1	4	1	4	1	6	4
AD-1446253.1	1	1	4	1	7	3
AD-1446254.1	6	3	5	0	7	3
AD-1446255.1	11	2	7	1	9	1
AD-1446256.1	34	7	27	4	31	2
AD-1446257.1	5	1	5	0	6	1
AD-1446258.1	5	2	4	1	6	1
AD-1446259.1	6	2	7	1	8	1
AD-1446260.1	4	1	4	1	5	1
AD-1446261.1	10	4	9	1	10	2
AD-1446262.1	6	1	6	0	7	1
AD-1446263.1	5	1	6	1	9	2
AD-1446264.1	11	4	8	1	9	1
AD-1446265.1	6	1	6	1	7	1
AD-1446266.1	6	1	6	0	8	2
AD-1446267.1	8	4	8	3	11	1

AD-1446268.1	4	1	3	1	6	1
AD-1446269.1	5	1	6	0	7	2
AD-1446270.1	5	1	7	3	8	2
AD-1446271.1	3	1	4	2	7	1
AD-1446272.1	8	4	7	1	9	2
AD-1446273.1	6	2	8	2	10	1
AD-1446274.1	5	2	6	1	9	2
AD-1446275.1	10	3	15	5	17	3
AD-1446276.1	6	1	6	1	8	2
AD-1446277.1	12	1	12	1	16	4
AD-1446278.1	16	2	16	2	22	7
AD-1446279.1	23	3	19	3	28	4
AD-1446280.1	20	8	30	12	40	14
AD-1446281.1	21	4	31	3	51	14
AD-1446282.1	18	5	17	4	40	9
AD-1446283.1	44	6	32	7	50	14
AD-1446284.1	25	8	31	3	52	13
AD-1446285.1	38	9	49	4	52	11
AD-1446286.1	28	6	48	8	67	15
AD-1446287.1	64	19	56	10	72	13
AD-1446288.1	34	5	34	7	54	10
AD-1446289.1	17	1	21	3	35	9
AD-1446290.1	40	2	61	10	76	12
AD-1446291.1	60	9	69	5	89	16
AD-1446292.1	23	2	32	5	38	6
AD-1446293.1	20	6	32	4	44	4
AD-1446294.1	11	2	21	2	33	4
AD-1446295.1	23	5	34	6	53	6
* «мРНК» для этого примера представляет собой антисмысловый транскрипт						

Таблица 4А. Целевые последовательности антисмысловой РНК интрона 1А *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 50\%$ антисмыслового транскрипта после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерений, приведенным в **Таблице 4.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5523	5571	CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGGAAAGTAA AAATGCGTCGAGCTCT	21
5283	5315	CGCGACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAGGC	22
5260	5286	AGGCTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT	23
5201	5279	GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCT TTATCAGGTCTTTTCTTGTTACCCCTCAGCGAGTA CTGTGAGAG	24
5197	5220	CTCAGCGAGTACTGTGAGAGCAAG	25
5128	5160	ACCTCCTAAACCCACACCTGCTCTTGCTAGACC	26

Таблица 4В. Целевые последовательности антисмысловой РНК интрона 1А *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 40\%$ антисмыслового транскрипта после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерений, приведенным в **Таблице 4.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5524	5571	CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGGAAAGTAA AAATGCGTCGAGCTC	27
5292	5315	CGCGACTCCTGAGTTCCAGAGCTT	28
5283	5312	GACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAGGC	29
5260	5285	GGCTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT	30
5201	5279	GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTT TATCAGGTCTTTTCTTGTTACCCCTCAGCGAGTAC TGTGAGAG	31

Таблица 4С. Целевые последовательности антисмысловой РНК интрона 1А *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 30\%$ антисмыслового транскрипта после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерений, приведенным в **Таблице 4.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5526	5571	CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGGAAAGTAA AAATGCGTCGAGC	32
5285	5311	ACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAG	33

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5260	5283	CTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT	34
5243	5279	GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTCTTCTGGTTAATCT TT	35
5212	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTG TTCACCCTCAGCGAG	36

Таблица 4D. Целевые последовательности антисмысловой РНК интрона 1A *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 25\%$ антисмыслового транскрипта после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерений, приведенным в **Таблице 4.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5529	5552	GAGAGGGAAAGTAAAAATGCGTCG	37
5243	5279	GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTCTTCTGGTTAATCTT T	38
5214	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGT TCACCCTCAGCG	39

Таблица 4E. Целевые последовательности антисмысловой РНК интрона 1A *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 20\%$ антисмыслового транскрипта после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерений, приведенным в **Таблице 4.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5243	5275	GTTTCCCTCCTTGTTTCTTCTGGTTAATCTTT	40
5215	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTT GTTTACCCTCAGC	41

Таблица 4F. Целевые последовательности антисмысловой РНК интрона 1A *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 15\%$ антисмыслового транскрипта после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерений, приведенным в **Таблице 4.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5250	5275	GTTTCCCTCCTTGTTTCTTCTGGTT	42

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5243	5269	CTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT	43
5220	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTT GTTACACC	44

Таблица 4Г. Целевые последовательности антисмысловой РНК интрона 1А *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 10\%$ антисмыслового транскрипта после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерений, приведенным в **Таблице 4.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (обратнокомплементарная последовательность NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5243	5268	TCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT	45
5228	5261	TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTT	46
5220	5248	ATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTACACC	47

Таблица 5. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК, нацеленных на смысловую цепь либо экзона 1А, либо ниже интронного повтора между экзонами 1А и 1ВН1.

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон (NM_001256054.2)	Диапазон (NG_031977.2)	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон (NM_001256054.2)	Диапазон (NG_031977.2)
AD-1446073.1	GUAACCUACGGU GUCCCGCUA		3 to 23	5003-5023	UAGCGGGACACCGU AGGUUACGU		1 to 23	5001-5023
AD-1446074.1	GUCCCGCUAGGA AAGAGAGGA		15-35	5015-5035	UCCUCUCUUUCCUA GCGGGACAC		13-35	5013-5035
AD-1446075.1	CCCGCUAGGAAA GAGAGGUGA		17-37	5017-5037	UCACCUCUCUUUCCU AGCGGGAC		15-37	5015-5037
AD-1446076.1	CGCUAGGAAAGA GAGGUGCGA		19-39	5019-5039	UCGCACCUCUCUUUC CUAGCGGG		17-39	5017-5039
AD-1446077.1	GCUAGGAAAGAG AGGUGCGUA		20-40	5020-5040	UACGCACCUCUCUU UCCUAGCGG		18-40	5018-5040
AD-1446078.1	UAGGAAAGAGAG GUGCGUCA		22-42	5022-5042	UUGACGCACCUCUC UUUCCUAGC		20-42	5020-5042
AD-1446079.1	AGGUGCGUCAAAA CAGCGACAA		32-52	5032-5052	UUGUCGCUGUUUGA CGCACCUCU		30-52	5030-5052
AD-1446080.1	GGUGCGUCAAAC AGCGACAAA		33-53	5033-5053	UUUGUCGCUGUUUG ACGCACCUC		31-53	5031-5053

AD-1446081.1	GUGCGUCAACA GCGACAAGA		34-54	5034-5054	UCUUGUCGCUGUUU GACGCACCU		32-54	5032-5054
AD-1285246.2	UGCGUCAAACAG CGACAAGUA		35-55	5035-5055	UACUUGTCGCUGUU UGACGCACC		33-55	5033-5055
AD-1285246.1	UGCGUCAAACAG CGACAAGUA		35-55	5035-5055	UACUUGTCGCUGUU UGACGCACC		33-55	5033-5055
AD-1446082.1	GCGUCAAACAGC GACAAGUUA		36-56	5036-5056	UAACUUGUCGCUGU UUGACGCAC		34-56	5034-5056
AD-1285245.2	CGUCAAACAGCG ACAAGUUCA		37-57	5037-5057	UGAACUTGUCGCUG UUUGACGCA		35-57	5035-5057
AD-1285245.1	CGUCAAACAGCG ACAAGUUCA		37-57	5037-5057	UGAACUTGUCGCUG UUUGACGCA		35-57	5035-5057
AD-1446083.1	GUCAAACAGCGA CAAGUUGCA		38-58	5038-5058	UGGAUCTUGUCGCU GUUUGACGC		36-58	5036-5058
AD-1446084.1	UCAAACAGCGAC AAGUUGCGA		39-59	5039-5059	UCGGAACUUGUCGC UGUUUGACG		37-59	5037-5059
AD-1446085.1	CCGCCCACGUAAA AGAUGACA		56-76	5056-5076	UGUCAUCUUUACG UGGGCGGAA		54-76	5054-5076
AD-1446086.1	CCACGUAAAAGA UGACGCUUA		60-80	5060-5080	UAAGCGUCAUCUUU UACGUGGGC		58-80	5058-5080
AD-1285247.1	CCACGUAAAAGA UGACGCUUA		60-80	5060-5080	UAAGCGTCAUCUUU UACGUGGGC		58-80	5058-5080

AD-1446087.1	CACGUAAAAGAU GACGCUUGA		61-81	5061-5081	UCAAGCGUCAUCU UUACGUGGG		59-81	5059-5081
AD-1446088.1	ACGUAAAAGAUG ACGCUUGGA		62-82	5062-5082	UCCAAGCGUCAUC UUUACGUGG		60-82	5060-5082
AD-1446089.1	CGUAAAAGAUGA CGCUUGGUA		63-83	5063-5083	UACCAAGCGUCAUC UUUUACGUG		61-83	5061-5083
AD-1446090.1	GUAAAAGAUGAC GCUUGGUGA		64-84	5064-5084	UCACCAAGCGUCAU CUUUUACGU		62-84	5062-5084
AD-1446091.1	UAAAAGAUGACG CUUGGUGUA		65-85	5065-5085	UACACCAAGCGUCA UCUUUUACG		63-85	5063-5085
AD-1446092.1	AAAAGAUGACGC UUGGUGUGA		66-86	5066-5086	UCACACCAAGCGUC AUCUUUUAC		64-86	5064-5086
AD-1446093.1	AAAGAUGACGCU UGGUGUGUA		67-87	5067-5087	UACACACCAAGCGU CAUCUUUUA		65-87	5065-5087
AD-1446094.1	AGAUGACGCUUG GUGUGUCAA		69-89	5069-5089	UUGACACACCAAGC GUCAUCUUU		67-89	5067-5089
AD-1446095.1	AUGACGCUUGGU GUGUCAGCA		71-91	5071-5091	UGCUGACACACCAA GCGUCAUCU		69-91	5069-5091
AD-1446096.1	GACGCUUGGUGU GUCAGCCGA		73-93	5073-5093	UCGGCUGACACACC AAGCGUCAU		71-93	5071-5093
AD-1446097.1	GCUGCCCGGUUGC UUCUCUUA		98-118	5098-5118	UAAGAGAAGCAACC GGGCAGCAG		96-118	5096-5118

AD-1446098.1	GUCUAGCAAGAG CAGGUGUGA		129-149	5129-5149	UCACACCUGCUCUU GCUAGACCC		127-149	5127-5149
AD-1446099.1	GCAGGUGUGGGU UUAGGAGGA		140-160	5140-5160	UCCUCCUAAACCCAC ACCUGCUC		138-160	5138-5160
AD-1446100.1	CAGGUGUGGGUU UAGGAGGUA		141-161	5141-5161	UACCUCCUAAACCCA CACCUGCU		139-161	5139-5161
AD-1446101.1	AGGUGUGGGUUU AGGAGGUGA		142-162	5142-5162	UCACCUCCUAAACCC ACACCUGC		140-162	5140-5162
AD-1446102.1	GUGUGGGUUUAG GAGGUGUGA		144-164	5144-5164	UCACACCUCCUAAAC CCACACCU		142-164	5142-5164
AD-1285244.1	UGCUCUCACAGU ACUCGCUGA			5199-5219	UCAGCGAGUACUGU GAGAGCAAG			5197-5219
AD-1446103.1	UCUCACAGUACUC GCUGAGGA			5202-5222	UCCUCAGCGAGUAC UGUGAGAGC			5200-5222
AD-1446104.1	UCACAGUACUCGC UGAGGGUA			5204-5224	UACCCUCAGCGAGU ACUGUGAGA			5202-5224
AD-1285235.1	GCUGAGGGUGAA CAAGAAAAA			5215-5235	UUUUUCUUGUUCAC CCUCAGCGA			5213-5235
AD-1285238.1	AACAAGAAAAGA CCUGAUAAA			5225-5245	UUUAUCAGGUCUUU UCUUGUUCA			5223-5245
AD-1285243.1	AAGAAAAGACCU GAUAAAGAA			5228-5248	UUCUUUAUCAGGUC UUUUCUUGU			5226-5248

AD- 1285234.1	AGAAAAGACCUG AUAAGAUUA			5229-5249	UAUCUUUAUCAGGU CUUUUCUUG			5227-5249
AD- 1285239.1	GAAAAGACCUGA UAAAGAUUA			5230-5250	UAAUCUUUAUCAGG UCUUUUCUU			5228-5250
AD- 1285232.1	AAAAGACCUGAU AAAGAUUAA			5231-5251	UUAAUCUUUAUCAG GUCUUUUCU			5229-5251
AD- 1285231.1	AAAGACCUGAUA AAGAUUAAA			5232-5252	UUUAAUCUUUAUCA GGUCUUUUC			5230-5252
AD- 1285240.1	AAGACCUGAUAA AGAUUAACA			5233-5253	UGUAAUCUUUAUC AGGUCUUUU			5231-5253
AD- 1285241.1	GACCUGAUAAAG AUUAACCAA			5235-5255	UUGGUUAAUCUUUA UCAGGUCUU			5233-5255
AD- 1285242.1	ACCUGAUAAAGA UUAACCAGA			5236-5256	UCUGGUUAAUCUUU AUCAGGUCU			5234-5256
AD- 1285233.1	AAAGAUUAACCA GAAGAAAA			5243-5263	UUUUUCUUCUGGUU AAUCUUUAU			5241-5263
AD- 1285237.1	AUUAACCAGAAG AAAACAAGA			5247-5267	UCUUGUUUUCUUCU GGUUAACUCU			5245-5267
AD- 1285236.1	AACCAGAAGAAA ACAAGGAGA			5250-5270	UCUCCUUGUUUUCU UCUGGUUAA			5248-5270
AD- 1446105.1	GGAGGGAAACAA CCGCAGCCA			5266-5286	UGGCUGCGGUUGUU UCCCUCCUU			5264-5286

AD-1446106.1	GAGGGAAACAAC CGCAGCCUA			5267-5287	UAGGCUGCGGUUGU UUCCCUCCU			5265-5287
AD-1446107.1	CAGCCUGUAGCA AGCUCUGGA			5281-5301	UCCAGAGCUUGC CAGGCUGCG			5279-5301
AD-1446108.1	CUCUGGAACUCA GGAGUCGCA			5295-5315	UGCGACTCCUGAGU UCCAGAGCU			5293-5315
AD-1446109.1	UCUCCUCAGAGCU CGACGCAA			5516-5536	UUGCGUCGAGCUCU GAGGAGAGC			5514-5536
AD-1446110.1	UCCUCAGAGCUCG ACGCAUUA			5518-5538	UAAUGCGUCGAGCU CUGAGGAGA			5516-5538
AD-1446111.1	ACUUUCCCUCUCA UUUCUCUA			5541-5561	UAGAGAAAUGAGAG GGAAAGUAA			5539-5561
AD-1446112.1	CUUUCCCUCUCAU UUCUCUGA			5542-5562	UCAGAGAAAUGAGA GGGAAAGUA			5540-5562
AD-1446113.1	UUUCCCUCUCAUU UCUCUGAA			5543-5563	UUCAGAGAAAUGAG AGGGAAAGU			5541-5563
AD-1446114.1	UCCCUCUCAUUUC UCUGACCA			5545-5565	UGGUCAGAGAAAUG AGAGGGAAA			5543-5565
AD-1446115.1	CCCUCUCAUUUCU CUGACCGA			5546-5566	UCGGUCAGAGAAAU GAGAGGGAA			5544-5566
AD-1446116.1	CCUCUCAUUUCUC UGACCGAA			5547-5567	UUCGGUCAGAGAAA UGAGAGGGA			5545-5567

AD-1446117.1	UCUCAUUUCUCU GACCGAAGA			5549-5569	UCUUCGGUCAGAGA AAUGAGAGG			5547-5569
AD-1446118.1	CUCAUUUCUCUG ACCGAAGCA			5550-5570	UGCUUCGGUCAGAG AAAUGAGAG			5548-5570
AD-1446119.1	UCAUUUCUCUGA CCGAAGCUA			5551-5571	UAGCUUCGGUCAGA GAAAUGAGA			5549-5571
AD-1446120.1	CUCUGACCGAAGC UGGGUGUA			5557-5577	UACACCCAGCUUCG GUCAGAGAA			5555-5577
AD-1446121.1	GGUGUCGGGCUU UCGCCUCUA			5572-5592	UAGAGGCGAAAGCC CGACACCCA			5570-5592
AD-1446122.1	UCGGGCUUUCGCC UCUAGCGA			5576-5596	UCGCUAGAGGCGAA AGCCCGACA			5574-5596
AD-1446123.1	CUUUCGCCUCUAG CGACUGGA			5581-5601	UCCAGUCGCUAGAG GCGAAAGCC			5579-5601
AD-1446124.1	UUCGCCUCUAGCG ACUGGUGA			5583-5603	UCACCAGUCGCUAG AGGCGAAAG			5581-5603
AD-1446125.1	UCGCCUCUAGCGA CUGGUGGA			5584-5604	UCCACCAGUCGCUA GAGGCGAAA			5582-5604
AD-1446126.1	CGCCUCUAGCGAC UGGUGGAA			5585-5605	UCCACCAGUCGCU AGAGGCGAA			5583-5605
AD-1446127.1	GCCUCUAGCGACU GGUGGAAA			5586-5606	UUCCACCAGUCGC UAGAGGCGA			5584-5606

AD-1446128.1	CUCUAGCGACUG GUGGAAUUA			5588-5608	UAAUUCCACCAGUC GCUAGAGGC			5586-5608
AD-1446129.1	UCUAGCGACUGG UGGAAUUGA			5589-5609	UCAAUUCCACCAGU CGCUAGAGG			5587-5609
AD-1446130.1	GACUGGUGGAAU UGCCUGCAA			5595-5615	UUGCAGGCAAUUC ACCAGUCGC			5593-5615
AD-1446131.1	ACUGGUGGAAUU GCCUGCAUA			5596-5616	UAUGCAGGCAAUUC CACCAGUCG			5594-5616
AD-1446132.1	UGGUGGAAUUGC CUGCAUCCA			5598-5618	UGGAUGCAGGCAAU UCCACCAGU			5596-5618
AD-1446134.1	UCUGGCCUCUUCC UUGC UUUA			5678-5698	UAAAGCAAGGAAGA GGCCAGAUC			5676-5698
AD-1446135.1	CUGGCCUCUUCCU UGC UUUCA			5679-5699	UGAAAGCAAGGAAG AGGCCAGAU			5677-5699
AD-1446136.1	UGGCCUCUUCCUU GCUUCCA			5680-5700	UGGAAAGCAAGGAA GAGGCCAGA			5678-5700
AD-1446137.1	GGCCUCUUCCUUG CUUCCCA			5681-5701	UGGGAAAGCAAGGA AGAGGCCAG			5679-5701
AD-1446138.1	GCCUCUUCCUUGC UUUCCGA			5682-5702	UCGGGAAAGCAAGG AAGAGGCCA			5680-5702
AD-1446139.1	UUCCUUGC UUCC CGCCUCA			5687-5707	UGAGGGCGGGAAAG CAAGGAAGA			5685-5707

AD-1446140.1	UCCUUGC UUUCCC GCCCUCAA			5688-5708	UUGAGGGCGGGAAA GCAAGGAAG			5686-5708
AD-1446141.1	CCUUGC UUUCCCG CCCUCAGA			5689-5709	UCUGAGGGCGGGAA AGCAAGGAA			5687-5709
AD-1446142.1	CUUGC UUUCCCGC CCUCAGUA			5690-5710	UACUGAGGGCGGGGA AAGCAAGGA			5688-5710
AD-1446143.1	AGUACCCGAGCU GUCUCCUUA			5707-5727	UAAGGAGACAGCUC GGGUACUGA			5705-5727
AD-1446144.1	UACCCGAGCUGUC UCCUCCA			5709-5729	UGGAAGGAGACAGC UCGGGUACU			5707-5729
AD-1446145.1	GAGGAGAUCAUG CGGGAUGAA			5885-5905	UUCAUCCCGCAUGA UCUCCUCGC			5883-5905
AD-1446146.1	AGACGCCUGCACA AUUUCAGA			5918-5938	UCUGAAAUUGUGCA GGCGUCUCC			5916-5938
AD-1446147.1	GACGCCUGCACAA UUUCAGCA			5919-5939	UGCUGAAAUUGUGC AGGCGUCUC			5917-5939
AD-1446148.1	CGCCUGCACAAUU UCAGCCCA			5921-5941	UGGGCUGAAAUUGU GCAGGCGUC			5919-5941
AD-1446149.1	CCUGCACAAUUUC AGCCCAA			5923-5943	UUUGGGCUGAAAUU GUGCAGGCG			5921-5943
AD-1446150.1	CUGCACAAUUUC AGCCCAAGA			5924-5944	UCUUGGGCUGAAAU UGUGCAGGC			5922-5944

AD-1446151.1	UGCACAAUUUCA GCCCAAGCA			5925-5945	UGCUUGGGCUGAAA UUGUGCAGG			5923-5945
AD-1446152.1	CAAUUUCAGCCCA AGCUUCUA			5929-5949	UAGAAGCUUGGGCU GAAAUUGUG			5927-5949
AD-1446153.1	AAUUUCAGCCCA AGCUUCUAA			5930-5950	UUAGAAGCUUGGGC UGAAAUUGU			5928-5950
AD-1446154.1	CAGCCCAAGCUUC UAGAGAGA			5935-5955	UCUCUCTAGAAGCU UGGGCUGAA			5933-5955
AD-1446155.1	AGCCCAAGCUUCU AGAGAGUA			5936-5956	UACUCUCUAGAAGC UUGGGCUGA			5934-5956
AD-1446156.1	GCCCAAGCUUCUA GAGAGUGA			5937-5957	UCACUCTCUAGAAGC UUGGGCUG			5935-5957
AD-1446157.1	CCCAAGCUUCUAG AGAGUGGA			5938-5958	UCCACUCUCUAGAA GCUUGGGCU			5936-5958
AD-1446158.1	CCAAGCUUCUAG AGAGUGGUA			5939-5959	UACCACTCUCUAGAA GCUUGGGC			5937-5959
AD-1446159.1	CAAGCUUCUAGA GAGUGGUGA			5940-5960	UCACCACUCUCUAG AAGCUUGGG			5938-5960
AD-1446160.1	AAGCUUCUAGAG AGUGGUGAA			5941-5961	UUCACCACUCUCUA GAAGCUUGG			5939-5961
AD-1446161.1	AGCUUCUAGAGA GUGGUGAUA			5942-5962	UAUCACCACUCUCU AGAAGCUUG			5940-5962

AD- 1446162.1	GCUUCUAGAGAG UGGUGAUGA			5943-5963	UCAUCACCACUCUCU AGAAGCUU			5941-5963
AD- 1446163.1	UUCUAGAGAGUG GUGAUGACA			5945-5965	UGUCAUCACCACUC UCUAGAAGC			5943-5965
AD- 1446164.1	UAGAGAGUGGUG AUGACUUGA			5948-5968	UCAAGUCAUCACCA CUCUCUAGA			5946-5968
AD- 1446165.1	AGAGAGUGGUGA UGACUUGCA			5949-5969	UGCAAGTCAUCACCA CUCUCUAG			5947-5969
AD- 1446166.1	GAGAGUGGUGAU GACUUGCAA			5950-5970	UUGCAAGUCAUCAC CACUCUCUA			5948-5970
AD- 1446167.1	AGUGGUGAUGAC UUGCAUAUA			5953-5973	UAUAUGCAAGUCAU CACCACUCU			5951-5973
AD- 1446168.1	GGUGAUGACUUG CAUAUGAGA			5956-5976	UCUCAUAUGCAAGU CAUCACCAC			5954-5976
AD- 1446169.1	GUGAUGACUUGC AUAUGAGGA			5957-5977	UCCUCAUAUGCAAG UCAUCACCA			5955-5977
AD- 1446170.1	UGAUGACUUGCA UAUGAGGGA			5958-5978	UCCUCAUAUGCAA GUCAUCACC			5956-5978
AD- 1446171.1	AGGGCAGCAAUG CAAGUCGGA			5974-5994	UCCGACUUGCAUUG CUGCCCUCA			5972-5994
AD- 1446172.1	GGGCAGCAAUGC AAGUCGGUA			5975-5995	UACCGACUUGCAUU GCUGCCCUC			5973-5995

AD-1446173.1	GGCAGCAAUGCA AGUCGGUGA			5976-5996	UCACCGACUUGCAU UGCUGCCCU			5974-5996
AD-1446174.1	GCAGCAAUGCAA GUCGGUGUA			5977-5997	UACACCGACUUGCA UUGCUGCCC			5975-5997
AD-1446175.1	CAGCAAUGCAAG UCGGUGUGA			5978-5998	UCACACCGACUUGC AUUGCUGCC			5976-5998
AD-1446176.1	CAAUGCAAGUCG GUGUGCUC A			5981-6001	UGAGCACACCGACU UGCAUUGCU			5979-6001
AD-1446177.1	CUGUGGGACAUG ACCUGGUUA			6007-6027	UAACCAGGUCAUGU CCCACAGAA			6005-6027
AD-1446178.1	UGUGGGACAUGA CCUGGUUGA			6008-6028	UCAACCAGGUCAUG UCCCACAGA			6006-6028
AD-1446179.1	GUGGGACAUGAC CUGGUUGCA			6009-6029	UGCAACCAGGUCAU GUCCCACAG			6007-6029
AD-1446180.1	UGGGACAUGACC UGGUUGCUA			6010-6030	UAGCAACCAGGUCA UGUCCCACA			6008-6030
AD-1446181.1	GACAUGACCUGG UUGCUUCAA			6013-6033	UUGAAGCAACCAGG UCAUGUCCC			6011-6033
AD-1446182.1	ACAUGACCUGGU UGCUCAC A			6014-6034	UGUGAAGCAACCAG GUCAUGUCC			6012-6034
AD-1446183.1	UGACCUGGUUGC UUCACAGCA			6017-6037	UGCUGUGAAGCAAC CAGGUCAUG			6015-6037

AD-1446184.1	GACCUGGUUGCU UCACAGCUA			6018-6038	UAGCUGTGAAGCAA CCAGGUCAU			6016-6038
AD-1446185.1	ACCUGGUUGCUU CACAGCUA			6019-6039	UGAGCUGUGAAGCA ACCAGUCA			6017-6039
AD-1446186.1	CCUGGUUGCUUC ACAGCUCCA			6020-6040	UGGAGCTGUGAAGC AACCAGGUC			6018-6040
AD-1446187.1	CUGGUUGCUUCA CAGCUCCGA			6021-6041	UCGGAGCUGUGAAG CAACCAGGU			6019-6041
AD-1446188.1	UGGUUGCUUCAC AGCUCCGAA			6022-6042	UUCGGAGCUGUGAA GCAACCAGG			6020-6042
AD-1446189.1	GGUUGCUUCACA GCUCCGAGA			6023-6043	UCUCGGAGCUGUGA AGCAACCAG			6021-6043
AD-1446190.1	GUUGCUUCACAG CUCCGAGAA			6024-6044	UUCUCGGAGCUGUG AAGCAACCA			6022-6044
AD-1446191.1	UUGCUUCACAGC UCCGAGAU			6025-6045	UAUCUCGGAGCUGU GAAGCAACC			6023-6045
AD-1446192.1	CAGCUCCGAGAU GACACAGAA			6033-6053	UUCUGUGUCAUCUC GGAGCUGUG			6031-6053
AD-1446193.1	GCUCCGAGAUGA CACAGACUA			6035-6055	UAGUCUGUGUCAUC UCGGAGCUG			6033-6055
AD-1446194.1	CUCCGAGAUGAC ACAGACUUA			6036-6056	UAAGUCTGUGUCAU CUCGGAGCU			6034-6056

AD-1446195.1	UCCGAGAUGACA CAGACUUGA			6037-6057	UCAAGUCUGUGUCA UCUCGGAGC			6035-6057
AD-1446196.1	CCGAGAUGACAC AGACUUGCA			6038-6058	UGCAAGTCUGUGUC AUCUCGGAG			6036-6058
AD-1446197.1	CGAGAUGACACA GACUUGC UA			6039-6059	UAGCAAGUCUGUGU CAUCUCGGA			6037-6059
AD-1446198.1	GAGAUGACACAG ACUUGC UUA			6040-6060	UAAGCAAGUCUGUG UCAUCUCGG			6038-6060
AD-1446199.1	GAUGACACAGAC UUGC UAAA			6042-6062	UUUAAGCAAGUCUG UGUCAUCUC			6040-6062
AD-1446200.1	AUGACACAGACU UGC UAAAA			6043-6063	UUUUAAGCAAGUCU GUGUCAUCU			6041-6063
AD-1446201.1	UGACACAGACUU GCUUAAAGA			6044-6064	UCUUUAAGCAAGUC UGUGUCAUC			6042-6064
AD-1446202.1	GACACAGACUUG CUUAAAGGA			6045-6065	UCCUUUAAGCAAGU CUGUGUCAU			6043-6065
AD-1446203.1	ACACAGACUUGC UUAAGGAA			6046-6066	UCCUUUAAGCAAG UCUGUGUCA			6044-6066
AD-1446204.1	CAGACUUGC UUA AAGGAAGUA			6049-6069	UACUCCUUUAAGC AAGUCUGUG			6047-6069
AD-1446205.1	AGACUUGC UUA AGGAAGUGA			6050-6070	UCACUCCUUUAAG CAAGUCUGU			6048-6070

Таблица 6. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК, нацеленных на смысловую цепь либо экзона 1А, либо 3'-стороны интронного повтора между экзонами 1А и 1В.

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК (NM_001256054.2)	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК (NG_031977.2)	SEQ ID NO:
AD-1446073.1	gsusaac(Chd)UfaCfGfGfugucccgcsusa		VPusAfsfgcgg(G2p)acaccgUfaGfguuacsgsu		ACGUAACCUACG GUGUCCCGCUA		ACGUAACCUACGG UGUCCCGCUA	
AD-1446074.1	gsusccc(Ghd)CfuAfGfGfaagagagsgsa		VPusCfscucu(C2p)uuucCuAfgCfgggacsasc		GUGUCCCGCUAG GAAAGAGAGGU		GUGUCCCGCUAGG AAAGAGAGGU	
AD-1446075.1	cscscgc(Uhd)AfgGfAfAfagagaggusgsa		VPusCfsaccu(C2p)ucuuCfuAfgcgggsasc		GUCCCGCUAGGA AAGAGAGGUGC		GUCCCGCUAGGAA AGAGAGGUGC	
AD-1446076.1	csgscua(Ghd)GfaAfAfGfagaggugcsgsa		VPusCfsgcaCfcUfCfucuuUfcCfuagcsgsg		CCCGCUAGGAAA GAGAGGUGCGU		CCCGCUAGGAAAG AGAGGUGCGU	
AD-1446077.1	gscsuag(Ghd)AfaAfGfAfgaggugcgsusa		VPusAfsfgca(C2p)cucuUfuCfcuagcsgsg		CCGCUAGGAAAG AGAGGUGCGUC		CCGCUAGGAAAGA GAGGUGCGUC	
AD-1446078.1	usasgga(Ahd)AfgAfGfAfggugcguacsasa		VPusUfsgacg(C2p)accuCuCfuUfuccuasgsc		GCUAGGAAAGAG AGGUGCGUCA		GCUAGGAAAGAGA GGUGCGUCA	
AD-1446079.1	asgsgug(Chd)GfuCfAfAfacagcgacsasa		VPusUfsgucg(C2p)uguuugAfcGfcaccusesu		AGAGGUGCGUCA AACAGCGACAA		AGAGGUGCGUCA ACAGCGACAA	
AD-1446080.1	gsgsugc(Ghd)UfcAfAfAfcagcgacasasa		VPusUfsuguc(G2p)cuguuuGfaCfgcaccusc		GAGGUGCGUCA ACAGCGACAAG		GAGGUGCGUCA CAGCGACAAG	

AD-1446081.1	gsusgcg(Uhd)CfaAf AfCfagcgacaasgsa		VPusCfsuugu(C2p)gcu guUfgAfcgcacsescu		AGGUGCGUCAAAA CAGCGACAAGU		AGGUGCGUCAAAAC AGCGACAAGU	
AD-1285246.2	usgscgu(Chd)AfaAfC fAfcgacaagsusa		VPusAfsuug(Tgn)cgcu guUfuGfacgcascsc		GGUGCGUCAAAAC AGCGACAAGUU		GGUGCGUCAAAACA GCGACAAGUU	
AD-1285246.1	usgscgu(Chd)AfaAfC fAfcgacaagsusa		VPusAfsuug(Tgn)cgcu guUfuGfacgcascsc		GGUGCGUCAAAAC AGCGACAAGUU		GGUGCGUCAAAACA GCGACAAGUU	
AD-1446082.1	gscsguc(Ahd)AfaCfA fGfcgacaagususa		VPusAfsacuu(G2p)ucg cugUfuUfgacgcsasc		GUGCGUCAAAACA GCGACAAGUUC		GUGCGUCAAAACAG CGACAAGUUC	
AD-1285245.2	csgsuca(Ahd)AfcAfG fCfagacaaguuscsa		VPusGfsaacu(Tgn)gucg cuGfuUfugacgscsa		UGCGUCAAAACAG CGACAAGUUCC		UGCGUCAAAACAGC GACAAGUUCC	
AD-1285245.1	csgsuca(Ahd)AfcAfG fCfagacaaguuscsa		VPusGfsaacu(Tgn)gucg cuGfuUfugacgscsa		UGCGUCAAAACAG CGACAAGUUCC		UGCGUCAAAACAGC GACAAGUUCC	
AD-1446083.1	gsuscaa(Ahd)CfaGfC fGfacaaguuscsa		VPusGfsgaac(Tgn)uguc gcUfgUfuugacsgsc		GCGUCAAAACAGC GACAAGUUCCG		GCGUCAAAACAGCG ACAAGUUCCG	
AD-1446084.1	uscsaaa(Chd)AfgCfG fAfaaguuccsgsa		VPusCfsggaAfcUfUfgu cgCfuGfuugascsg		CGUCAAAACAGCG ACAAGUUCCGC		CGUCAAAACAGCGA CAAGUUCCGC	
AD-1446085.1	cscsgcc(Chd)AfcGfU fAfaaagaugascsa		VPusGfsucau(C2p)uuu uacGfuGfggcggsasa		UUCCGCCACGU AAAAGAUGACG		UUCCGCCACGUAA AAGAUGACG	
AD-1446086.1	cscsacg(Uhd)AfaAfA fGfaugacgcususa		VPusAfsagcGfuCfAfuc uuUfuAfcguggsgsc		GCCCACGUAAAA GAUGACGCUUG		GCCCACGUAAAAG AUGACGCUUG	
AD-1285247.1	cscsacg(Uhd)AfaAfA fGfaugacgcususa		VPusAfsagcg(Tgn)cauc uuUfuAfcguggsgsc		GCCCACGUAAAA GAUGACGCUUG		GCCCACGUAAAAG AUGACGCUUG	

AD-1446087.1	csascgu(Ahd)AfaAfGfAfugacgcuusgsa		VPusCfsaagCfgUfCfau cuUfuUfacgugsgsg		CCCACGUAAAAG AUGACGCUUGG		CCCACGUAAAAGA UGACGCUUGG	
AD-1446088.1	ascsgua(Ahd)AfaGfAfUfgacgcuugsgsa		VPusCfscaag(C2p)guca ucUfuUfuacgugsgsg		CCACGUAAAAGA UGACGCUUGGU		CCACGUAAAAGAU GACGCUUGGU	
AD-1446089.1	csgsuaa(Ahd)AfgAfUfGfacgcuuggsusa		VPusAfscaa(G2p)cguc auCfuUfuuacgsusg		CACGUAAAAGAU GACGCUUGGUG		CACGUAAAAGAUG ACGCUUGGUG	
AD-1446090.1	gsusaaa(Ahd)GfaUfGfAfcgcuuggusgsa		VPusCfsaccAfaGfCfGu caUfcUfuuuacgsu		ACGUAAAAGAUG ACGCUUGGUGU		ACGUAAAAGAUGA CGCUUGGUGU	
AD-1446091.1	usasaaa(Ghd)AfuGfAfCfGcuuggugsusa		VPusAfsaccCfaAfGfcg ucAfuCfuuuuascsg		CGUAAAAGAUGA CGCUUGGUGUG		CGUAAAAGAUGAC GCUUGGUGUG	
AD-1446092.1	asasaag(Ahd)UfgAfCfGfcuuggugusgsa		VPusCfsacaCfcAfAfgc guCfaUfcuuuusasc		GUAAAAGAUGAC GCUUGGUGUGU		GUAAAAGAUGACG CUUGGUGUGU	
AD-1446093.1	asasaga(Uhd)GfaCfGfCuuggugugsusa		VPusAfsaccAfcCfAfag cgUfcAfucuuususa		UAAAAGAUGACG CUUGGUGUGUC		UAAAAGAUGACGC UUGGUGUGUC	
AD-1446094.1	asgsaug(Ahd)CfGfUfUfggugugucsasa		VPusUfsgaca(C2p)acca agCfGfcaucususu		AAAGAUGACGCU UGGUGUGUCAG		AAAGAUGACGCUU GGUGUGUCAG	
AD-1446095.1	asusgac(Ghd)CfuUfGfGfugugucagscsa		VPusGfscuga(C2p)acac caAfgCfGfcaucusu		AGAUGACGCUUG GUGUGUCAGCC		AGAUGACGCUUGG UGUGUCAGCC	
AD-1446096.1	gsascgc(Uhd)UfgGfUfGfugucagccsgsa		VPusCfsggcu(G2p)acac acCfaAfgcguacsasu		AUGACGCUUGGU GUGUCAGCCGU		AUGACGCUUGGUG UGUCAGCCGU	
AD-1446097.1	gscsugc(Chd)CfGfUfUfgcuucucususa		VPusAfsagaGfaAfGfca acCfGfGfGcagsasg		CUGCUGCCCGGU UGCUCUCUUU		CUGCUGCCCGGUU GCUUCUCUUU	

AD-1446098.1	gsuscua(Ghd)CfaAfGfAfgcaggugusgsa	VPusCfsacaCfcUfGfcucuUfgCfuagacscsc	GGGUCUAGCAAGAGCAGGUGUGG	GGGUCUAGCAAGA GCAGGUGUGG
AD-1446099.1	gscsagg(Uhd)GfuGfGfGfuuuaggagsgsa	VPusCfscucCfuAfAfac ccAfcAfccugcsusc	GAGCAGGUGUGGGUUUUAGGAGAU	GAGCAGGUGUGGG UUUAGGAGGU
AD-1446100.1	csasggg(Uhd)UfgGfGfUfuuuaggaggsusa	VPusAfsccuc(C2p)uaaa ccCfaCfaccugscsu	AGCAGGUGUGGGU UUAGGAGAU	AGCAGGUGUGGGU UUAGGAGGUG
AD-1446101.1	asgsgug(Uhd)GfgGfUfUfuaggaggsusa	VPusCfsaccUfcCfUfaa acCfcAfcaccugsc	GCAGGUGUGGGU UUAGGAGAU	GCAGGUGUGGGU UAGGAGGUGU
AD-1446102.1	gsusgug(Ghd)GfuUfUfAfggaggsusa	VPusCfsacaCfcUfCfcu aaAfcCfcacacscsu	AGGUGUGGGUUU AGGAGAU	AGGUGUGGGUUU GGAGGUGUGU
AD-1285244.1	usgscuc(Uhd)CfaCfA fGfuacucgcusgsa	VPusCfsagcGfaGfUfac ugUfgAfgagcasag		CUUGCUCUCACAG UACUCGCUGA
AD-1446103.1	uscsuca(Chd)AfgUfA fCfucgcugagsgsa	VPusCfscuca(G2p)cgag uaCfuGfugagagsgc		GCUCUCACAGUAC UCGCUGAGGG
AD-1446104.1	uscsaca(Ghd)UfaCfU fCfugcugaggsusa	VPusAfsccu(C2p)agcg agUfaCfugugagsgsa		UCUCACAGUACUC GCUGAGGGUG
AD-1285235.1	gscsuga(Ghd)GfgUfGfAfacaagaaasasa	VPusUfsuuuUfuUfGfuu caCfcCfucagcsgsa		UCGCUGAGGGUGA ACAAGAAAAG
AD-1285238.1	asascaa(Ghd)AfaAfA fGfaccugauasasa	VPusUfsuauCfaGfGfuc uuUfuCfuuguuscsa		UGAACAAGAAAAG ACCUGAUAAA
AD-1285243.1	asasgaa(Ahd)AfgAfC fCfugauaaagsasa	VPusUfscuuUfaUfCfag guCfuUfuucuuusgsu		ACAAGAAAAGACC UGAUAAAGAU

AD- 1285234.1	asgsaaa(Ahd)GfaCfC fUfgauaaagasusa		VPusAfsucuUfuAfUfca ggUfcUfuuuucusug			CAAGAAAAGACCU GAUAAAGAUU	
AD- 1285239.1	gsasaaa(Ghd)AfcCfU fGfauaaagausage		VPusAfsaucUfuUfAfuc agGfuCfuuuucsusu			AAGAAAAGACCUG AUAAAGAUUA	
AD- 1285232.1	asasaag(Ahd)CfcUfG fAfuaaagauusasa		VPusUfsaaUCfuUfUfau caGfgUfcuuuuscsu			AGAAAAGACCUGA UAAAGAUUAA	
AD- 1285231.1	asasaga(Chd)CfuGfA fUfaaagauuasasa		VPusUfsuaaUfcUfUfua ucAfgGfucuuususc			GAAAAGACCUGAU AAAGAUUAAAC	
AD- 1285240.1	asasgac(Chd)UfgAfU fAfaagauuaascsa		VPusGfsuaaAfuCfUfuu auCfaGfgucuuususu			AAAAGACCUGAUA AAGAUUAACC	
AD- 1285241.1	gsasccu(Ghd)AfuAf AfAfgauuaaccsasa		VPusUfsgguUfaAfUfcu uuAfuCfaggucsusu			AAGACCUGAUAAA GAUUAACCAG	
AD- 1285242.1	ascscug(Ahd)UfaAfA fGfauuaaccasgsa		VPusCfsuggUfuAfAfuc uuUfaUfcagguscsu			AGACCUGAUAAAG AUUAACCAGA	
AD- 1285233.1	asasaga(Uhd)UfaAfC fCfagaagaasasa		VPusUfsuuuCfuUfCfug guUfaAfucuuusasu			AUAAAGAUUAACC AGAAGAAAAC	
AD- 1285237.1	asusuaa(Chd)CfaGfA fAfgaaaacaasgsa		VPusCfsuugUfuUfUfcu ucUfgGfuuaauscsu			AGAUUAACCAGAA GAAAACAAGG	
AD- 1285236.1	asascca(Ghd)AfaGfA fAfaacaaggasgsa		VPusCfsuccUfuGfUfuu ucUfuCfugguusasa			UUAACCAGAAGAA AACCAAGGAGG	
AD- 1446105.1	gsgsagg(Ghd)AfaAf CfAfacgcagcsa		VPusGfsgcug(C2p)ggu uguUfuCfccuccsusu			AAGGAGGGAAACA ACCGCAGCCU	

AD-1446106.1	gsasggg(Ahd)AfaCf AfAfccgcagccsusa	VPusAfsggcu(G2p)cgg uugUfuUfcccucscsu				AGGAGGGAAACAA CCGCAGCCUG	
AD-1446107.1	csasgcc(Uhd)GfuAfG fCfaagcucugsgsa	VPusCfscaga(G2p)cuug cuAfcAfggcugscsg				CGCAGCCUGUAGC AAGCUCUGGA	
AD-1446108.1	csuscug(Ghd)AfaCfU fCfaggagucgscsa	VPusGfscgac(Tgn)ccug agUfuCfcagagscsu				AGCUCUGGAACUC AGGAGUCGCG	
AD-1446109.1	uscsucc(Uhd)CfaGfA fGfcucgacgsasa	VPusUfsgcgu(C2p)gag cucUfgAfggagasgsc				GCUCUCCUCAGAGC UCGACGCAU	
AD-1446110.1	uscscuc(Ahd)GfaGfC fUfcgacgcaususa	VPusAfsaugc(G2p)ucg agcUfcUfgaggasgsa				UCUCCUCAGAGCUC GACGCAUUU	
AD-1446111.1	ascsuuu(Chd)CfcUfC fUfcuuucucsusa	VPusAfsagAfaAfUfga gaGfgGfaaagusasa				UUACUUUCCCUCUC AUUUCUCUG	
AD-1446112.1	csusuuc(Chd)CfuCfU fCfauuucucugsgsa	VPusCfsagaGfaAfAfug agAfgGfgaaagsusa				UACUUUCCCUCUCA UUUCUCUGA	
AD-1446113.1	ususucc(Chd)UfcUfC fAfuuucucugsasa	VPusUfscaga(G2p)aaau gaGfaGfggaaasgsu				ACUUUCCCUCUCAU UUCUCUGAC	
AD-1446114.1	uscscuc(Chd)UfcAfU fUfucucugacscsa	VPusGfsguca(G2p)agaa auGfaGfagggasasa				UUUCCCUCUCAUU UCUCUGACCG	
AD-1446115.1	cscscuc(Uhd)CfaUfU fUfcucugaccsgsa	VPusCfsgguc(Agn)gag aaaUfgAfgagggsasa				UUCCCUCUCAUUUC UCUGACCGA	
AD-1446116.1	cscsucu(Chd)AfuUfU fCfucugaccgsasa	VPusUfscggu(C2p)aga gaaAfuGfagaggsgsa				UCCCUCUCAUUUCU CUGACCGAA	

AD-1446117.1	uscsuca(Uhd)UfuCfU fCfugaccgaasgsa		VPusCfsuucg(G2p)uca gagAfaAfugagasgsg				CCUCUCAUUUCUCU GACCGAAGC	
AD-1446118.1	csuscaw(Uhd)UfcUfC fUfgaccgaagscsa		VPusGfscuuc(G2p)guc agaGfaAfaugagsasg				CUCUCAUUUCUCU GACCGAAGCU	
AD-1446119.1	uscsauu(Uhd)CfuCfU fGfaccgaagscsa		VPusAfgscuu(C2p)ggg cagAfgAfaaugasgsa				UCUCAUUUCUCUG ACCGAAGCUG	
AD-1446120.1	csuscug(Ahd)CfcGfA fAfgcugggugsusa		VPusAfscacc(C2p)agcu ucGfgUfcagagsasa				UUCUCUGACCGAA GCUGGGUGUC	
AD-1446121.1	gsgsugu(Chd)GfgGf CfUfuucgeccususa		VPusAfgsagg(C2p)gaaa gcCfcGfacaccscsa				UGGGUGUCGGGCU UUCGCCUCUA	
AD-1446122.1	uscsggg(Chd)UfuUf CfGfcccucagcsgsa		VPusCfsgcuAfgAfGfgc gaAfaGfcccgascsa				UGUCGGGCUUUCG CCUCUAGCGA	
AD-1446123.1	csusuuc(Ghd)CfcUfC fUfagcgacugsgsa		VPusCfscagu(C2p)gcua gaGfgCfcaaagscsc				GGCUUUCGCCUCU AGCGACUGGU	
AD-1446124.1	ususegc(Chd)UfcUfA fGfagcuggugsgsa		VPusCfsaccAfgUfCfgc uaGfaGfgcgaasasg				CUUUCGCCUCUAGC GACUGGUGG	
AD-1446125.1	uscsgcc(Uhd)CfuAfG fCfagcuggugsgsa		VPusCfscacCfaGfUfcg cuAfgAfggcgasasa				UUUCGCCUCUAGC GACUGGUGGA	
AD-1446126.1	csgscu(Chd)UfaGfC fGfacuggugsasa		VPusUfscac(C2p)aguc gcUfaGfaggcgsasa				UUCGCCUCUAGCG ACUGGUGGAA	
AD-1446127.1	gscscuc(Uhd)AfgCfG fAfcugguggasasa		VPusUfsucca(C2p)cagu cgCfuAfgaggcsgsa				UCGCCUCUAGCGAC UGGUGGAAU	

AD-1446128.1	csuscua(Ghd)CfgAfC fUfgguggaaususa	VPusAfsauuc(C2p)acca guCfgCfuagagsgsc				GCCUCUAGCGACU GGUGGAAUUG	
AD-1446129.1	uscsuag(Chd)GfaCfU fGfguggaausgsa	VPusCfsaauu(C2p)cacc agUfcGfcuagasgsg				CCUCUAGCGACUG GUGGAAUUGC	
AD-1446130.1	gsascug(Ghd)UfgGf AfAfuugccugcsasa	VPusUfsgcag(G2p)caau ucCfaCfcagucsgsc				GCGACUGGUGGAA UUGCCUGCAU	
AD-1446131.1	ascsgg(Uhd)GfgAf AfUfugccugcasusa	VPusAfsugca(G2p)gcaa uuCfcAfccaguscsg				CGACUGGUGGAAU UGCCUGCAUC	
AD-1446132.1	usgsgug(Ghd)AfaUf UfGfcugcaucscsa	VPusGfsgaug(C2p)agg caaUfuCfcaccasgsu				ACUGGUGGAAUUG CCUGCAUCCG	
AD-1446134.1	uscsugg(Chd)CfuCfU fUfccuugcuususa	VPusAfsaagCfaAfGfga agAfgGfccagasusc				GAUCUGGCCUCUU CCUUGCUIUC	
AD-1446135.1	csusgge(Chd)UfcUfU fCfcuugcuuuscsa	VPusGfsaaag(C2p)aagg aaGfaGfgccagsasu				AUCUGGCCUCUUCC UUGCUIUCC	
AD-1446136.1	usgsgcc(Uhd)CfuUfC fCfuugcuuucscsa	VPusGfsgaaa(G2p)caag gaAfgAfggccasgsa				UCUGGCCUCUUCCU UGCUIUCCC	
AD-1446137.1	gsgscu(Chd)UfuCfC fUfugcuuuccscsa	VPusGfsggaAfaGfCfaa ggAfaGfaggccsasg				CUGGCCUCUUCCUU GCUUUCCCG	
AD-1446138.1	gscscuc(Uhd)UfcCfU fUfgcuuuccsgsa	VPusCfsgggAfaAfGfca agGfaAfgaggcscsa				UGGCCUCUUCCUU GCUUUCCCGC	
AD-1446139.1	ususccu(Uhd)GfcUf UfUfccgcccuscsa	VPusGfsaggg(C2p)ggg aaaGfcAfaggaasgsa				UCUUCCUUGCUIU CCCGCCUCA	

AD-1446140.1	uscscuu(Ghd)CfuUf UfCfccgcccucsasa		VPusUfsgagg(G2p)cgg gaaAfgCfaaggasag				CUUCCUUGC UUCC CGCCUCAG	
AD-1446141.1	cscsuug(Chd)UfuUfC fCfcgcccucasgsa		VPusCfsugag(G2p)gcg ggaAfaGfcaaggsasa				UUCCUUGC UUCCC GCCUCAGU	
AD-1446142.1	csusugc(Uhd)UfuCfC fCfcgcccucagsusa		VPusAfsauga(G2p)ggc gggAfaAfgcaagsgsa				UCCUUGC UUCCCCG CCCUCAGUA	
AD-1446143.1	asgsuac(Chd)CfGfG fCfugucuccususa		VPusAfsagga(G2p)acag cuCfGfGfugucuccusgsa				UCAGUACCCGAGC UGUCUCCUUC	
AD-1446144.1	usasccc(Ghd)AfgCfU fGfucuccuucscsa		VPusGfsgaag(G2p)agac agCfuCfGGguascsu				AGUACCCGAGCUG UCUCCUCCCC	
AD-1446145.1	gsasgga(Ghd)AfuCf AfUfGcggggaugsasa		VPusUfscauc(C2p)cgca ugAfuCfuccucsgsc				GCGAGGAGAUCAU GCGGGAUGAG	
AD-1446146.1	asgsacg(Chd)CfuGfC fAfaauuucagsasa		VPusCfsugaAfaUfUfGfG gcAfgGfGfugucuscsc				GGAGACGCCUGCA CAAUUUCAGC	
AD-1446147.1	gsascgc(Chd)UfgCfA fCfaauuucagscscsa		VPusGfscugAfaAfUfGfG ugCfaGfGfugucuscsc				GAGACGCCUGCAC AAUUUCAGCC	
AD-1446148.1	csgscu(Ghd)CfaCfA fAfuucagccscsa		VPusGfsggcu(G2p)aaa uugUfgCfaggcgsusc				GACGCCUGCACAA UUUCAGCCA	
AD-1446149.1	cscsugc(Ahd)CfaAfU fUfucagcccasasa		VPusUfsuggg(C2p)uga aaUfgUfgcaggscsg				CGCCUGCACAAUU UCAGCCAAG	
AD-1446150.1	csusgca(Chd)AfaUfU fUfcagcccaasgsa		VPusCfsuugg(G2p)cug aaaUfuGfugcagsgsc				GCCUGCACAAUUU CAGCCAAGC	

AD-1446151.1	usgscac(Ahd)AfuUfUfCfagcccaagscsa		VPusGfscuug(G2p)gcu gaaAfuUfgugcasgsg				CCUGCACAAUUUC AGCCCAAGCU	
AD-1446152.1	csasauu(Uhd)CfaGfCfCfaagcuucsusa		VPusAfsgaag(C2p)uug ggcUfgAfaauugsusg				CACAAUUUCAGCCC AAGCUUCUA	
AD-1446153.1	asasuuu(Chd)AfgCfCfCfaagcuucusasa		VPusUfsagaa(G2p)cuu gggCfuGfaaausgsu				ACAAUUUCAGCCC AAGCUUCUAG	
AD-1446154.1	csasgcc(Chd)AfaGfCfUfucuagagasgsa		VPusCfsucuc(Tgn)agaa gcUfuGfggcugsasa				UUCAGCCCAAGCU UCUAGAGAGU	
AD-1446155.1	asgscac(Ahd)AfgCfUfUfcuagagagsusa		VPusAfsucu(C2p)uaga agCfuUfgggcusgsa				UCAGCCCAAGCUUC UAGAGAGUG	
AD-1446156.1	gscscca(Ahd)GfcUfUfCfuagagagusgsa		VPusCfsacuc(Tgn)cuag aaGfcUfugggcsusg				CAGCCCAAGCUUCU AGAGAGUGG	
AD-1446157.1	cscscaa(Ghd)CfuUfCfUfagagagusgsa		VPusCfscacUfcUfCfua gaAfgCfuugggscsu				AGCCCAAGCUUCU AGAGAGUGGU	
AD-1446158.1	cscsaag(Chd)UfuCfUfAfgagaguggsusa		VPusAfsccac(Tgn)cucu agAfaGfcuuggsgsc				GCCCAAGCUUCUA GAGAGUGGUG	
AD-1446159.1	csasagc(Uhd)UfcUfAfGfagaguggusgsa		VPusCfsaccAfcUfCfuc uaGfaAfgcuugsgsg				CCCAAGCUUCUAG AGAGUGGUGA	
AD-1446160.1	asasgcu(Uhd)CfuAfGfAfgaguggugsasa		VPusUfscacc(Agn)cucu cuAfgAfgcuusgsg				CCAAGCUUCUAGA GAGUGGUGAU	
AD-1446161.1	asgscuu(Chd)UfaGfAfGfaguggugasusa		VPusAfsucac(C2p)acuc ucUfaGfaagcususg				CAAGCUUCUAGAG AGUGGUGAUG	

AD-1446162.1	gscsuuc(Uhd)AfgAf GfAfguggugausgsa		VPusCfsauca(C2p)cacu cuCfuAfgaagsusu				AAGCUUCUAGAGA GUGGUGAUGA	
AD-1446163.1	ususcuca(Ghd)AfgAf GfUfggugaugascsa		VPusGfsucau(C2p)acca cuCfuCfuagaasgsc				GCUUCUAGAGAGU GGUGAUGACU	
AD-1446164.1	usasgag(Ahd)GfuGf GfUfgaugacuusgsa		VPusCfsaagu(C2p)auca ccAfcUfcucuasgsa				UCUAGAGAGUGGU GAUGACUUGC	
AD-1446165.1	asgsaga(Ghd)UfgGf UfGfaugacuugscsa		VPusGfscaag(Tgn)cauc acCfaCfucucusasg				CUAGAGAGUGGUG AUGACUUGCA	
AD-1446166.1	gsasgag(Uhd)GfgUf GfAfugacuugcsasa		VPusUfsgcaa(G2p)ucau caCfcAfcucucsusa				UAGAGAGUGGUGA UGACUUGCAU	
AD-1446167.1	asgsugg(Uhd)GfaUf GfAfcuugcauasusa		VPusAfsuaug(C2p)aag ucaUfcAfccacuscsu				AGAGUGGUGAUGA CUUGCAUAUG	
AD-1446168.1	gsgsuga(Uhd)GfaCf UfUfgcauauagasgsa		VPusCfsucaUfaUfGfca agUfcAfcuaccsasc				GUGGUGAUGACUU GCAUAUGAGG	
AD-1446169.1	gsusgau(Ghd)AfcUf UfGfcauauagagsgsa		VPusCfscucAfuAfUfgc aaGfuCfaucacscsa				UGGUGAUGACUUG CAUAUGAGGG	
AD-1446170.1	usgsaug(Ahd)CfuUf GfCfauauagaggsgsa		VPusCfscuucfaUfAfug caAfgUfcaucascsc				GGUGAUGACUUGC AUAUGAGGGC	
AD-1446171.1	asgsggc(Ahd)GfcAf AfUfgcaagucgsgsa		VPusCfscgaCfuUfGfca uuGfcUfgcccuscsa				UGAGGGCAGCAAU GCAAGUCGGU	
AD-1446172.1	gsgsgca(Ghd)CfaAfU fGfcaagucggsusa		VPusAfsccgAfcUfUfgc auUfgCfugcccsusc				GAGGGCAGCAAUG CAAGUCGGUG	

AD-1446173.1	gsgscag(Chd)AfaUfG fCfaagucggusgsa	VPusCfsaccGfaCfUfug caUfuGfcugccscsu				AGGGCAGCAAUGC AAGUCGGUGU	
AD-1446174.1	gscsagc(Ahd)AfuGfC fAfagucggugsusa	VPusAfsacacCfGfCfu gcAfuUfgucgscsc				GGGCAGCAAUGCA AGUCGGUGUG	
AD-1446175.1	csasgca(Ahd)UfgCfA fAfugcggugusgsa	VPusCfsacaCfcGfAfcu ugCfaUfugcugscsc				GGCAGCAAUGCAA GUCGGUGUGC	
AD-1446176.1	csasaug(Chd)AfaGfU fCfggugugcuscsa	VPusGfsagca(C2p)accg acUfuGfcuugscsu				AGCAAUGCAAGUC GGUGUGCUC	
AD-1446177.1	csusgug(Ghd)GfaCf AfUfgaccuggususa	VPusAfsacca(G2p)guca ugUfcCfcacagsasa				UUCUGUGGGACAU GACCUGGUUG	
AD-1446178.1	usgsugg(Ghd)AfcAf UfGfaccugguusgsa	VPusCfsaacCfaGfGfuc auGfuCfccacagsa				UCUGUGGGACAUG ACCUGGUUGC	
AD-1446179.1	gsusggg(Ahd)CfaUf GfAfcugguugscsa	VPusGfscaac(C2p)aggu caUfgUfccacsasg				CUGUGGGACAUGA CCUGGUUGC	
AD-1446180.1	usgsgga(Chd)AfuGf AfCfcugguugcsusa	VPusAfsagcaAfcCfAfgg ucAfuGfuccascsa				UGUGGGACAUGAC CUGGUUGCUU	
AD-1446181.1	gsascu(Ghd)AfcCfU fGfguugcuucsasa	VPusUfsgaag(C2p)aacc agGfuCfaugucscsc				GGGACAUGACCUG GUUGCUCAC	
AD-1446182.1	ascsaug(Ahd)CfcUfG fGfuugcuucascsa	VPusGfsugaa(G2p)caac caGfgUfcaugucscsc				GGACAUGACCUGG UUGCUCACA	
AD-1446183.1	usgsacc(Uhd)GfgUf UfGfcuucacagscsa	VPusGfscugu(G2p)aag caaCfcAfggucasusg				CAUGACCUGGUUG CUUCACAGCU	

AD-1446184.1	gsasccu(Ghd)GfuUf GfCfuucacagcsusa		VPusAfsgcug(Tgn)gaag caAfcCfaggucsasu				AUGACCUGGUUGC UUCACAGCUC	
AD-1446185.1	ascscug(Ghd)UfuGfC fUfucacagcscsa		VPusGfsagcu(G2p)uga agcAfaCfcagguscsa				UGACCUGGUUGCU UCACAGCUCC	
AD-1446186.1	cscsugg(Uhd)UfgCf UfUfcacagcscsa		VPusGfsgagc(Tgn)guga agCfaAfccaggsusc				GACCUGGUUGCUU CACAGCUCCG	
AD-1446187.1	csusggu(Uhd)GfcUf UfCfacagcuccsgsa		VPusCfsggag(C2p)ugu gaaGfcAfacagsgsu				ACCUGGUUGCUUC ACAGCUCCGA	
AD-1446188.1	usgsguu(Ghd)CfuUf CfAfcagcuccgsasa		VPusUfscgga(G2p)cug ugaAfgCfaaccasgsg				CCUGGUUGCUUCA CAGCUCCGAG	
AD-1446189.1	gsgsuug(Chd)UfuCf AfCfagcuccgasgsa		VPusCfsucgGfaGfCfug ugAfaGfcaaccsasg				CUGGUUGCUUCAC AGCUCCGAGA	
AD-1446190.1	gsusugc(Uhd)UfcAf CfAfcguccgagsasa		VPusUfscucg(G2p)agc uguGfaAfgcaacsca				UGGUUGCUUCACA GCUCCGAGAU	
AD-1446191.1	ususgeu(Uhd)CfaCfA fGfcuccgagasusa		VPusAfsucuc(G2p)gag cugUfgAfagcaascsc				GGUUGCUUCACAG CUCCGAGAUG	
AD-1446192.1	csasgeu(Chd)CfgAfG fAfugacacagsasa		VPusUfscugu(G2p)uca ucuCfgGfagcugsusg				CACAGCUCCGAGA UGACACAGAC	
AD-1446193.1	gscsucc(Ghd)AfgAf UfGfacacagacsusa		VPusAfsgucu(G2p)ugu cauCfuCfaggagcsusg				CAGCUCCGAGAUG ACACAGACUU	
AD-1446194.1	csusccg(Ahd)GfaUfG fAfcacagacususa		VPusAfsaguc(Tgn)gug ucaUfcUfcggagscsu				AGCUCCGAGAUGA CACAGACUUG	

AD-1446195.1	uscscga(Ghd)AfuGf AfCfacagacuusgsa		VPusCfsaagu(C2p)ugu gucAfuCfucggasgsc				GCUCCGAGAUGAC ACAGACUUGC	
AD-1446196.1	cscsgag(Ahd)UfgAfC fAfcagacuugscsa		VPusGfscaag(Tgn)cugu guCfaUfcucggsasg				CUCCGAGAUGACA CAGACUUGC	
AD-1446197.1	csgsaga(Uhd)GfaCfA fCfagacuugcsusa		VPusAfskaa(G2p)ucu gugUfcAfucucgsgsa				UCCGAGAUGACAC AGACUUGC	
AD-1446198.1	gsasgau(Ghd)AfcAfC fAfgacuugcsusa		VPusAfsagca(Agn)guc uguGfuCfaucucsgsg				CCGAGAUGACACA GACUUGC	
AD-1446199.1	gsasuga(Chd)AfcAfG fAfcuugcuuasasa		VPusUfsuaag(C2p)aagu cuGfuGfucacsusc				GAGAUGACACAGA CUUGC	
AD-1446200.1	asusgac(Ahd)CfaGfA fCfuugcuuaasasa		VPusUfsuaaa(G2p)caag ucUfgUfgucauscsu				AGAUGACACAGAC UUGC	
AD-1446201.1	usgsaca(Chd)AfgAfC fUfugcuuaasgsa		VPusCfsuuuAfaGfCfaa guCfuGfugucasusc				GAUGACACAGACU UGC	
AD-1446202.1	gsascac(Ahd)GfaCfU fUfgcuuaaagsgsa		VPusCfscuuUfaAfGfca agUfcUfgugucsasu				AUGACACAGACU GCUAAAGGA	
AD-1446203.1	ascsaca(Ghd)AfcUfU fGfcuuaaagsgsa		VPusUfscuuUfuAfAfgc aaGfuCfuguguscsa				UGACACAGACU CUAAAGGA	
AD-1446204.1	csasgac(Uhd)UfgCfU fUfaaaggaagsusa		VPusAfsuuu(C2p)uuu aagCfaAfgucugsusg				CACAGACUUGC AAAGGAAGUG	
AD-1446205.1	asgsacu(Uhd)GfcUfU fAfaaggaagusgsa		VPusCfsacuu(C2p)uuu aaGfcAfaagucugsu				ACAGACUUGC AAGGAAGUGA	

Таблица 7. Скрининг однократной дозы агентов на основе дцРНК, нацеленных на смысловую цепь либо экзона 1А, либо 3'-стороны интронного повтора между экзонами 1А и 1В

Название образца	10 нМ % оставшейся мРНК	СО	1 нМ % оставшейся мРНК	СО	0,1 нМ % оставшейся мРНК	СО
AD-1285232.1	9	1	11	1	17	3
AD-1446196.1	9	1	10	1	16	3
AD-1446111.1	9	2	10	2	16	1
AD-1446182.1	10	1	12	4	24	1
AD-1446084.1	10	2	10	1	19	4
AD-1285231.1	10	2	12	1	15	1
AD-1446185.1	10	2	15	1	22	3
AD-1446200.1	10	1	15	3	18	2
AD-1446083.1	11	1	18	6	24	2
AD-1285233.1	11	3	15	3	21	3
AD-1446202.1	11	2	14	2	18	4
AD-1446152.1	12	1	14	2	22	4
AD-1446188.1	12	1	13	1	18	1
AD-1285241.1	12	2	12	4	20	5

AD-1446113.1	12	2	21	4	29	8
AD-1446150.1	12	2	20	1	30	3
AD-1446090.1	13	2	17	4	24	3
AD-1446197.1	13	3	11	2	19	2
AD-1446194.1	14	3	17	1	27	2
AD-1446184.1	14	1	17	4	24	3
AD-1446199.1	14	2	20	4	23	6
AD-1285237.1	16	5	17	1	23	3
AD-1285242.1	16	2	16	2	20	5
AD-1285234.1	17	3	18	2	23	4
AD-1446087.1	17	1	24	3	32	6
AD-1446112.1	17	3	15	7	20	7
AD-1446103.1	17	2	27	7	40	5
AD-1285238.1	17	3	18	3	23	6
AD-1446156.1	17	3	21	2	33	4
AD-1446161.1	17	1	15	5	25	4
AD-1446114.1	18	5	22	3	37	8

AD-1446154.1	18	2	21	4	32	5
AD-1285239.1	18	7	16	2	21	1
AD-1285236.1	18	4	25	2	25	7
AD-1446166.1	18	1	17	2	37	5
AD-1446180.1	18	5	25	4	36	9
AD-1446192.1	18	2	19	2	29	4
AD-1446095.1	18	4	20	1	31	1
AD-1285243.1	18	4	18	4	24	2
AD-1446167.1	18	2	22	4	40	7
AD-1285244.1	19	3	19	3	31	3
AD-1446158.1	19	3	20	2	30	1
AD-1446201.1	19	4	23	0	24	2
AD-1446168.1	19	3	23	3	44	9
AD-1446092.1	20	5	20	3	27	4
AD-1446157.1	20	3	32	3	41	9
AD-1446170.1	21	3	25	2	52	3
AD-1446149.1	22	2	27	6	37	4

AD-1446091.1	22	5	26	6	41	4
AD-1446198.1	22	3	23	2	41	7
AD-1446117.1	23	4	26	3	26	4
AD-1446073.1	23	3	27	2	37	3
AD-1446148.1	23	3	33	2	42	5
AD-1446088.1	23	3	21	5	33	4
AD-1446160.1	23	4	23	3	30	6
AD-1446183.1	23	6	24	1	40	7
AD-1446153.1	24	4	23	1	35	3
AD-1446147.1	24	2	36	6	41	3
AD-1285240.1	24	3	22	1	25	3
AD-1446089.1	24	1	23	5	37	6
AD-1446205.1	24	10	26	5	31	3
AD-1446195.1	25	3	28	5	45	4
AD-1446162.1	25	1	26	2	33	6
AD-1285246.2	25	8	26	4	34	6
AD-1446177.1	25	3	27	6	46	4

AD-1446189.1	26	5	27	5	42	4
AD-1446169.1	26	5	27	2	52	1
AD-1446086.1	27	5	34	4	47	7
AD-1446151.1	27	7	28	5	32	7
AD-1285235.1	27	5	23	2	34	7
AD-1446203.1	27	7	28	3	37	3
AD-1446163.1	27	4	28	6	47	3
AD-1446179.1	27	2	27	1	41	5
AD-1446193.1	27	3	41	4	50	9
AD-1285247.1	28	5	33	2	42	11
AD-1446075.1	29	4	41	4	51	4
AD-1446107.1	29	3	30	1	43	10
AD-1446146.1	30	4	31	7	43	4
AD-1285246.1	30	6	29	3	38	5
AD-1285245.2	31	1	31	4	40	6
AD-1446190.1	31	6	35	2	49	10
AD-1446173.1	31	4	39	4	56	4

AD-1285245.1	32	3	30	7	43	6
AD-1446174.1	32	4	38	7	59	8
AD-1446175.1	32	3	38	7	59	5
AD-1446204.1	33	4	28	4	41	7
AD-1446116.1	34	5	27	4	35	4
AD-1446186.1	35	10	40	3	57	8
AD-1446165.1	36	5	39	8	52	5
AD-1446077.1	36	2	37	2	53	8
AD-1446164.1	36	2	28	4	46	9
AD-1446081.1	37	3	39	4	52	4
AD-1446131.1	38	5	42	4	55	5
AD-1446102.1	38	7	45	3	54	11
AD-1446172.1	39	5	49	12	61	9
AD-1446118.1	39	10	37	10	50	11
AD-1446130.1	40	10	42	3	60	4
AD-1446187.1	40	5	43	9	59	2
AD-1446145.1	40	6	50	9	69	14

AD-1446076.1	41	4	38	7	43	5
AD-1446191.1	43	4	36	8	43	8
AD-1446098.1	43	12	45	7	56	7
AD-1446125.1	44	7	50	3	55	7
AD-1446078.1	45	10	42	4	56	6
AD-1446110.1	45	9	45	4	51	7
AD-1446082.1	45	6	40	5	51	7
AD-1446115.1	46	6	50	11	65	5
AD-1446080.1	46	8	52	10	70	14
AD-1446181.1	48	2	52	5	74	11
AD-1446159.1	49	3	43	5	46	4
AD-1446099.1	51	7	60	5	74	11
AD-1446101.1	51	1	56	4	65	13
AD-1446126.1	52	8	49	8	59	11
AD-1446176.1	52	9	49	4	61	4
AD-1446079.1	53	3	41	2	42	3
AD-1446124.1	54	3	61	5	67	4

AD-1446122.1	54	3	72	14	74	20
AD-1446105.1	56	14	61	9	74	9
AD-1446074.1	56	7	75	6	76	8
AD-1446136.1	56	9	63	10	79	6
AD-1446097.1	56	9	67	9	74	16
AD-1446129.1	58	6	54	6	55	3
AD-1446108.1	58	7	56	7	64	9
AD-1446178.1	59	6	57	6	77	4
AD-1446128.1	60	10	54	2	68	5
AD-1446155.1	61	7	54	3	67	9
AD-1446137.1	63	9	62	8	77	8
AD-1446085.1	65	5	60	11	72	6
AD-1446106.1	65	5	66	2	64	13
AD-1446132.1	67	1	77	10	85	8
AD-1446104.1	68	17	57	10	68	12
AD-1446127.1	68	6	54	10	56	3
AD-1446171.1	69	10	78	7	88	9

AD-1446120.1	70	14	79	9	79	20
AD-1446144.1	71	7	81	2	86	2
AD-1446135.1	71	6	69	8	84	15
AD-1446096.1	73	7	68	9	89	8
AD-1446094.1	73	10	78	8	76	19
AD-1446100.1	74	8	68	3	79	4
AD-1446140.1	76	13	81	10	83	11
AD-1446143.1	77	5	73	3	78	12
AD-1446141.1	78	9	82	4	89	16
AD-1446138.1	81	8	89	6	97	16
AD-1446134.1	85	14	81	4	89	15
AD-1446139.1	87	12	91	14	90	19
AD-1446123.1	89	28	100	8	94	14
AD-1446121.1	89	3	89	3	91	8
AD-1446109.1	90	8	93	15	100	10
AD-1446119.1	92	5	85	14	83	5
AD-1446142.1	93	19	89	8	87	10

AD-1446093.1	NA	17	21	3	24	2
--------------	----	----	----	---	----	---

Таблица 7а. Целевые последовательности РНК *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 50\%$ мРНК после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерения, приведенным в **Таблице 7.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5035	5059	TGCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC	51
5058	5087	GCCACGTAAGATGACGCTTGGTGTGTC	52
5197	5222	CTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGG	53
5213	5270	TCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAGACCTGATAAAG ATTAACCAGAAGAAAACAAGGAGG	54
5539	5565	TТАCTTTCCCTCTCATTCTCTGACCG	55
5545	5570	TCCCTCTCATTCTCTGACCGAAGCT	56
5916	5955	GGAGACGCCTGCACAATTCAGCCCAAGCTTCTAG AGAGT	57
5935	5968	CAGCCCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATGACTTGC	58
5948	5976	TAGAGAGTGGTGATGACTTGCATATGAGG	59
6007	6030	CTGTGGGACATGACCTGGTTGCTT	60
6012	6039	GGACATGACCTGGTTGCTTACAGCTCC	61
6020	6070	CCTGGTTGCTTACAGCTCCGAGATGACACAGACT TGCTTAAAGGAAGTGA	62

Таблица 7б. Целевые последовательности РНК *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 40\%$ мРНК после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерения, приведенным в **Таблице 7.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5035	5059	TGCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC	63
5059	5084	CCCACGTAAGATGACGCTTGGTGT	64
5064	5087	GTAAGATGACGCTTGGTGTGTC	65
5197	5222	CTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGG	66
5213	5270	TCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAGACCTGATAAAG ATTAACCAGAAGAAAACAAGGAGG	67

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5539	5565	TTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGACCG	68
5545	5569	TCCCTCTCATTTCTCTGACCGAAGC	69
5921	5955	CGCCTGCACAATTTTCAGCCCAAGCTTCTAGAGAGT	70
5939	5963	CCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATGA	71
5948	5973	TAGAGAGTGGTGATGACTTGCATATG	72
6012	6039	GGACATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC	73
6036	6059	CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT	74
6040	6066	GAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGAA	75

Таблица 7с. Целевые последовательности РНК *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 30\%$ мРНК после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерения, приведенным в **Таблице 7.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5036	5059	GCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC	76
5064	5087	GTA AAAGATGACGCTTGGTGTGTC	77
5223	5270	TGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAGA AGAAAACAAGGAGG	78
5539	5563	TTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGAC	79
5939	5962	CCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATG	80
6016	6039	ATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC	81
6036	6059	CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT	82
6040	6065	GAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGA	83

Таблица 7d. Целевые последовательности РНК *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 25\%$ мРНК после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерения, приведенным в **Таблице 7.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5036	5059	GCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC	84
5223	5270	TGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAGAA GAAAACAAGGAGG	85
5539	5562	ТТАСТТТСССТСТСАТТТСТСТГА	86
6016	6039	АТГАСТТГГТТГСТТСАСАСТТСС	87
6036	6059	СТССГАГАТГАСАСАСТТГСТТ	88
6040	6065	ГАГАТГАСАСАСТТГСТТАААААГА	89

Таблица 7е. Целевые последовательности РНК *C9ORF72*, для которых осталось $\leq 20\%$ мРНК после введения дозы 0,1 нМ, по данным измерения, приведенным в **Таблице 7.**

Мишень Начало	Мишень Конец	Целевая последовательность РНК (NG_031977.2)	SEQ ID NO:
5229	5252	АГААААГАСТТГАТАААГАТТААС	90
5233	5256	ААГАСТТГАТАААГАТТААССАГА	91
5539	5562	ТТАСТТТСССТСТСАТТТСТСТГА	92
6036	6059	СТССГАГАТГАСАСАСТТГСТТ	93

Пример 3. Оценка *in vivo* у трансгенных мышей

В данном примере описаны способы оценки агентов РНК и *C9orf72* в наборе аллелей генетически модифицированных мышей (US 10781453, WO/2018/064600, US2020/0196581 и WO/2020/131632, полное содержание каждой из вышеуказанных заявок включено в настоящий документ посредством ссылки). Набор аллелей включает группу ES-клеток мыши, в которых часть гена *C9orf72* мыши, которая включает экзоны 1А и 1В и смежные интронные последовательности, точно заменена гомологичным фрагментом из гена *C9orf72* человека, несущим экспансию гексануклеотидного повтора GGGGCC разной длины от нормального диапазона в 3-30 повторов до более чем 500 повторов. ES-клетки с набором аллелей применяют для получения мышей стандартными способами, такими как способ инъекции 8-клеточного эмбриона VelociMouse (Poueymirou et al., 2007).

Агенты на основе дцРНК, разработанные и проанализированные в Примере 5, оценивают в отношении их способности снижать уровень смысловой или бессмысловой содержащей повтор GGGGCC или содержащей интрон РНК, или сплайсированной РНК с экзонов 1А и 1В или общей мРНК *C9orf72* с помощью, например, флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) для очагов РНК с использованием специфичных в отношении цепи зондов (Exiqon, Inc.), количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) или

с помощью гибридизации с зондами, специфичными в отношении цепи, например, технологий анализа Nanostring[®], QantiGene[®] или Lucerna[®] у мышей с набором аллелей.

В общих чертах, гетерозиготным или гомозиготным мышам, несущим до или более 500 повторов GGGGCC, вводят путем интрацеребровентрикулярной, интратекальной или подкожной инъекции однократную дозу представляющих интерес агентов на основе дцРНК, включая дуплексы AD-463858, AD-463860, AD-463862, AD-463863, AD-463869, AD-463871, AD-463872, AD-463873, AD-463877, или плацебо. Через 2-10 недель после введения животных умерщвляют, собирают образцы крови и тканей, включая кору головного мозга, спинной мозг, печень, селезенку и шейные лимфатические узлы, и РНК очищают из образцов тканей. Содержащую повторы или содержащую интрон, или нормальную РНК, продуцируемую из генетически модифицированного гена *C9orf72*, анализируют с помощью таких способов как FISH, ОТ-кПЦР или способы детектирования РНК, специфичные в отношении цепи. Результаты, полученные у мышей, несущих длинные экспансии повторов GGGGCC до или более 500 повторов, сравнивают с контрольными мышами, имеющими нормальную длину повторов от 3 до 30 повторов.

В дополнение к РНК белок экстрагируют из тканей мышей и анализируют на присутствие патогенных белков с дипептидными повторами, включая поли(GlyPro), поли(GlyAla), поли(GlyArg), поли(ProAla) и поли(ProArg), продуцируемых посредством ассоциированной с повторами трансляции, зависимой от кодона, отличного от AUG, и канонической трансляции смыслового и антисмыслового транскриптов *C9orf72*, содержащих повторы GGGGCC. Белки с дипептидными повторами и нормальные белки *C9orf72* анализируют в тканях мыши с использованием доступных антител к отдельным белкам с дипептидными повторами с помощью иммуногистохимического анализа, Вестерн-блоттинга, твердофазных иммуноферментных анализов и анализов MesoScale Discovery[®]. Результаты, полученные для клеток и мышей, несущих длинные экспансии повторов GGGGCC до или более 500 повторов, сравнивают с клетками, имеющими нормальную длину повторов от 3 до 30 повторов.

Результаты демонстрируют, что введение агентов на основе дцРНК мышам с набором аллелей ингибирует продуцирование смысловых содержащих повторы и содержащих интрон транскриптов *C9orf72* и антисмысловых содержащих повторы транскриптов *C9orf72*, но не влияет на уровень общей мРНК *C9orf72* и уровень экзон 1В-содержащей мРНК *C9orf72*. Результаты также демонстрируют, что введение агентов на основе дцРНК ингибирует продуцирование белков с дипептидными повторами, полученных из смысловых и антисмысловых содержащих повторы транскриптов *C9orf72*, но не влияет на уровень нормальных белков *C9orf72*. Результаты демонстрируют, что введение агентов на основе дцРНК снижает уровень смысловой и антисмысловой РНК, содержащей повторы, во всей центральной нервной системе, включая головной мозг, ствол головного мозга и спинной мозг. Результаты демонстрируют, что максимальное снижение уровня белков с дипептидными повторами, продуцируемых в организме мышей с набором аллелей, несущих экспансии повтора GGGGCC, достигается с помощью агентов на основе

дцРНК, которые нацелены как на смысловые, так и на антисмысловые транскрипты *C9orf72*, содержащие повторы GGGGCC.

Название дуплекса	Смысловая цепь согласно transSeq	Антисмысловая цепь согласно transSeq
AD-463858	ACAAGAAAAGACCUGAUAAAU	AUUUAUCAGGUCUUUUCUUGUUC
AD-463860	AGAAAAGACCUGAUAAAGAUAU	AAUCUUUAUCAGGUCUUUUCUUG
AD-463862	AAAAGACCUGAUAAAGAUUAA	UUAUAUCUUUAUCAGGUCUUUUC
AD-463863	AAAGACCUGAUAAAGAUUAAU	AUUAUAUCUUUAUCAGGUCUUUUC
AD-463869	CUGAUAAAGAUUAACCAGAAU	AUUCUGGUUAAUCUUUAUCAGG
AD-463871	GAUAAAGAUUAACCAGAAGAA	UUCUUCUGGUUAAUCUUUAUCA
AD-463872	AUAAAGAUUAACCAGAAGAAA	UUUCUUCUGGUUAAUCUUUAUC
AD-463873	AAAGAUUAACCAGAAGAAAUAU	AUUUUCUUCUGGUUAAUCUUUAU
AD-463877	UAACCAGAAGAAAACAAGGAU	AUCCUUGUUUUCUUCUGGUUAAU
Название дуплекса	Смысловая цепь согласно oligoSeq	Антисмысловая цепь согласно oligoSeq
AD-463858	ascsaagaAfaAfGfAfccugauaaauL96	asUfsuuaUfcAfGfgucuUfuUfcuugusus
AD-463860	asgsaaaaGfaCfCfUfgauaaagauuL96	asAfsucuUfuAfUfcaggUfcUfuuuucus
AD-463862	asasaagaCfcUfGfAfuaaagauuaaL96	usUfsaaUCfuUfUfaucGfgUfcuuuuscs
AD-463863	asasagacCfuGfAfUfaaagauuaauL96	asUfsuaaUfcUfUfaucAfgGfucuuusus
AD-463869	csusgauaAfaGfAfUfaaaccagaauL96	asUfsucuGfgUfUfaucUfuUfaucagsgs

AD- 463871	gsasuaaaGfaUfUfAfaccagaagaaL96	usUfscuuCfuGfGfuuaaUfcUfuuaucsas g
AD- 463872	asusaaagAfuUfAfAfccagaagaaaL96	usUfsucuUfcUfGfguuaAfuCfuuuauscs a
AD- 463873	asasagauUfaAfCfCfagaagaaaauL96	asUfsuuuUfcUfCfugguUfaAfucuuus u
AD- 463877	usasaccaGfaAfGfAfaaacaaggauL96	asUfscuUfgUfUfuucuUfcUfgguuas u

Пример 4. Дополнительные агенты, нацеленные на *C9orf72*

Дополнительные агенты, нацеленные на *C9orf72*, конструировали и синтезировали, как описано выше.

Немодифицированные нуклеотидные последовательности данных агентов представлены в Таблице 8, и модифицированные нуклеотидные последовательности данных агентов представлены в Таблице 9.

Таблица 8. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК, нацеленных на *C9Orf72*

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_001256054	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_001256054
AD-1285248	CAUAUGGACUAUCAAUU AUA		1092-1112	UUAUAATUGAUAGUCCAUA UGUG		526-548
AD-1285249	UGUUGCCAAGACAGAGA UUGA		375-395	UCAAUCTCUGUCUUGGCAA CAGC		233-255
AD-1285250	CAAGACAGAGAUUGCUU UAAA		2015-2035	UUUAAAGCAAUCUCUGUCU UGGC		239-261
AD-1285251	UAAAUGGAGAAAUCCUU CGAA		1092-1112	UUCGAAGGAUUUCUCCAUA UAGA		400-422
AD-1285252	UGUGUGUUGAUAGAUUA ACAA		594-614	UUGUUAUCUAUCAACACA CACU		589-611
AD-1285253	CAGAACUUAGUUUCUAC CUCA		3227-3247	UGAGGUAGAAACUAAGUUC UGUC		556-578
AD-1285254	ACAGAACUUAGUUUCUA CCUA		3228-3248	UAGGUAGAAACUAAGUUCU GUCU		555-577
AD-1285255	UGGACUAUCAAUUAUAC UUCA		928-948	UGAAGUAUAAUUGAUAGUC CAUA		530-552
AD-1285256	AGUGAUGUCGACUCUUU GCCA		760-780	UGGCAAAGAGUCGACAUCA CUGC		197-219

AD-1285257	AAGACAGAGAUUGC AAGA	1539-1559	UCUUAAGCAAUCUCUGUC UUGG	240-262
AD-1285258	AAUAUUCUUGGUCCUAG AGUA	616-636	UACUCUAGGACCAAGAAUA UUGU	303-325
AD-1285259	UGAUACAGUACUCA AUGA	3089-3109	UCAUCATUGAGUACUGUAU CAGC	806-828
AD-1285260	UAGCUGAUACAGUACUC AAUA	2131-2151	UAUUGAGUACUGUAUCAGC UAUA	802-824
AD-1285261	CUGUCAUGAAGGCUUUC UUCA	373-393	UGAAGAAAGCCUUCAUGAC AGCU	842-864
AD-1285262	ACAUAUUUAUAAUCAGC GUAA	1006-1026	UUACGCTGAUUAUAAUUAU GUUC	1169-1191
AD-1285263	GUCUUACACAGAGACAC UCUA	1581-1601	UAGAGUGUCUCUGUGUAAG ACAU	1308-1330

Таблица 9. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК, нацеленных на *C9orf72*

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Целевая последовательность мРНК	SEQ ID NO:
AD-1285248	csasuau(Ghd)GfaCfUfAfuc uuasasa		VPusUfsauaa(Tgn)ugauagUfc Cfauaugsusg		CACAU AUGGACUAUCAA UUAUAC	
AD-1285249	usgsuug(Chd)CfaAfGfAfcaga gauusgsa		VPusCfsaauc(Tgn)cugucuUfg Gfcaacasgsc		GCUGUUGCCAAGACAGA GAUUGC	

AD-1285250	csasaga(Chd)AfgAfGfAfuugc uuuasasa		VPusUfsuaaa(Ggn)caaucuCfu Gfucuugsgsc		GCCAAGACAGAGAUUGC UUUAAG	
AD-1285251	usasaau(Ghd)GfaGfAfAfaucc uucgsasa		VPusUfscgaa(Ggn)gauuucUfc Cfauuuasgsa		UCUAAAUGGAGAAAUCC UUCGAA	
AD-1285252	usgsugu(Ghd)UfuGfAfUfagau uaacsasa		VPusUfsguua(Agn)ucuaucAfa Cfacacascsu		AGUGUGUGUUGAUAGAU UAACAC	
AD-1285253	csasgaa(Chd)UfuAfGfUfuucu accuscsa		VPusGfsaggu(Agn)gaaacuAfa Gfuucugsusc		GACAGAACUUAGUUUCU ACCUCC	
AD-1285254	ascsaga(Ahd)CfuUfAfGfuuuc uaccsusa		VPusAfsggua(Ggn)aaacuaAfg Ufucuguscusu		AGACAGAACUUAGUUUC UACCUC	
AD-1285255	usgsgac(Uhd)AfuCfAfAfuau acuuscsa		VPusGfsaagu(Agn)uaauugAfu Afguccasusa		UAUGGACUAUCAAUUAU ACUUC	
AD-1285256	asgsuga(Uhd)GfuCfGfAfcucu uugcscsa		VPusGfsgcaa(Agn)gagucgAfc Afucacusgsc		GCAGUGAUGUCGACUCU UUGCCC	
AD-1285257	asasgac(Ahd)GfaGfAfUfugcu uuasgsa		VPusCfsuaaa(Agn)gcaaucUfc Ufgucuusgsg		CCAAGACAGAGAUUGCU UUAAGU	
AD-1285258	asasuau(Uhd)CfuUfGfGfuccu agagsusa		VPusAfsccu(Agn)ggaccaAfg Afauauusgsu		ACAAUAUUCUUGGUCCU AGAGUA	
AD-1285259	usgsaua(Chd)AfgUfAfCfucaa ugausgsa		VPusCfsauca(Tgn)ugaguaCfu Gfuaucasgsc		GCUGAUACAGUACUCAA UGAUGA	
AD-1285260	usasgcu(Ghd)AfuAfCfAfguac ucaasusa		VPusAfsuuga(Ggn)uacuguAfu Cfagcuasusa		UAUAGCUGAUACAGUAC UCAUG	

AD- 1285261	csusguc(Ahd)UfgAfAfGfgcuu ucuuscsa		VPusGfsaaga(Agn)agccuuCfa Ufgacagscsu		AGCUGUCAUGAAGGCUU UCUUCU	
AD- 1285262	ascsaua(Uhd)UfuAfUfAfauca gcgusasa		VPusUfsacgc(Tgn)gauuauAfa Afuagususc		GAACAUUUUAUAAUCA GCGUAG	
AD- 1285263	gsuscuu(Ahd)CfaCfAfGfagac acucsusa		VPusAfsagagu(Ggn)ucucugUfg Ufaagacsasu		AUGUCUUACACAGAGA CACUCUA	

Пример 5. Оценка *in vitro* композиций, содержащих два или более агентов на основе дцРНК, нацеленных на *C9orf72*

Смысловая и антисмысловая РНК, несущая экспансию повторов, детектированная как цитоплазматические и ядерные очаги с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), может сквестрировать РНК-связывающие белки, что приводит к клеточной токсичности. Кроме того, предполагается, что белки с дипептидными повторами (DPR) продуцируются из смысловой и антисмысловой РНК, несущей экспансию повтора G_4C_2 , неканоническим способом, который называют ассоциированной с повторами трансляцией, зависимой от кодона, отличного от AUG (RAN), и существуют убедительные доказательства того, что белки DPR являются цитотоксическими. Белки DPR могут быть транслированы со всех смысловых и антисмысловых рамок считывания. Смысловые белки DPR включают белки DPR глицин-аланин, глицин-аргинин и глицин-пролин. Антисмысловые белки DPR включают пролин-аргинин, пролин-аланин и глицин-пролин. Поскольку РНК, содержащие повторы G_4C_2 , либо сами по себе, либо в качестве матриц для трансляции белка с дипептидными повторами, по-видимому, являются патогенными, общая терапевтическая стратегия заключается либо в ингибировании их синтеза, либо в содействии их разрушению. В примере ниже продемонстрировано, что киРНК, которые нацелены как на смысловые, так и на антисмысловые РНК *C9orf72*, необходимы для достижения максимального нокдауна белков с дипептидными повторами в гуманизированных моделях *C9orf72*.

РНК-интерференцию изучали в качестве способа разрушения РНК, содержащей повторы G_4C_2 *C9orf72*. Поскольку сам по себе повтор G_4C_2 и GC-богатая последовательность, которая является непосредственно 3'-смежной, несовместимы с дизайном специфичных киРНК и целевые последовательности в экзоне 1В (E1B) и его смежный интрон могут мешать мРНК *C9orf72*, то конструкции киРНК были сосредоточены на смысловых и антисмысловых РНК, несущих последовательности, полученные из области гена *C9orf72* человека между E1A и началом экспансии повторов. Тестировали четыре киРНК: две, нацеленные на смысловую РНК, и две, нацеленные на антисмысловые транскрипты, в ES-клетках мыши с аллелем, несущим 300X экспансию повторов. Немодифицированные и модифицированные нуклеотидные последовательности используемых агентов представлены в Таблицах 10A-10D ниже.

киРНК, нацеленные на смысловую РНК, обеспечивали 50-60% снижение уровня содержащих интрон транскриптов (Фиг. 5A), как определено в анализе методом ОТ-кПЦР для интронной последовательности вблизи E1A. Две киРНК, нацеленные на антисмысловую РНК, обеспечивали 40-50% увеличение сигнала в одном и том же анализе (Фиг. 5A). Комбинирование одной из нацеленных на смысловую цепь киРНК с любой из двух нацеленных на антисмысловую цепь киРНК не вызывало дополнительного нокдауна содержащей интрон РНК по сравнению с тем, который был вызван киРНК, нацеленной на смысловую цепь, по отдельности (Фиг. 5A). Ни киРНК, нацеленные на смысловую РНК, ни

киРНК, нацеленные на антисмысловую РНК, не оказывали заметного эффекта на мРНК *C9orf72* (Фиг. 5В).

Также анализировали влияние киРНК на синтез белка DPR с помощью Вестерн-блоттинга (Фиг. 6А). Количественный анализ по результатам данных анализов выявил, что по сравнению с контрольным носителем обе нацеленные на смысловую цепь киРНК снижали уровень поли(GlyAla) приблизительно на 75% (Фиг. 6В), в то время как нацеленные на антисмысловую цепь киРНК фактически вызывали незначительное увеличение уровня поли(GlyAla) (Фиг. 6В), что согласуется с умеренным увеличением содержащей интрон РНК, которое вызывают данные киРНК (Фиг. 5А). Комбинация нацеленной на смысловую цепь и нацеленной на антисмысловую цепь киРНК не усиливала ингибирование поли(GlyAla), достигаемое с помощью нацеленной на смысловую цепь киРНК по отдельности. Нацеленные на смысловую цепь киРНК ингибировали синтез поли(GlyPro) приблизительно на 20%, в то время как нацеленные на антисмысловую цепь киРНК обеспечивали более сильный нокдаун на 60-70% (Фиг. 6С). Комбинирование нацеленной на смысловую цепь и нацеленной на антисмысловую цепь киРНК дополнительно снижало синтез поли(GlyPro), достигая приблизительно 80% нокдауна (Фиг. 6С). Эти результаты подтверждают ожидание того, что смысловая РНК служит в качестве матрицы для трансляции поли(GlyAla), тогда как поли(GlyPro) синтезируется как из смысловых, так и из антисмысловых РНК-матриц. Более сильное ингибирование синтеза поли(GlyPro), достигнутое с помощью нацеленных на антисмысловую цепь киРНК, указывает на то, что большая часть данного белка DPR продуцируется с антисмысловых транскриптов в 300X модели. При использовании поли(GlyAla) и поли(GlyPro) в качестве суррогатов для синтеза DPR со смысловой РНК (поли(GlyAla), поли(GlyPro) и поли(GlyArg)) и антисмысловой РНК (поли(GlyPro), поли(AlaPro) и поли(ProArg)), соответственно, результаты демонстрируют, что терапевтическая РНКи для *C9orf72* ALS может требовать киРНК, которые нацелены как на смысловые, так и на антисмысловые транскрипты, чтобы достичь максимального ингибирования синтеза белка DPR.

Таблица 10А. Немодифицированные нуклеотидные последовательности агентов РНКи, нацеленных на антисмысловую цепь

Название дуплекса	Смысловая цепь	Антисмысловая цепь
AD-1446213	GCUUCGGUCAGAGAAAUGAG A	UCUCAUUUCUCUGACCGAAGCUG
AD-1446246	UUCCCUCUUGUUUCUUCUA	UAGAAGAAAACAAGGAGGGAAA C
AD-1446268	CUUUAUCAGGUCUUUCUUGA	UCAAGAAAAGACCUGAUAAAGA U

Таблица 10В. Немодифицированные нуклеотидные последовательности агентов РНКи, нацеленных на смысловую цепь

Название дуплекса	Смысловая цепь	Антисмысловая цепь
AD-1285238	AACAAGAAAAGACCUGAUAAA	UUUAUCAGGUCUUUUCUUGUUC A
AD-1285234	AGAAAAGACCUGAUAAAGAU A	UAUCUUUAUCAGGUCUUUUCUU G

Таблица 10С. Модифицированные нуклеотидные последовательности агентов РНКи, нацеленных на антисмысловую цепь

Название дуплекса	Смысловая цепь	Антисмысловая цепь
AD-1446213.1	gscsuuc(Ghd)GfuCfAfGfagaaaugas gsa	VPusCfsucaUfuUfCfucugAfcCfgaagcsus g
AD-1446246.1	ususccc(Uhd)CfcUfUfGfuuuuucuus usa	VPusAfsгааGfaAfAfaciaGfgAfgggaasas c
AD-1446268.1	csusuua(Uhd)CfaGfGfUfcuuuucuus gsa	VPusCfsaagAfaAfAfgaccUfgAfuaaagsas u

Таблица 10D. Модифицированные нуклеотидные последовательности агентов РНКи, нацеленных на смысловую цепь

Название дуплекса	Смысловая цепь	Антисмысловая цепь
AD-1285238.1	asascaa(Ghd)AfaAfAfGfaccugauas asa	VPusUfsuauCfaGfGfucuuUfuCfuuguuscs a
AD-1285234.1	asgsaaa(Ahd)GfaCfCfUfgauaaagas usa	VPusAfsucuUfuAfUfcaggUfcUfuuuucusus g

Пример 6. Скрининг *in vivo* дуплексов дцРНК у мышей

Дуплексы, нацеленные на антисмысловую цепь интрона 1A *C9orf72*, оценивали *in vivo*.

В Таблице 11 приведены немодифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов, нацеленных на антисмысловую цепь интрона 1A *C9orf72*, и в Таблице 12 приведены модифицированные нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов, нацеленных на антисмысловую цепь интрона 1A *C9orf72*, использованные в данном исследовании.

В День -14 до введения дозы мышей дикого типа (C57BL/6) трансдуцировали путем внутривенного введения либо 2×10^{10} , либо 2×10^{11} вирусных частиц вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), содержащего область между экзоном 1A и экспансией повторов *C9orf72* человека, которая включает часть интрона 1A. Антисмысловая последовательность вектора приведена в SEQ ID NO: 94.

В день 0 группам из трех мышей интратекально вводили однократную дозу 3 мг/кг представляющих интерес агентов, однократную дозу 3 мг/кг или 10 мг/кг агента на основе дцРНК, нацеленного на ген, отличный от *C9orf72*, в качестве положительного контроля, или контрольный ФСБ. На день 14 после введения дозы животных умерщвляли, собирали образцы головного мозга и быстро замораживали в жидком азоте. РНК головного мозга экстрагировали и анализировали с помощью способа ОТ-кПЦР.

Интронные зонды использовали для детектирования области в интроне. Уровни антисмысловой цепи интрона *C9orf72* человека сравнивали с геном «домашнего хозяйства» GAPDH. Затем значения нормировали к среднему значению для контрольной группы, получавшей носитель ФСБ. Данные выражали как процент от исходного уровня и представляли в виде среднего значения плюс стандартное отклонение. Результаты, перечисленные в Таблице 13 и показанные на Фигуре 7, демонстрируют, что примерные протестированные дуплексные агенты, которые нацелены на антисмысловую цепь интрона 1A *C9orf72* человека, эффективно снижают уровень антисмысловой РНК *C9orf72* человека *in vivo*.

Таблица 11. Немодифицированные нуклеотидные последовательности агентов РНКи, нацеленных на антисмысловую цепь интрона 1А

Название дуплекса	Смысловая цепь от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая цепь от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:
AD-1721933.1	CUUUAUCAGGUCUUUUCUUGA		UCAAGAAAAGACCUGAUAAAGAU	
AD-1721934.1	UUCUGGUUAAUCUUUAUCAGA		UCUGAUAAAGAUUAACCAGAAGA	
AD-1721935.1	CUUGUUUUCUUCUGGUUAAUA		UAUUAACCAGAAGAAAACAAGGA	

Таблица 12. Модифицированные нуклеотидные последовательности агентов РНКи, нацеленных на антисмысловую цепь интрона 1А

Название дуплекса	Смысловая цепь от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:	Антисмысловая цепь от 5'-конца к 3'-концу	SEQ ID NO:
AD-1721933.1	csusuaa(Uhd)CfaGfGfUfcuuuucuugaL96		VPusCfsaagAfaAfAfgaccUfgAfuaaagsasu	
AD-1721934.1	ususcug(Ghd)UfuAfAfUfcuuuaucagaL96		VPusCfsugaUfaAfAfgauuAfaCfcagaasgsa	
AD-1721935.1	csusugu(Uhd)UfuCfUfUfcugguuaauaL96		VPusAfsuaaAfcCfAfgaagAfaAfacaagsgsa	

Таблица 13.

Группа №	Животное №	Обработка	Титр ААВ	Доза	средн./мышь	групповое среднее	СО	нормировано к 100	групповое среднее				
1	1	ФСБ	2,00x10 ¹⁰	н/п	145,4583443	110,0603	42,56176 62	132,1624	100				
	2				121,8865945			110,7452					
	3				62,8360996			57,09241					
2	4	Наивные		2,00x10 ¹⁰	н/п	108,7414693	82,25354	55,86887 9	98,80168	74,73495			
	5					18,06722083			16,41574				
	6					119,9519394			108,9874				
3	7	AD-64958 (контроль)			2,00x10 ¹⁰	3	44,82748779	49,17021	3,847954 64	40,72992	44,67568		
	8						52,15540902			47,38801			
	9						50,52772992			45,90911			
4	10	AD-64958 (контроль)				2,00x10 ¹⁰	10	57,90374506	51,88677	19,54100 98	52,61091	47,14393	
	11							67,7117117			61,52235		
	12							30,04485251			27,29853		
5	13	AD-1721933.1					2,00x10 ¹⁰	3	31,8631398	68,36251	32,77866 89	28,95061	62,11366
	14								95,2890682			86,57893	

	15				77,935321			70,81144	
6	16	AD-1721934.1		3	82,4652133	82,03793	10,61446 06	74,92727	74,53904
	17				71,21627551			64,70657	
	18				92,43229251			83,98328	
7	19	AD-1721935.1		3	45,68231369	75,5266	29,50459 99	41,50661	68,6229
	20				76,21814549			69,25123	
	21				104,6793558			95,11087	
8	22	ФСБ		н/п	117,7590945	106,9963	43,51903 29	110,059	100
	23				59,10574588			55,24093	
	24				144,1240461			134,7	
9	25	Наивные	2,00x10 ¹¹	н/п	122,9141465	125,8956	17,14425 89	114,877	117,6635
	26				110,4376191			103,2163	
	27				144,3350411			134,8972	
10	28	AD-64958 (контроль)		3	78,98649992	52,80346	23,04631 6	73,82171	49,35074
	29				35,59259337			33,26526	
	30				43,83128886			40,96524	

11	31	AD-64958 (контроль)		10	103,7821236	60,751	37,37843 16	96,996	56,77861
	32				36,33902969			33,96289	
	33				42,13185889			39,37693	
12	34	AD-1721933.1		3	28,02191177	42,90744	21,69916 53	26,18961	40,1018
	35				67,80499251			63,37135	
	36				32,89542331			30,74445	
13	37	AD-1721934.1		3	68,07513475	87,5624	17,49736 85	63,62382	81,83686
	38				92,68622676			86,62564	
	39				101,9258501			95,2611	
14	40	AD-1721935.1		3	51,21572748	46,91163	8,937572 75	47,86682	43,84416
	41		36,636385				34,2408		
	42		52,88276877				49,42486		

Идентификатор дуплекса	Цепь	Модифицированная последовательность	Немодифицированная последовательность
AD-64958 (контроль)	смысловая цепь	asascaguGfuUfCfUfugcucuauaaL96	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
	антисмысловая цепь	usUfsauaGfagcaagaAfcAfcuguususu	UUAUAGAGCAAGAACACUGUUU U

Пример 7. Картирование сайта начала транскрипции антисмысловой РНК *C9orf72*

Картирование сайта начала транскрипции (TSS) антисмысловых транскриптов, продуцируемых с гуманизированных аллелей *C9orf72* мыши, с помощью 5'-RACE, выявило, что все клоны кДНК имеют одинаковую последовательность, картирование которой показало один TSS в аденозине, расположенном на 171 п. о. ниже 3'-конца кодирующей экзон 1В ДНК, приблизительно на 270 п. о. ниже экспансии гексануклеотидного повтора GGGGCC. Для подтверждения этого картирования и измерения содержания антисмысловой цепи, продуцируемой из TSS, использовали набор специфичных в отношении цепи зондов Nanostring® для количественного определения антисмысловой РНК *C9orf72*. Зонды конструировали для гибридизации с антисмысловой РНК, полученной из различных областей гуманизированных аллелей, вблизи картированного сайта начала (зонд I) и как выше (зонд G), так и ниже сайта начала (зонды 3'-rep, 5'-rep, E и A) (Фиг. 8). Мы также разработали зонды для распознавания антисмысловых РНК, которые могут простираться на 200-1200 нуклеотидов выше сайта начала экзона 1А смысловой РНК мыши.

Результаты Nanostring выявили, что в двигательных нейронах, полученных из ESC-клеток (ESC-MN), с 96 гексануклеотидными повторами (96X) или большим числом (295X и 545X) антисмысловая РНК продуцировалась из картированного сайта инициации (зонд I) и простирается через экспансию повторов (зонды 3'-rep, 5'-rep, E и A) и далее по меньшей мере на 1500 п. о. в 5'-фланкирующую последовательность гена мыши. В соответствии с картированным сайтом начала антисмысловые транскрипты с зондом G не детектировали. Некоторую антисмысловую транскрипцию детектировали в сайте инициации (зонд I) в 3X контрольных ESC-MN, но не наблюдали значительного накопления транскриптов, которые были удлинены в 3X повтор или далее. Следовательно, продуктивная транскрипция антисмысловой РНК, то есть накопление удлинённых транскриптов, требовала более длинных экспансий повторов. Накопление удлинённых антисмысловых РНК зависит от гуманизированного аллеля и более чем 3X экспансии повторов.

Картирование TSS антисмысловой РНК и экспансии удлинённых транскриптов служит в качестве руководства для прямого нацеливания на антисмысловую РНК с целью разрушения, например, посредством РНК-интерференции, направленной кРНК, или разрушения РНКазой H, направленного антисмысловым олигонуклеотидом. Поскольку TSS был картирован в пределах человеческой вставленной последовательности в гуманизированных аллелях мыши, весьма вероятно, что это подлинный сайт, используемый в клетках человека. Нацеливание на человеческие последовательности, которые простираются между зондом I в TSS и зондом A в экзоне 1А (т. е. нуклеотиды 5026-5607 из NG_031977 (SEQ ID NO: 15)) и между зондом I в TSS и зондом E в экзоне 1А (т. е. нуклеотиды 5130-5607 из NG_031977 (SEQ ID NO: 15)), будет с наибольшей вероятностью приводить к получению эффективных терапевтических агентов. Количественное зондирование Nanostring показало, что антисмысловые РНК экспансируются далеко в 5'-

фланкирующую последовательность гена *C9orf72* мыши. Поскольку вероятно, что подобное удлинение происходит и в клетках человека, продуктивным может быть нацеливание на гомологичные последовательности, ассоциированные с геном *C9orf72* человека.

Перечень последовательностей без соблюдения формальных требований

SEQ ID NO:1

>NM_001256054.2 Homo sapiens, субъединица комплекса C9orf72-SMCR8 (C9orf72), транскрипционный вариант 3, мРНК

ACGTAACCTACGGTGTCCCCTAGGAAAGAGAGGTGCGTCAAACAGCGACAAGTTC
CGCCCACGTAAAAG
ATGACGCTTGGTGTGTCAGCCGTCCTGCTGCCCGGTTGCTTCTCTTTTGGGGGCGG
GGTCTAGCAAGAG
CAGGTGTGGGTTTAGGAGATATCTCCGGAGCATTTGGATAATGTGACAGTTGGAATG
CAGTGATGTCGAC
TCTTTGCCACCGCCATCTCCAGCTGTTGCCAAGACAGAGATTGCTTTAAGTGGCAA
ATCACCTTTATTA
GCAGTACTTTTGCTTACTGGGACAATATTCTTGGTCCTAGAGTAAGGCACATTTGG
GCTCCAAAGACAG
AACAGGTA CTCTCAGTGATGGAGAAATAACTTTTCTTGCCAACCACACTCTAAATG
GAGAAATCCTTCG
AAATGCAGAGAGTGGTGCTATAGATGTAAAGTTTTTTGTCTTGTCTGAAAAGGGAGT
GATTATTGTTTCA
TTAATCTTTGATGGAAACTGGAATGGGGATCGCAGCACATATGGACTATCAATTATA
CTCCACAGACAG
AACTTAGTTTTCTACCTCCCCTCATAGAGTGTGTGTTGATAGATTAACACATATAAT
CCGGAAGGAAG
AATATGGATGCATAAGGAAAGACAAGAAAATGTCCAGAAGATTATCTTAGAAGGCA
CAGAGAGAATGGAA
GATCAGGGTCAGAGTATTATTCCAATGCTTACTGGAGAAGTGATTCTGTAATGGAA
CTGCTTTCATCTA
TGAAATCACACAGTGTTCCCTGAAGAAATAGATATAGCTGATACAGTACTCAATGAT
GATGATATTGGTGA
CAGCTGTCATGAAGGCTTTCTTCTCAATGCCATCAGCTCACACTTGCAAACCTGTGG
CTGTTCCGTTGTA
GTAGGTAGCAGTGCAGAGAAAGTAAATAAGATAGTCAGAACATTATGCCTTTTTCT
GACTCCAGCAGAGA
GAAAATGCTCCAGGTTATGTGAAGCAGAATCATCATTTAAATATGAGTCAGGGCTCT
TTGTACAAGGCCT
GCTAAAGGATTCAACTGGAAGCTTTGTGCTGCCTTTCCGGCAAGTCATGTATGCTCC
ATATCCCACCACA

CACATAGATGTGGATGTCAATACTGTGAAGCAGATGCCACCCTGTCATGAACATATT
TATAATCAGCGTA
GATACATGAGATCCGAGCTGACAGCCTTCTGGAGAGCCACTTCAGAAGAAGACATG
GCTCAGGATACGAT
CATCTACACTGACGAAAGCTTTACTCCTGATTTGAATATTTTTCAAGATGTCTTACAC
AGAGACACTCTA
GTGAAAGCCTTCCTGGATCAGGTCTTTCAGCTGAAACCTGGCTTATCTCTCAGAAGT
ACTTTCCTTGAC
AGTTTCTACTTGTCTTCACAGAAAAGCCTTGACACTAATAAAATATATAGAAGACG
ATACGCAGAAGGG
AAAAAAGCCCTTTAAATCTCTTCGGAACCTGAAGATAGACCTTGATTTAACAGCAGA
GGGCGATCTTAAC
ATAATAATGGCTCTGGCTGAGAAAATTAACCAGGCCTACACTCTTTTATCTTTGGA
AGACCTTTCTACA
CTAGTGTGCAAGAACGAGATGTTCTAATGACTTTTTAAATGTGTAACCTAATAAGCC
TATTCCATCACAA
TCATGATCGCTGGTAAAGTAGCTCAGTGGTGTGGGGAAACGTTCCCCTGGATCATA
TCCAGAATTCTGC
TCTCAGCAATTGCAGTTAAGTAAGTTACACTACAGTTCTCACAAGAGCCTGTGAGGG
GATGTCAGGTGCA
TCATTACATTGGGTGTCTCTTTTCCTAGATTTATGCTTTTGGGATACAGACCTATGTT
TACAATATAATA
AATATTATTGCTATCTTTTAAAGATATAATAATAGGATGTAACTTGACCACAATA
CTGTTTTTTTTGAA
ATACATGATTCATGGTTTACATGTGTCAAGGTGAAATCTGAGTTGGCTTTTACAGAT
AGTTGACTTTCTA
TCTTTTGGCATTCTTTGGTGTGTAGAATTACTGTAATACTTCTGCAATCAACTGAAAA
CTAGAGCCTTTA
AATGATTTCAATCCACAGAAAGAAAGTGAGCTTGAACATAGGATGAGCTTTAGAA
AGAAAATTGATCAA
GCAGATGTTTAATTGGAATTGATTATTAGATCCTACTTTGTGGATTTAGTCCCTGGGA
TTCAGTCTGTAG
AAATGTCTAATAGTTCTCTATAGTCCTTGTTCCCTGGTGAACCACAGTTAGGGTGTTTT
GTTATTTTATT
GTTCTTGCTATTGTTGATATTCTATGTAGTTGAGCTCTGTAAAAGGAAATTGTATTTT
ATGTTTTAGTAA
TTGTTGCCAACTTTTTAAATTAATTTTCATTATTTTTGAGCCAAATTGAAATGTGCAC
CTCCTGTGCCTT
TTTTCTCCTTAGAAAATCTAATTAATTAATTTTACTTGGAAACAAGTTCAGATTTCACTGGTCAGTCAT
TTTCATCTTGTT

TTCTTCTTGCTAAGTCTTACCATGTACCTGCTTTGGCAATCATTGCAACTCTGAGATT
 ATAAAATGCCTT
 AGAGAATATACTAACTAATAAGATCTTTTTTTCAGAAACAGAAAATAGTTCCTTGAG
 TACTTCCTTCTTG
 CATTCTGCCTATGTTTTTGAAGTTGTTGCTGTTTGCCTGCAATAGGCTATAAGGAAT
 AGCAGGAGAAAT
 TTTACTGAAGTGCTGTTTTTCCTAGGTGCTACTTTGGCAGAGCTAAGTTATCTTTTGT
 TTCTTAATGCGT
 TTGGACCATTTTGTCTGGCTATAAAAATAACTGATTAATATAATTCTAACACAATGTTG
 ACATTGTAGTTAC
 ACAAACACAAATAAATATTTTTATTTAAAATTCTGGAAGTAATATAAAAAGGGAAAAT
 ATATTTATAAGAAA
 GGGATAAAGGTAATAGAGCCCTTCTGCCCCCCACCCACCAAATTTACACAACAAAA
 TGACATGTTTGAAT
 GTGAAAGGTCATAATAGCTTTCCCATCATGAATCAGAAAGATGTGGACAGCTTGAT
 GTTTTAGACAACCA
 CTGAACTAGATGACTGTTGTACTGTAGCTCAGTCATTTAAAAAATATATAAATACTA
 CCTTGTAGTGTCC
 CATACTGTGTTTTTACATGGTAGATTCTTATTTAAGTGCTAACTGGTTATTTTCTTTG
 GCTGGTTTTATT
 GTACTGTTATACAGAATGTAAGTTGTACAGTGAAATAAGTTATTAAGCATGTGTAA
 ACATTGTTATATA
 TCTTTTCTCCTAAATGGAGAATTTTGAATAAAAATATATTTGAAATTTTAAAAA
 AAAAAAAA

SEQ ID NO:2

>XM_005581570.2 предсказанный: *Mascaca fascicularis* открытая рамка считывания
 хромосомы 15, huma C9orf72 (C15H9orf72), транскрипционный вариант X2, мРНК
 ACGTAACCTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGGCGCGTCAAACAGCGACAAGTTC
 CGCCCACGTAAAAG
 ATGACGCTTGGTGCCTCAGCCGTCCTGCTGCCCGGTTCTTCTCTCTGGGGGCGGG
 GCCTGGCTAGAGC
 AGGTGTGGGTTTAGGAGATATCTCAGGAGCATTTGGATAATGTGACAGTTGGAATG
 CAGTGATGTCGACT
 CTTTGCCACCGCCATCTCCAGCTGTTGCCAAGACAGAGATTGCTTTAAGTGGTGAA
 TCACCTTTATTAG
 CAGCTACTTTTGCTTACTGGGACAATATTCTTGGTCCTAGAGTAAGGCACATTTGGG
 CTCCAAAGACAGA
 ACAGGTACTTCTCAGTGACGGAGAAATAACTTTTCTTGCCAACCACACTCTAAATGG
 AGAAATCCTTCGA

AATGCAGAGAGTGGTGCTATAGATGTAAAGTTTTTTGTCTTGTCTGAAAAGGGAGTG
ATTATTGTTTCAT
TAATCTTTGATGGAAACTGGAATGGGGATCGCAGCACATACGGACTATCAATTATAC
TTCCACAGACAGA
ACTTAGTTTCTACCTCCACTTCATAGAGTGTGTGTTGATAGATTAACACATATAATC
CGGAAAGGAAGA
ATATGGATGCATAAGGAAAGACAAGAAAATGTCCAGAAGATTATCTTAGAAGGCAC
AGAGAGAATGGAAG
ATCAGGGTCAGAGTATTATTCCAATGCTTACTGGAGAAGTGATTCCCTGTAATGGAAC
TGCTTTCATCTAT
GAAATCACACAGTGTTCCTGAAGAAATAGATATAGCTGATACAGTACTCAATGATG
ATGATATTGGTGAC
AGTTGTCATGAAGGCTTTCTTCTCAATGCCATCAGCTCACACTTGCAAACCTGTGGC
TGTTCCGTTGTAG
TAGGTAGCAGTGCAGAGAAAGTAAATAAGATAGTCAGAACATTATGCCTTTTTCTG
ACTGCAGCAGAGAG
AAAATGCTCCAGGTTATGTGAAGCAGAATCATCATTTAAATATGAGTCAGGGCTCTT
TGTACAGGGCCTG
CTAAAGGATTCAACTGGAAGCTTTGTGCTGCCTTTCCGGCAAGTCATGTATGCTCCA
TATCCCACCACAC
ACATAGATGTGGATGTCAATACTGTGAAGCAGATGCCACCCTGTCATGAACATATTT
ATAATCAGCGTAG
ATACATGAGATCCGAGCTGACAGCCTTCTGGAGAGCCACTTCAGAAGAAGACATGG
CTCAGGATACGATC
ATCTACACTGACGAAAGCTTTACTCCTGATTTGAATATTTTTCAAGATGTCTTACACA
GAGACACTCTAG
TGAAAGCCTTCTGGATCAGGTCTTTCAGCTGAAACCTGGCTTATCTCTCAGGAGTA
CTTTCCTTGCACA
GTTTTTACTTGTCTTTCACAGAAAAGCCTTGACACTAATAAAAATATATAGAAGATGA
TACGCAGAAGGGA
AAAAAGCCCTTTAAATCTCTTCGGAACCTGAAGATAGACCTTGATTTAACAGCAGAG
GGCGATCTTAACA
TAATAATGGCTCTGGCTGAGAAAATTAACCAGGCCTACACTCTTTTATCTTTGGAA
GACCTTTCTACAC
TAGTGTACAAGAACGAGATGTTCTAATGACTTTTTAAATGTGTAACCTAATAAGCCT
ATTCCATCACAAT
CGTGATCGCTGCTAAAGTAGCTCGGTGGTGTGGGGAAACATTCCCCTGGATCATACT
CCAGAGCTCTGCT
CGGCAGTTGCAGTTAAGTTAGTTACACTACAGTTCTCACAAGAGTCTGTGAGGGGAT
GTCAGGTGCATCA

TTACATTGGATGTCTCTTTTCCTAGATTTATGCTTTTGGGATACAGACCTATGTTTAC
AATATAATAGGT
ATTATTGCTGTCTTTTAAATATATAATAATAGGATATAAACTTGACCACAACCTGCTG
TTTTTTTGAAATA
TATGATTCATGGTTTACATGTATTAAGGTGAAATCCGAGTTCGCTTTTACAGATATTA
GTTGACTTTCTA
TCTTTTGGCATTCTTTGGTGTGTGGAATTACTGTAATACTTCTGCAATCAACTGAAAA
TTAGAGCCTTTA
AATGATTTTCAGTTCCACAGAAAGAAAGTGAGCTTCAACATAGGATAAGCTTTAGAA
AGAGAATTGATCAA
GCAGATGTTTAATTGGAATTGATTATTAGATCCTGCTTTGTGGATTTAGCCCTCGGG
ATTCAGTCTGTAG
AAATGTCTGATAGTTCTCTATAGTCCCTGCTCATGGTGAACCACAGTTAGGATGTTTT
GTTTGTTTTATT
GTTGTTGCTATTGTTGATGTTCTATATAGTTGAGCTCTGTAAAAGGAAATTGTATTTT
ATGTTTTAGTAG
TTGTTGCCAACTTTTTAAATTAATTTTCATTATTTTTTGAGCCAAATTGAAATGTGCAC
CTCCTGTGCCTT
TTTTTTCCTTGAAAATCGAATTACTTGGAAGAAGTTCAGATTTCACTGGTCAGTCGT
TTTCATCTTGTT
TTCTTCTTGACAGAGTCTTACCATGTACCTGCTTTGGCAATCATTGTAACCTCTGAGATT
ATAAAATGCATT
AGAGAATATATTAACATAAAGATCTTTTTTTTTCAGGAACAGAAAATAGTTCCTTGA
GTAATTCCTTCTT
ACATTTCTGCCATGTTTTTGAAGTTGTTGCCATTTGCCTGCAATAGGCTATAAGGAA
TAGCAGGAGAAA
TTTTACTGAAGTGCTATTTTTCTAGGTGCTACTTTGGCAGAGCTAAGTGGTCTGTTTC
TTTTGTTTCCTT
AATGCGTTTGGACCATTTTGGCTGTAAAATAACTGATTAATATAATTCTAACAC
AATATTGACATTG
TAGTGTACACAAACACAAATATTTTATTTAAAACCTGGAAGTAACATAAAAGGGAAA
ATATATTTATAAGA
AAGGAATAAAGGTAATAGAGCTCTTCTGTCCCCAGCCACCAAATTTACACAACAA
AATGATATGTTCTA
ATGTGAAAGGTCATAATAGCTTTCCCATCATTAATCAGAAAGATGTGGCAGCTTGAT
TTTTCAGACAACC
CCTGAACTAGATGACTGTTGTACTGTAGCTCAGTCATTTAAAAAATATATAAATACT
ATCTCGTAGTGTC
CCATACTATGTTTTTTACATGATAGATTCTTATTTAAGTGCTACCTGGTTATTTTCTTT
GGCTGGTTTAT

TGTA CTGT TATATAGA ATGTAAGTTGTACAGTGAAATAAGTTATTAAGCATGTGTA
AACATTGTTATAT

ATCTTTTCTCCTAGATGGAGAATTTTGAATAAAATATATTTGAAATTTT

SEQ ID NO:3

>NM_001081343.2 Mus musculus C9orf72, член комплекса C9orf72-SMCR8
(C9orf72), транскрипционный вариант 1, мРНК

GCGGTTGCGGTCCCTGCGCCGGCGGTGAAGGCGCAGCAGCGGCGAGTGGCTATTGC
AAGCGTTCGGATAA

TGTGAGACCTGGAATGCAGTGAGACCTGGGATGCAGGGATGTCGACTATCTGCCCC
CCACCATCTCCTGC

TGTTGCCAAGACAGAGATTGCTTTAAGTGGTGAATCACCTTGTTGGCGGCTACCTT
TGCTTACTGGGAT

AATATTCTTGGTCCCTAGAGTAAGGCATATTTGGGCTCCAAAGACAGACCAAGTGCTT
CTCAGTGATGGAG

AAATAACTTTTCTTGCCAACCACACTCTAAATGGAGAAATTCTTCGAAATGCAGAGA
GTGGGGCTATAGA

TGTAAAATTTTTTGTCTTATCTGAAAAAGGGGTAATTATTGTTTCATTAATCTTCGAC
GGAAACTGGAAT

GGAGATCGGAGCACTTATGGACTATCAATTATACTGCCGCAGACAGAGCTGAGCTT
CTACCTCCCACTTC

ACAGAGTGTGTGTTGACAGGCTAACACACATTATTCGAAAAGGAAGAATATGGATG
CATAAGGAAAGACA

AGAAAATGTCCAGAAAATTGTCTTGGAAGGCACAGAGAGGATGGAAGATCAGGGTC
AGAGTATCATTCCC

ATGCTTACTGGGGAAGTCATTCCTGTAATGGAGCTGCTTGCATCTATGAAATCCCAC
AGTGTTCTGAAG

ACATTGATATAGCTGATACAGTGCTCAATGATGATGACATTGGTGACAGCTGTCACG
AAGGCTTTCTTCT

CAATGCCATCAGCTCACACCTGCAGACCTGTGGCTGTTCCGTTGTAGTTGGCAGCAG
TGCAGAGAAAGTA

AATAAGATAGTAAGAACGCTGTGCCTTTTTCTGACACCAGCAGAGAGGAAATGCTC
CAGGCTGTGTGAAG

CAGAATCGTCCTTTAAGTACGAATCGGGACTCTTTGTGCAAGGCTTGCTAAAGGATG
CAACAGGCAGTTT

TGTCCTACCCTCCGGCAAGTTATGTATGCCCCGTACCCACCACGCACATTGATGT
GGATGTCAACACT

GTCAAGCAGATGCCACCGTGTGCATGAACATATTTATAATCAACGCAGATACATGAG
GTCAGAGCTGACAG

CCTTCTGGAGGGCAACTTCAGAAGAGGACATGGCGCAGGACACCATCATCTACACA
GATGAGAGCTTCAC

TCCTGATTTGAATATTTTCCAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTAGTGAAAGCCTT
CCTGGATCAGGTC
TTCCATTTGAAGCCTGGCCTGTCTCTCAGGAGTACTTTTCTTGCACAGTTCCTCCTCA
TTCTTCACAGAA
AAGCCTTGACACTAATCAAGTACATCGAGGATGATACGCAGAAGGGGAAAAAGCCC
TTTAAGTCTCTTCG
GAACCTGAAGATAGATCTTGATTTAACAGCAGAGGGCGATCTTAACATAATAATGG
CTCTAGCTGAGAAA
ATTAAGCCAGGCCTACACTCTTTCATCTTTGGGAGACCTTTCTACACTAGTGTACAA
GAACGTGATGTTC
TAATGACCTTTTGACCGTGTGGTTTGCTGTGTCTGTCTCTTTCACAGTCCACACCTGCTG
TTACAGTGTCTC
AGCAGTGTGTGGGCACATCCTTCCCTCCCGAGTCCTGCTGCAGGACAGGGTACACTAC
ACTTGTCAGTAGA
AGTCTGTACCTGATGTCAGGTGCATCGTTACAGTGAATGACTCTTCCCTAGAATAGAT
GACTCTTTTAGG
GCCTTATGTTTACAATTATCCTAAGTACTATTGCTGTCTTTTAAAGATATGAATGATG
GAATATACACTT
GACCATAACTGCTGATTGGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTTGAAACTTATGA
TTCCTGGTTTA
CATGTACCACACTGAAACCCTCGTTAGCTTTACAGATAAAGTGTGAGTTGACTTCCT
GCCCCTCTGTGTT
CTGTGGTATGTCCGATTACTTCTGCCACAGCTAAACATTAGAGCATTAAAGTTTGC
AGTTCCTCAGAAA
GGAACCTAGTCTGACTACAGATTAGTTCTTGAGAGAAGACACTGATAGGGCAGAGC
TGTAGGTGAAATCA
GTTGTTAGCCCTTCCCTTATAGACGTAGTCCTTCAGATTCGGTCTGTACAGAAATGCC
GAGGGGTCATGC
ATGGGCCCTGAGTATCGTGACCTGTGACAAGTTTTTTGTTGGTTTATTGTAGTTCTGT
CAAAGAAAGTGG
CATTTGTTTTTATAATTGTTGCCAACTTTTAAGGTTAATTTTCATTATTTTTGAGCCGA
ATTAAAATGCG
CACCTCCTGTGCCTTTCCCAATCTTGGAATAATAATTTCTTGGCAGAGGGTCAGAT
TTCAGGGCCCAGT
CACTTTCATCTGACCACCCTTTGCACGGCTGCCGTGTGCCTGGCTTAGATTAGAAGT
CCTTGTTAAGTAT
GTCAGAGTACATTCGCTGATAAGATCTTTGAAGAGCAGGGAAGCGTCTTGCCTCTTT
CCTTTGGTTTCTG
CCTGTACTCTGGTGTTCCTCGTGTACCTGCATCATAGGAACAGCAGAGAAATCTGA
CCCAGTGCTATTT

TTCTAGGTGCTACTATGGCAAACCTCAAGTGGTCTGTTTCTGTTCCCTGTAACGTTTCGAC
 TATCTCGCTAGC
 TGTGAAGTACTGATTAGTGGAGTTCTGTGCAACAGCAGTGTAGGAGTATACACAAA
 CACAAATATGTGTT
 TCTATTTAAAACCTGTGGACTTAGCATAAAAAGGGAGAATATATTTATTTTTTACAAA
 AGGGATAAAAATG
 GGCCCCGTTCCCTACCCACCAGATTTAGCGAGAAAAAGCTTTCTATTCTGAAAGGTC
 ACGGTGGCTTTGG
 CATTACAAATCAGAACAACACACTGACCATGATGGCTTGTGAACTAACTGCAAG
 GCACTCCGTCATGG
 TAAGCGAGTAGGTCCCACCTCCTAGTGTGCCGCTCATTGCTTTACACAGTAGAATCT
 TATTTGAGTGCTA
 ATTGTTGTCTTTGCTGCTTTACTGTGTTGTTATAGAAAATGTAAGCTGTACAGTGAAT
 AAGTTATTGAAG
 CATGTGTAACACTGTTATATATCTTTTCTCCTAGATGGGGAATTTTGAATAAAAATA
 CCTTTGAAATTCT
 G

SEQ ID NO:4

>NM_001007702.1 *Rattus norvegicus* подобный кДНК RIKEN 3110043O21
 (RGD1359108), мPHK
 CGTTTGTAGTGTGTCAGCCATCCCAATTGCCTGTTCCCTTCTCTGTGGGAGTGGTGTCTAG
 ACAGTCCAGGCA
 GGGTATGCTAGGCAGGTGCGTTTTGGTTGCCTCAGATCGCAACTTGACTCCATAACG
 GTGACCAAAGACA
 AAAGAAGGAAACCAGATTAAAAAGAACCGGACACAGACCCCTGCAGAATCTGGAG
 CGGCCGTGGTTGGGG
 GCGGGGCTACGACGGGGCGGACTCGGGGGCGTGGGAGGGCGGGGCCGGGGCGGGG
 CCCGGAGCCGGCTGC
 GGTTGCGGTCCCTGCGCCGGCGGTGAAGGCGCAGCGGCGGCGAGTGGCTATTGCAA
 GCGTTTGGATAATG
 TGAGACCTGGGATGCAGGGATGTCGACTATCTGCCCCCACCATCTCCTGCTGTTGC
 CAAGACAGAGATT
 GCTTTAAGTGGTGAATCACCTTGTTGGCGGCTACCTTTGCTTACTGGGATAATATTC
 TTGGTCCTAGAG
 TAAGGCACATTTGGGCTCCAAAGACAGACCAAGTACTCCTCAGTGTGAGAAATC
 ACTTTTCTTGCCAA
 CCACACTCTGAATGGAGAAATTCTTCGGAATGCGGAGAGTGGGGCAATAGATGTAA
 AGTTTTTTGTCTTA
 TCTGAAAAGGGCGTCATTATTGTTTCATTAATCTTCGACGGGAACTGGAACGGAGAT
 CGGAGCACTTACG

GACTATCAATTATACTGCCGCAGACGGAGCTGAGTTTCTACCTCCCCTGCACAGAG
TGTGTGTTGACAG
GCTAACGCACATCATTCGAAAAGGAAGGATATGGATGCACAAGGAAAGACAAGAA
AATGTCCAGAAAATT
GTCTTGGAAGGCACCGAGAGGATGGAAGATCAGGGTCAGAGTATCATCCCTATGCT
TACTGGGGAGGTCA
TCCCTGTGATGGAGCTGCTTGCGTCTATGAGATCACACAGTGTTCCTGAAGACCTCG
ATATAGCTGATAC
AGTACTCAATGATGATGACATTGGTGACAGCTGTCATGAAGGCTTTCTTCTCAATGC
CATCAGCTCACAT
CTGCAGACCTGCGGCTGTTCTGTGGTGGTAGGCAGCAGTGCAGAGAAAGTAAATAA
GATAGTAAGAACAC
TGTGCCTTTTTCTGACACCAGCAGAGAGGAAGTGCTCCAGGCTGTGTGAAGCCGAAT
CGTCCTTTAAATA
CGAATCTGGACTCTTTGTACAAGGCTTGCTAAAGGATGCGACTGGCAGTTTTGTACT
ACCTTTCCGGCAA
GTTATGTATGCCCTTATCCCACCACACACATCGATGTGGATGTCAACACTGTCAAG
CAGATGCCACCGT
GTCATGAACATATTTATAATCAACGCAGATACATGAGGTCAGAGCTGACAGCCTTCT
GGAGGGCAACTTC
AGAAGAGGACATGGCTCAGGACACCATCATCTACACAGATGAGAGCTTCACTCCTG
ATTTGAATATTTTC
CAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTAGTGAAAGCCTTTCTGGATCAGGTCTTCCAT
TTGAAGCCTGGCC
TGTCTCTCAGGAGTACTTTCCTTGCACAGTTCCTCCTCATTCTTCACAGAAAAGCCTT
GACACTAATCAA
GTACATAGAGGATGACACGCAGAAGGGGAAAAAGCCCTTTAAGTCTCTTCGGAACC
TGAAGATAGATCTT
GATTTAACAGCAGAGGGCGACCTTAACATAATAATGGCTCTAGCTGAGAAAATTAA
GCCAGGCCTACACT
CTTTCATCTTCGGGAGACCTTTCTACACTAGTGTCCAAGAACGTGATGTTCTAATGA
CTTTTTAAACATG
TGGTTTGCTCCGTGTGTCTCATGACAGTCACACTTGCTGTTACAGTGTCTCAGCGCTT
TGGACACATCCT
TCCTCCAGGGTCCCGCAGGACACGTTACACTACACTTGTCAGTAGAGGTCTGTA
CCAGATGTCAGGT
ACATCGTTGTAGTGAATGTCTCTTTTCCTAGACTAGATGTACCCTCGTAGGGACTTAT
GTTTACAACCCT
CCTAAGTACTAGTGCTGTCTTGTAAGGATACGAATGAAGGGATGTAAACTTCACCAC
AACTGCTGGTTGG

TTTTGTTGTTTTTGTTTTTTTGAAACTTATAATTCATGGTTTACATGCATCACACTGAA
ACCCTAGTTAGC
TTTTTACAGGTAAGCTGTGAGTTGACTGCCTGTCCCTGTGTTCTCTGGCCTGTACGAT
CTGTGGCGTGTA
GGATCACTTTTGCAACAATAAAACTAAAGCACTTTGTTTGCAGTTCTACAGAAAG
CAACTTAGTCTGT
CTGCAGATTCGTTTTTTGAAAGAAGACATGAGAAAGCGGAGTTTTAGGTGAAGTCAG
TTGTTGGATCTTCC
TTTATAGACTTAGTCCTTTAGATGTGGTCTGTATAGACATGCCCAACCATCATGCAT
GGGCACTGAATAT
CGTGAACCTGTGGTATGCTTTTTGTTGGTTTATTGTACTTCTGTCAAAGAAAGTGGCAT
TGGTTTTTATAA
TTGTTGCCAAGTTTTAAGGTTAATTTTCATTATTTTTGAGCCAAATTAATAATGTGCAC
CTCCTGTGCCTT
TCCAATCTTGGAATAATAATTTCTTGGCAGAAGGTCAGATTCAGGGCCCAGTCA
CTTTCGTCTGACT
TCCCTTTGCACAGTCCGCCATGGGCCTGGCTTAGAAGTTCTTGTAACACTATGCCAGA
GAGTACATTCGCT
GATAAAATCTTCTTTGCAGAGCAGGAGAGCTTCTTGCCTCTTTCCTTTCATTTCTGCC
TGGACTTTGGTG
TTCTCCACGTTCCCTGCATCCTAAGGACAGCAGGAGAACTCTGACCCCAGTGCTATT
TCTCTAGGTGCTA
TTGTGGCAAACCTCAAGCGGTCCGTCTCTGTCCCTGTAACGTTTCGTACCTTGCTGGCTG
TGAAGTACTGAC
TGGTAAAGCTCCGTGCTACAGCAGTGTAGGGTATACACAAACACAAGTAAGTGTTTT
ATTTAAACTGTG
GACTTAGCATAAAAAGGGAGACTATATTTATTTTTTACAAAAGGGATAAAAATGGA
ACCCTTTCCTCACC
CACCAGATTTAGTCAGAAAAAACATTCTATTCTGAAAGGTCACAGTGGTTTTGACA
TGACACATCAGAA
CAACGCACACTGTCCATGATGGCTTATGAACTCCAAGTCACTCCATCATGGTAAATG
GGTAGATCCCTCC
TTCTAGTGTGCCACACCATTGCTTCCCACAGTAGAATCTTATTTAAGTGCTAAGTGTT
GTCTCTGCTGGT
TTACTCTGTTGTTTTAGAGAATGTAAGTTGTATAGTGAATAAGTTATTGAAGCATGT
GTAAACACTGTTA
TACATCTTTTCTCCTAGATGGGGAATTTGGAATAAAATACCTTTAAAATTCAAAAAA
AAAAAAAAAAAAA
AAAAA

SEQ ID NO:5

>обратнокомплементарная последовательность SEQ ID NO:1

TTTTTTTTTTTTTTTTTAAATTTCAAATATATTTTATTCAAAATTCTCCATTTAGGA
GAAAAGATATATAACAATGTTTACACATGCTTTAATAACTTATTTCACTGTACAAC
TACATTCTGTATAACAGTACAATAAACCCAGCCAAAGAAAATAACCAGTTAGCACTT
AAATAAGAATCTACCATGTAAAAAACACAGTATGGGACACTACAAGGTAGTATTTA
TATATTTTTTAAATGACTGAGCTACAGTACAACAGTCATCTAGTTCAGTGGTTGTCTA
AAACATCAAGCTGTCCACATCTTTCTGATTCATGATGGGAAAGCTATTATGACCTTT
CACATTCGAACATGTCATTTTGTGTGTAAATTTGGTGGGTGGGGGGCAGAAGGGCT
CTATTACCTTTATCCCTTTCTTATAAATATATTTTCCCTTTTATATTACTTCCAGAATT
TTAAATAAAATATTTATTTGTGTTTGTGTAACACTACAATGTCAACATTGTGTTAGAATT
ATATTAATCAGTTATTTTATAGCCAGCAAAATGGTCCAAACGCATTAAGAAAACAA
AAGATAACTTAGCTCTGCCAAAGTAGCACCTAGGAAAACAGCACTTCAGTAAAATT
TCTCCTGCTATTCCTTATAGCCTATTGCAGGCCAAACAGCAACAACCTCAAAAACATA
GGCAGAAATGCAAGAAGGAAGTACTCAAGGAACTATTTTCTGTTTCTGAAAAAAG
ATCTTATTAGTTAGTATATTCTCTAAGGCATTTTATAATCTCAGAGTTGCAATGATTG
CCAAAGCAGGTACATGGTAAGACTTAGCAAGAAGAAAACAAGATGAAAATGACTG
ACCAGTGAAATCTGAACTTGTTC AAGTAATTAGATTTTCTAAGGAGAAAAAAGGC
ACAGGAGGTGCACATTTCAATTTGGCTCAAAAATAATGAAAATTAATTTAAAAAGTT
GGCAACAATTAATAAACATAAAATAACAATTTCCCTTTTACAGAGCTCAACTACATAG
AATATCAACAATAGCAAGAACAATAAAATAAACAACACCCTAACTGTGGTTCAC
CAGGAACAAGGACTATAGAGAACTATTAGACATTTCTACAGACTGAATCCCAGGGA
CTAAATCCACAAAGTAGGATCTAATAATCAATTCCAATTAACATCTGCTTGATCAA
TTTTCTTTCTAAAGCTCATCCTATGTTCAAGCTCACTTTCTTTCTGTGGAATTGAAAT
CATTTAAAGGCTCTAGTTTTCAGTTGATTGCAGAAGTATTACAGTAATTCTACACAC
CAAAGAATGCCAAAAGATAGAAAGTCAACTATCTGTAAAAGCCAACTCAGATTTCA
CCTTGACACATGTAAACCATGAATCATGTATTTCAAAAAACAGTAGTTGTGGTCAA
GTTTACATCCTATTATTATATCTTTAAAAGATAGCAATAATATTTATTATATTGTAAA
CATAGGTCTGTATCCCAAAGCATAAATCTAGGAAAAGAGACACCCAATGTAATGA
TGCACCTGACATCCCTCACAGGCTCTTGTGAGAACTGTAGTGTAACCTACTTAACT
GCAATTGCTGAGAGCAGAATTCTGGAGTATGATCCAGGGGAACGTTTCCCCACACC
ACTGAGCTACTTTACCAGCGATCATGATTGTGATGGAATAGGCTTATTAAGTTACAC
ATTTAAAAAGTCATTAGAACATCTCGTTCTTGCACACTAGTGTAGAAAGGTCTTCCA
AAGATAAAAGAGTGTAGGCCTGGTTTAATTTTCTCAGCCAGAGCCATTATTATGTTA
AGATCGCCCTCTGCTGTAAATCAAGGTCTATCTTCAGGTTCCGAAGAGATTTAAAG
GGCTTTTTTCCCTTCTGCGTATCGTCTTCTATATATTTTATTAGTGTCAAGGCTTTTCT
GTGAAGGACAAGTAGAACTGTGCAAGGAAAGTACTTCTGAGAGATAAGCCAGGTT
TCAGCTGAAAGACCTGATCCAGGAAGGCTTTCACTAGAGTGTCTCTGTGTAAGACAT
CTTGAAAAATATTCAAATCAGGAGTAAAGCTTTTCGTCAGTGTAGATGATCGTATCCT
GAGCCATGTCTTCTTCTGAAGTGGCTCTCCAGAAGGCTGTCAGCTCGGATCTCATGT
ATCTACGCTGATTATAAATATGTTTCATGACAGGGTGGCATCTGCTTCACAGTATTGA

CATCCACATCTATGTGTGTGGTGGGATATGGAGCATAACATGACTTGCCGGAAAGGC
 AGCACAAAGCTTCCAGTTGAATCCTTTAGCAGGCCTTGTACAAAGAGCCCTGACTCA
 TATTTAAATGATGATTCTGCTTACATAACCTGGAGCATTCTCTCTGCTGGAGTCA
 GAAAAAGGCATAATGTTCTGACTATCTTATTTACTTTCTCTGCACTGCTACCTACTAC
 AACGGAACAGCCACAGGTTTGAAGTGTGAGCTGATGGCATTGAGAAGAAAGCCTT
 CATGACAGCTGTCACCAATATCATCATCATTGAGTACTGTATCAGCTATATCTATTTT
 TTCAGGAACACTGTGTGATTTTCATAGATGAAAGCAGTTCCATTACAGGAATCACTTC
 TCCAGTAAGCATTGGAATAATACTCTGACCCTGATCTTCCATTCTCTCTGTGCCTTCT
 AAGATAATCTTCTGGACATTTTCTTGTCTTTCCCTTATGCATCCATATTCTTCCCTTCCG
 GATTATATGTGTTAATCTATCAACACACACTCTATGAAGTGGGAGGTAGAAACTAAG
 TTCTGTCTGTGGAAGTATAATTGATAGTCCATATGTGCTGCGATCCCCATTCCAGTTT
 CCATCAAAGATTAATGAAACAATAATCACTCCCTTTTCAGACAAGACAAAAAATTT
 ACATCTATAGCACCCTCTCTGCATTTTGAAGGATTTCTCCATTTAGAGTGTGGTTGG
 CAAGAAAAGTTATTTCTCCATCACTGAGAAGTACCTGTTCTGTCTTTGGAGCCCAA
 TGTGCCTTACTCTAGGACCAAGAATATTGTCCCAGTAAGCAAAGTAGCTGCTAATA
 AAGGTGATTTGCCACTTAAAGCAATCTCTGTCTTGGCAACAGCTGGAGATGGCGGTG
 GGCAAAGAGTCGACATCACTGCATTCCAAGTGCACATTATCCAAATGCTCCGGAGA
 TATCTCCTAAACCCACACCTGCTCTTGCTAGACCCCGCCCCAAAAGAGAAGCAACC
 GGCAGCAGGGACGGCTGACACACCAAGCGTCATCTTTTACGTGGGCGGAACTTGT
 CGCTGTTTGACGCACCTCTCTTTCCCTAGCGGGACACCGTAGGTTACGT

SEQ ID NO:6

>обратнокомплементарная последовательность SEQ ID NO:2

AAAATTTCAAATATATTTTATTCAAATTTCTCCATCTAGGAGAAAAGATATATAACA
 ATGTTTACACATGCTTTAATAACTTATTTCACTGTACAACCTTACATTCTATATAACAG
 TACAATAAACAGCCAAAGAAAATAACCAGGTAGCACTTAAATAAGAATCTATCAT
 GTAAAAACATAGTATGGGACACTACGAGATAGTATTTATATATTTTTTAAATGACT
 GAGCTACAGTACAACAGTCATCTAGTTCAGGGGTTGTCTGAAAAATCAAGCTGCCA
 CATCTTTCTGATTAATGATGGGAAAGCTATTATGACCTTTCACATTAGAACATATCA
 TTTTGTGTGTAAATTTGGTGGCTGGGGGACAGAAGAGCTCTATTACCTTTATTCCTT
 TCTTATAAATATATTTTCCCTTTTATGTTACTTCCAGTTTTAAATAAAATATTTGTGTT
 TGTGTACACTACAATGTCAATATTGTGTTAGAATTATATTAATCAGTTATTTTACAGC
 CAGCAAATGGTCCAACGCATTAAGGAAACAAAAGAAACAGACCACTTAGCTCTG
 CCAAAGTAGCACCTAGAAAAATAGCACTTCAGTAAAATTTCTCCTGCTATTCCCTTAT
 AGCCTATTGCAGGCAAATGGCAACAACCTTCAAAAACATGGGCAGAAATGTAAGAAG
 GAAGTACTCAAGGAACTATTTTCTGTTCCCTGAAAAAAAAGATCTTATTAGTTAATAT
 ATTCTCTAATGCATTTTATAATCTCAGAGTTACAATGATTGCCAAAGCAGGTACATG
 GTAAGACTCTGCAAGAAGAAAACAAGATGAAAACGACTGACCAGTGAAATCTGAA
 CTTCTTCCAAGTAATTCGATTTTCCAAGGAAAAAAAAGGCACAGGAGGTGCACATTT
 CAATTTGGCTCAAAAATAATGAAAATTAATTTAAAAAGTTGGCAACAACCTACTAAA
 ACATAAAATACAATTTCCCTTTTACAGAGCTCAACTATATAGAACATCAACAATAGCA

ACAACAATAAAACAAACAAAACATCCTAACTGTGGTTCACCATGAGCAGGGACTAT
AGAGAACTATCAGACATTTCTACAGACTGAATCCCGAGGGCTAAATCCACAAAGCA
GGATCTAATAATCAATTCCAATTAACATCTGCTTGATCAATTCTCTTTCTAAAGCTT
ATCCTATGTTGAAGCTCACTTTCTTTCTGTGGAAGTCAAATCATTAAAGGCTCTAAT
TTTCAGTTGATTGCAGAAGTATTACAGTAATCCACACACCAAAGAATGCCAAAAG
ATAGAAAGTCAACTAATATCTGTAAAAGCGAACTCGGATTCACCTTAATACATGTA
AACCATGAATCATATATTTCAAAAAACAGCAGTTGTGGTCAAGTTTATATCCTATT
ATTATATATTTAAAAGACAGCAATAATACCTATTATATTGTAAACATAGGTCTGTAT
CCCAAAGCATAAATCTAGGAAAAGAGACATCCAATGTAATGATGCACCTGACATC
CCCTCACAGACTCTTGTGAGAACTGTAGTGTAAGTAACTTAACTGCAACTGCCGAGC
AGAGCTCTGGAGTATGATCCAGGGGAATGTTTCCCCACACCACCGAGCTACTTTAGC
AGCGATCACGATTGTGATGGAATAGGCTTATTAAGTTACACATTTAAAAAGTCATTA
GAACATCTCGTTCTTGTACACTAGTGTAGAAAGGTCTTCAAAGATAAAAGAGTGTA
GGCCTGGTTTAATTTTCTCAGCCAGAGCCATTATTATGTTAAGATCGCCCTCTGCTGT
TAAATCAAGGTCTATCTTCAGGTTCCGAAGAGATTTAAAGGGCTTTTTTCCCTTCTGC
GTATCATCTTCTATATATTTTATTAGTGTCAAGGCTTTTCTGTGAAGGACAAGTAAAA
ACTGTGCAAGGAAAGTACTCCTGAGAGATAAGCCAGGTTTCAGCTGAAAGACCTGA
TCCAGGAAGGCTTTCACTAGAGTGTCTCTGTGTAAGACATCTTGAAAAATATTCAA
TCAGGAGTAAAGCTTTCGTCAGTGTAGATGATCGTATCCTGAGCCATGTCTTCTTCT
GAAGTGGCTCTCCAGAAGGCTGTCAGCTCGGATCTCATGTATCTACGCTGATTATAA
ATATGTTTCATGACAGGGTGGCATCTGCTTACAGTATTGACATCCACATCTATGTGT
GTGGTGGGATATGGAGCATAACATGACTTGCCGGAAAGGCAGCACAAAGCTTCCAGT
TGAATCCTTTAGCAGGCCCTGTACAAAGAGCCCTGACTCATATTTAAATGATGATTC
TGCTTACATAACCTGGAGCATTCTCTCTGCTGCAGTCAGAAAAAGGCATAATGT
TCTGACTATCTTATTTACTTTCTCTGCACTGCTACCTACTACAACGGAACAGCCACAG
GTTTGCAAGTGTGAGCTGATGGCATTGAGAAGAAAGCCTTCATGACAACTGTCACC
AATATCATCATCATTGAGTACTGTATCAGCTATATCTATTTCTTCAGGAACACTGTGT
GATTTCATAGATGAAAGCAGTTCCATTACAGGAATCACTTCTCCAGTAAGCATTGGA
ATAATACTCTGACCCTGATCTTCCATTCTCTCTGTGCCTTCTAAGATAATCTTCTGGA
CATTTTCTTGTCTTTCCCTTATGCATCCATATTCTTCCCTTCCGGATTATATGTGTTAAT
CTATCAACACACACTCTATGAAGTGGGAGGTAGAAACTAAGTTCTGTCTGTGGAAGT
ATAATTGATAGTCCGTATGTGCTGCGATCCCCATTCCAGTTTCCATCAAAGATTAAT
GAAACAATAATCACTCCCTTTTCAGACAAGACAAAAAACTTTACATCTATAGCACCA
CTCTCTGCATTTTCAAGGATTTCTCCATTTAGAGTGTGGTTGGCAAGAAAAGTTATTT
CTCCGTCACTGAGAAGTACCTGTTCTGTCTTTGGAGCCCAAATGTGCCTTACTCTAG
GACCAAGAATATTGTCCCAGTAAGCAAAAGTAGCTGCTAATAAAGGTGATTCACCA
CTTAAAGCAATCTCTGTCTTGGCAACAGCTGGAGATGGCGGTGGGCAAAGAGTCGA
CATCACTGCATTCCAAGTGCACATTATCCAAATGCTCCTGAGATATCTCCTAAACC
CACACCTGCTCTAGCCAGGCCCGCCCCAGAGAGAAGGAACCGGGCAGCAGGGAC

GGCTGACGCACCAAGCGTCATCTTTTACGTGGGCGGAACTTGTCGCTGTTTGACGCG
CCTCTCTTTCCTAGCGGGACACCGTAGGTTACGT

SEQ ID NO:7

>обратнокомплементарная последовательность SEQ ID NO:123 SEQ ID NO:3

CAGAATTTCAAAGGTATTTTATTCAAATTCCTCATCTAGGAGAAAAGATATATAAC
AGTGTTTACACATGCTTCAATAACTTATTCAGTGTACAGCTTACATTTTCTATAACAA
CACAGTAAAGCAGCAAAGACAACAATTAGCACTCAAATAAGATTCTACTGTGTA
GCAATGAGCGGCACACTAGGAGGTGGGACCTACTCGCTTACCATGACGGAGTGCCT
TGCAGTTAGTTCACAAGCCATCATGGTCAGTGTGTGTTGTTCTGATTTGTAATGCCA
AAGCCACCGTGACCTTTCAGAATAGAAAGCTTTTTCTCGCTAAATCTGGTGGGTGAG
GAACGGGGCCCATTTTTATCCCTTTTGTAAAAAATAAATATATTCTCCCTTTTTATGC
TAAGTCCACAGTTTTAAATAGAAACACATATTTGTGTTTGTGTATACTCCTACACTGC
TGTTGCACAGAACTCCACTAATCAGTACTTCACAGCTAGCGAGATAGTCGAACGTTA
CAGGAACAGAAACAGACCACTTGAGTTTGCCATAGTAGCACCTAGAAAAATAGCAC
TGGGTGAGATTTCTCTGCTGTTCCCTATGATGCAGGTGACACGGGAAACACCAGAGTA
CAGGCAGAAACCAAAGGAAAGAGGCAAGACGCTTCCCTGCTCTTCAAAGATCTTAT
CAGCGAATGTACTCTGACATACTTAACAAGGACTTCTAATCTAAGCCAGGCACACG
GCAGCCGTGCAAAGGGTGGTCAGATGAAAGTACTGGGCCCTGAAATCTGACCCTC
TGCCAAGAAATTATATTTTCCAAGATTGGGAAAGGCACAGGAGGTGCGCATTTTAAT
TCGGCTCAAAAATAATGAAAATTAACCTTAAAAGTTGGCAACAATTATAAAAACAA
ATGCCACTTTCTTTGACAGAACTACAATAAACCAACAAAAAACTTGTACAGGTCAC
GATACTCAGGGCCCATGCATGACCCCTCGGCATTTCTGTACAGACCGAATCTGAAGG
ACTACGTCTATAAAGGAAGGGCTAACAACTGATTTACCTACAGCTCTGCCCTATCA
GTGTCTTCTCTCAAGAACTAATCTGTAGTCAGACTAAGTTCCTTTCTGAGGAACTGC
AACTTTAAATGCTCTAATGTTTAGCTGTGGCAGAAGTAATCGGACATAACCACAGAA
CACAGAGGGGCAGGAAGTCAACTCACACTTTATCTGTAAAGCTAACGAGGGTTTCA
GTGTGGTACATGTAAACCAGGAATCATAAGTTTCCAAGAAAACAAACAAAAACAAA
CAAAAACCAATCAGCAGTTATGGTCAAGTGTATATTCATCATTATCTTTAAA
AGACAGCAATAGTACTTAGGATAATTGTAAACATAAGGCCCTAAAAGAGTACATCT
ATTCTAGGAAGAGTCATTCAGTGTAAACGATGCACCTGACATCAGGTACAGACTTCTA
CTGACAAGTGTAGTGTACCCTGTCCTGCAGCAGGACTCGGGAGGAAGGATGTGCCC
ACACACTGCTGAGACACTGTAACAGCAGGTGTGACTGTGAAGAGACAGACACAGCA
AACCACACGGTCAAAGGTCATTAGAACATCACGTTCTTGTACACTAGTGTAGAAA
GGTCTCCCAAAGATGAAAGAGTGTAGGCCTGGCTTAATTTTCTCAGCTAGAGCCATT
ATTATGTTAAGATCGCCCTCTGCTGTTAAATCAAGATCTATCTTCAGGTTCCGAAGA
GACTTAAAGGGCTTTTTCCCCTTCTGCGTATCATCCTCGATGTACTTGATTAGTGTCA
AGGCTTTTCTGTGAAGAATGAGGAGGAAGTGTGCAAGGAAAGTACTCCTGAGAGAC
AGGCCAGGCTTCAAATGGAAGACCTGATCCAGGAAGGCTTTCACTAGAGTGTCTCT
GTGTAAGACATCTTGGAAAATATTCAAATCAGGAGTGAAGCTCTCATCTGTGTAGAT
GATGGTGTCTGCGCCATGTCCTCTTCTGAAGTTGCCCTCCAGAAGGCTGTCAGCTC

TGACCTCATGTATCTGCGTTGATTATAAATATGTTTCATGACACGGTGGCATCTGCTTG
ACAGTGTTGACATCCACATCAATGTGCGTGGTGGGGTACGGGGCATACTAACTTGC
CGGAAGGGTAGGACAAAAGTGCCTGTTGCATCCTTTAGCAAGCCTTGCACAAAGAG
TCCCGATTTCGTAATAAAGGACGATTCTGCTTACACAGCCTGGAGCATTTCCTCTCT
GCTGGTGTGAGAAAAGGCACAGCGTTCTTACTATCTTATTTACTTTCTCTGCACTGC
TGCCAACTACAACGGAACAGCCACAGGTCTGCAGGTGTGAGCTGATGGCATTGAGA
AGAAAGCCTTCGTGACAGCTGTCACCAATGTCATCATTGAGCACTGTATCAGCT
ATATCAATGTCTTCAGGAACACTGTGGGATTTTCATAGATGCAAGCAGCTCCATTACA
GGAATGACTTCCCAGTAAGCATGGGAATGATACTCTGACCCTGATCTTCCATCCTC
TCTGTGCCTTCCAAGACAATTTTCTGGACATTTTCTTGTCTTTTCTTATGCATCCATAT
TCTTCTTTTTCGAATAATGTGTGTTAGCCTGTCAACACACACTCTGTGAAGTGGGAG
GTAGAAGCTCAGCTCTGTCTGCGGCAGTATAATTGATAGTCCATAAGTGCTCCGATC
TCCATTCCAGTTTCCGTCGAAGATTAATGAAACAATAATTACCCCTTTTTTCAGATAA
GACAAAAAATTTTACATCTATAGCCCCACTCTCTGCATTTTGAAGAATTTCTCCATTT
AGAGTGTGGTTGGCAAGAAAAGTTATTTCTCCATCACTGAGAAGCACTTGGTCTGTC
TTTGGAGCCCAAATATGCCTTACTCTAGGACCAAGAATATTATCCCAGTAAGCAAAG
GTAGCCGCCAACAAGGGTGTATTCACCACTTAAAGCAATCTCTGTCTTGGCAACAGCA
GGAGATGGTGGGGGGCAGATAGTCGACATCCCTGCATCCCAGGTCTCACTGCATTCC
AGGTCTCACATTATCCGAACGCTTGCAATAGCCACTCGCCGCTGCTGCGCCTTACC
GCCGGCGCAGGGACCGCAACCGC

SEQ ID NO:8

>обратнокомплементарная последовательность SEQ ID NO:4

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATTTTAAAGGTATTTTATTCCAAATTCCCCATCT
AGGAGAAAAGATGTATAACAGTGTTTACACATGCTTCAATAACTTATCACTATACA
ACTTACATTCTCTAAAACAACAGAGTAAACCAGCAGAGACAACACTTAGCACTTAA
ATAAGATTCTACTGTGGGAAGCAATGGTGTGGCACACTAGAAGGAGGGATCTACCC
ATTTACCATGATGGAGTGACTTGGAGTTCATAAGCCATCATGGACAGTGTGCGTTGT
TCTGATGTGTCATGTCAAACCCTGTGACCTTTCAGAATAGAATGTTTTTTTTCTGAC
TAAATCTGGTGGGTGAGGAAAGGGTTCATTTTTATCCCTTTTGTAATAATAATA
TAGTCTCCCTTTTTATGCTAAGTCCACAGTTTTAAATAAAACACTTACTTGTGTTTGT
GTATAACCCTACACTGCTGTAGCACGGAGCTTTACCAGTCAGTACTTCACAGCCAGCA
AGGTACGAACGTTACAGGGACAGAGACGGACCGCTTGAGTTTGCCACAATAGCACC
TAGAGAAATAGCACTGGGGTCAGAGTTCCTGCTGTCCTTAGGATGCAGGGAACG
TGGAGAACACCAAAGTCCAGGCAGAAATGAAAGGAAAGAGGCAAGAAGCTCTCCT
GCTCTGCAAAGAAGATTTTATCAGCGAATGTACTCTCTGGCATAGTTTACAAGA
ACTTCTAAGCCAGGCCCATGGCGGACTGTGCAAAGGGAAGTCAGACGAAAGTGACTGGG
CCCTGAAATCTGACCTTCTGCCAAGAAATTATATTTTCCAAGATTGGGAAAGGCACA
GGAGGTGCACATTTTAATTTGGCTCAAAAATAATGAAAATTAACCTTAAAAGTGGC
AACAAATTATAAAAACCAATGCCACTTTCTTTGACAGAAGTACAATAAACCAACAAA
AAGCATACCACAGTTCACGATATTCAGTGCCCATGCATGATGGTTGGGCATGTCTAT

ACAGACCACATCTAAAGGACTAAGTCTATAAAGGAAGATCCAACAACACTGACTTCAC
CTAAAACCTCCGCTTTCTCATGTCTTCTTTCAAAAACGAATCTGCAGACAGACTAAGT
TGCTTTCTGTAGAAGTGCAAAACAAAGTGCTTTAGTTTTAGTTGTTGCAAAAAGTGAT
CCTACACGCCACAGATCGTACAGGCCAGAGAACACAGGGACAGGCAGTCAACTCAC
AGCTTACCTGTAAAAAGCTAACTAGGGTTTCAGTGTGATGCATGTAAACCATGAATT
ATAAGTTTCAAAAAACAACAAAACCAACCAGCAGTTGTGGTGAAGTTTAC
ATCCCTTCATTCGTATCCTTACAAGACAGCACTAGTACTTAGGAGGGTTGTAAACAT
AAGTCCCTACGAGGGTACATCTAGTCTAGGAAAAGAGACATTCACTACAACGATGT
ACCTGACATCTGGTACAGACCTCTACTGACAAGTGTAGTGTAAACGTGTCCTGCGGCA
GGACCCTGGAGGAAGGATGTGTCCAAGCGCTGAGACACTGTAACAGCAAGTGTGA
CTGTCATGAGACACACGGAGCAAACCACATGTTTTAAAAAGTCATTAGAACATCACG
TTCTTGGACACTAGTGTAGAAAGGTCTCCCGAAGATGAAAGAGTGTAGGCCTGGCTT
AATTTTCTCAGCTAGAGCCATTATTATGTTAAGGTGCGCCCTCTGCTGTAAATCAAG
ATCTATCTTCAGGTTCCGAAGAGACTTAAAGGGCTTTTTCCCCTTCTGCGTGTTCATCC
TCTATGTACTTGATTAGTGTCAAGGCTTTTCTGTGAAGAATGAGGAGGAACCTGTGCA
AGGAAAGTACTCCTGAGAGACAGGCCAGGCTTCAAATGGAAGACCTGATCCAGAAA
GGCTTTCACTAGAGTGTCTCTGTGTAAGACATCTTGGAATAATTCAAATCAGGAGT
GAAGCTCTCATCTGTGTAGATGATGGTGTCTGAGCCATGTCCTCTTCTGAAGTTGC
CCTCCAGAAGGCTGTCAGCTCTGACCTCATGTATCTGCGTTGATTATAAATATGTTC
ATGACACGGTGGCATCTGCTTGACAGTGTTGACATCCACATCGATGTGTGTGGTGGG
ATAAGGGGCATACATAACTTGCCGAAAGGTAGTACAAAACCTGCCAGTCGCATCCT
TTAGCAAGCCTTGTACAAAGAGTCCAGATTCGTATTTAAAGGACGATTCGGCTTCAC
ACAGCCTGGAGCACTTCCTCTCTGCTGGTGTGAGAAAAGGCACAGTGTCTTACTA
TCTTATTTACTTTCTCTGCACTGCTGCCTACCACCACAGAACAGCCGCAGGTCTGCA
GATGTGAGCTGATGGCATTGAGAAGAAAGCCTTCATGACAGCTGTCACCAATGTCA
TCATCATTGAGTACTGTATCAGCTATATCGAGGTCTTCAGGAACACTGTGTGATCTC
ATAGACGCAAGCAGCTCCATCACAGGGATGACCTCCCAGTAAGCATAGGGATGAT
ACTCTGACCCTGATCTTCCATCCTCTCGGTGCCTTCCAAGACAATTTTCTGGACATTT
TCTTGTCTTTCTTGTGCATCCATATCCTTCTTTTTCGAATGATGTGCGTTAGCCTGT
AACACACACTCTGTGCAGTGGGAGGTAGAACTCAGCTCCGTCTGCGGCAGTATAA
TTGATAGTCCGTAAGTGTCCGATCTCCGTTCCAGTTCCCGTTCGAAGATTAATGAAA
CAATAATGACGCCCTTTTCAGATAAGACAAAAACTTTACATCTATTGCCCCACTCT
CCGCATTCCGAAGAATTTCTCCATTCAGAGTGTGGTTGGCAAGAAAAGTGATTTCTC
CATCACTGAGGAGTACTTGGTCTGTCTTTGGAGCCCAAATGTGCCTTACTCTAGGAC
CAAGAATATTATCCCAGTAAGCAAAGGTAGCCGCCAACAAGGGTGATTCACCACTT
AAAGCAATCTCTGTCTTGGCAACAGCAGGAGATGGTGGGGGGCAGATAGTCGACAT
CCCTGCATCCCAGGTCTCACATTATCAAACGCTTGAATAGCCACTCGCCGCGCT
GCGCCTTACCGCCGGCGCAGGGACCGCAACCGCAGCCGGCTCCGGGCCCCCGCCCC
GGCCCCGCCCTCCACGCCCCCGAGTCCGCCCGTCTGAGCCCCGCCCCCAACCAG
GCCGCTCCAGATTCTGCAGGGGTCTGTGTCCGTTCTTTTTAATCTGGTTTCCTTCTT

TTGTCTTTGGTCACCGTTATGGAGTCAAGTTGCGATCTGAGGCAACCAAAAACGCACC
TGCCTAGCATAACCCTGCCTGGACTGTCTAGACACCACTCCCACAGAGAAGGAACAG
GCAATTGGGATGGCTGACACTACAAACG

SEQ ID NO:9

>NM_145005.6 Homo sapiens, субъединица комплекса C9orf72-SMCR8 (C9orf72),
транскрипционный вариант 1, мРНК

ACGTAACCTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGTGCGTCAAACAGCGACAAGTTC
CGCCACGTAAAAG
ATGACGCTTGATATCTCCGGAGCATTTGGATAATGTGACAGTTGGAATGCAGTGATG
TCGACTCTTTGCC
CACCGCCATCTCCAGCTGTTGCCAAGACAGAGATTGCTTTAAGTGGCAAATCACCTT
TATTAGCAGCTAC
TTTTGCTTACTGGGACAATATTCTTGGTCCTAGAGTAAGGCACATTTGGGCTCCAAA
GACAGAACAGGTA
CTTCTCAGTGATGGAGAAATAACTTTTCTTGCCAACCACACTCTAAATGGAGAAATC
CTTCGAAATGCAG
AGAGTGGTGCTATAGATGTAAAGTTTTTTGTCTTGTCTGAAAAGGGAGTGATTATTG
TTCATTAATCTT
TGATGGAAACTGGAATGGGGATCGCAGCACATATGGACTATCAATTATACTTCCAC
AGACAGAACTTAGT
TTCTACCTCCCACCTTCATAGAGTGTGTGTTGATAGATTAACACATATAATCCGGAAA
GGAAGAATATGGA
TGCATAAGGAAAGACAAGAAAATGTCCAGAAGATTATCTTAGAAGGCACAGAGAG
AATGGAAGATCAGGG
TCAGAGTATTATCCAATGCTTACTGGAGAAGTGATTCCCTGTAATGGAAGTCTTTC
ATCTATGAAATCA
CACAGTGTTCCCTGAAGAAATAGATATAGCTGATACAGTACTCAATGATGATGATATT
GGTGACAGCTGTC
ATGAAGGCTTTCTTCTCAAGTAAGAATTTTTCTTTTCATAAAAAGCTGGATGAAGCAG
ATACCATCTTATG
CTCACCTATGACAAGATTTGGAAGAAAGAAAATAACAGACTGTCTACTTAGATTGTT
CTAGGGACATTAC
GTATTTGAACTGTTGCTTAAATTTGTGTTATTTTTCACTCATTATATTTCTATATATAT
TTGGTGTTATT
CCATTTGCTATTTAAAGAAACCGAGTTTCCATCCCAGACAAGAAATCATGGCCCCTT
GCTTGATTCTGGT
TTCTTGTTTTACTTCTCATTAAAGCTAACAGAATCCTTTCATATTAAGTTGTACTGTA
GATGAACTTAAG
TTATTTAGGCGTAGAACAAAATTATTCATATTTATACTGATCTTTTTCCATCCAGCAG
TGGAGTTTAGTA

CTTAAGAGTTTGTGCCCTTAAACCAGACTCCCTGGATTAATGCTGTGTACCCGTGGG
 CAAGGTGCCTGAA
 TTCTCTATACACCTATTTCCCTCATCTGTAAAATGGCAATAATAGTAATAGTACCTAAT
 GTGTAGGGTTGT
 TATAAGCATTGAGTAAGATAAATAATATAAAGCACTTAGAACAGTGCCTGGAACAT
 AAAAACACTTAATA
 ATAGCTCATAGCTAACATTTCCCTATTTACATTTCTTCTAGAAATAGCCAGTATTTGTT
 GAGTGCCTACAT
 GTTAGTTCCTTTACTAGTTGCTTTACATGTATTATCTTATATTCTGTTTTAAAGTTTCT
 TCACAGTTACA
 GATTTTCATGAAATTTTACTTTTAATAAAAAGAGAAGTAAAAGTATAAAGTATTTACT
 TTTATGTTACAG
 TCTTTTCCTTTAGGCTCATGATGGAGTATCAGAGGCATGAGTGTGTTTAAACCTAAGA
 GCCTTAATGGCTT
 GAATCAGAAGCACTTTAGTCCTGTATCTGTTCAGTGTGAGCCTTTCATACATCATTTT
 AAATCCCATTTG
 ACTTTAAGTAAGTCACTTAATCTCTCTACATGTCAATTTCTTCAGCTATAAAATGATG
 GTATTTCAATAA
 ATAAATACATTAATTAATGATATTATACTGACTAATTGGGCTGTTTTAAGGCTCAA
 TAAGAAAATTTCT
 GTGAAAGGTCTCTAGAAAATGTAGGTTCCCTATACAAATAAAAAGATAACATTGTGCTT
 ATAAAAAAA

SEQ ID NO:10

обратнокомплементарная последовательность SEQ ID NO:9

TTTTTTTTATAAGCACAATGTTATCTTTTATTTGTATAGGAACCTACATTTTCTAGAG
 ACCTTTCACAGAAATTTTCTTATTGAGCCTTAAAACAGCCCAATTAGTCAGTATAAT
 ATCATTTAATTAATGTATTTATTTATTGAAATACCATCATTTTATAGCTGAAGAAAT
 GACATGTAGAGAGATTAAGTGACTTACTTAAAGTCAAATGGGATTTAAAATGATGT
 ATGAAAGGCTGACACTGAACAGATACAGGACTAAAGTGCTTCTGATTCAAGCCATT
 AAGGCTCTTAGGTTAAACACACTCATGCCTCTGATACTCCATCATGAGCCTAAAGGA
 AAAGACTGTGAACATAAAAAGTGAATACTTTATACTTTTACTTCTCTTTTATTAAGT
 AAAATTTTCATGAAAATCTGTAAGTGTGAAGAACTTTAAAACAGAATATAAGATAA
 TACATGTAAAGCAACTAGTAAAGGAACTAACATGTAGGCACTCAACAAATACTGGC
 TATTTCTAGAAGAAATGTAATAGGAAATGTTAGCTATGAGCTATTATTAAGTGTTT
 TTATGTTCCAGGCACTGTTCTAAGTGCTTTATATTATTTATCTTACTCAATGCTTATA
 ACAACCCTACACATTAGGTACTATTACTATTATTGCCATTTTACAGATGAGGAAATA
 GGTGTATAGAGAATTCAGGCACCTTGCCACGGGTACACAGCATTAAATCCAGGGAG
 TCTGGTTTAAAGGGCACAACTCTTAAGTACTAACTCCACTGCTGGATGGAAAAAG
 ATCAGTATAAATATGAATAATTTTGTCTACGCCTAAATAACTTAAGTTCATCTACA
 GTACAACTTAATATGAAAGGATTCTGTTAGCTTTAATGAGAAGTAAAACAAGAAAC

CAGAATCAAGCAAGGGGCCATGATTTCTTGTCTGGGATGGAAACTCGGTTTCTTTAA
 ATAGCAAATGGAATAACACCAAATATATATAGAAATATAATGAGTGAAAAATAACA
 CAAATTTAAGCAACAGTTCAAATACGTAATGTCCCTAGAACAATCTAAGTAGACAG
 TCTGTTATTTTCTTTCTTCCAAATCTTGTTCATAGGTGAGCATAAGATGGTATCTGCTT
 CATCCAGCTTTTATGAAAAGAAAAATTCTTACTTGAGAAGAAAGCCTTCATGACAGC
 TGTCACCAATATCATCATCATTGAGTACTGTATCAGCTATATCTATTTCTTCAGGAAC
 ACTGTGTGATTTTCATAGATGAAAGCAGTTCCATTACAGGAATCACTTCTCCAGTAAG
 CATTGGAATAATACTCTGACCCTGATCTTCCATTCTCTCTGTGCCTTCTAAGATAATC
 TTCTGGACATTTTCTTGTCTTTCCTTATGCATCCATATTCTTCCCTTCCGGATTATATG
 TGTTAATCTATCAACACACACTCTATGAAGTGGGAGGTAGAACTAAGTTCTGTCTG
 TGGAAGTATAATTGATAGTCCATATGTGCTGCGATCCCCATTCCAGTTTCCATCAA
 GATTAATGAAACAATAATCACTCCCTTTTCAGACAAGACAAAAAACTTTACATCTAT
 AGCACCCTCTCTGCATTTTCGAAGGATTTCTCCATTTAGAGTGTGGTTGGCAAGAAA
 AGTTATTTCTCCATCACTGAGAAGTACCTGTTCTGTCTTTGGAGCCCAAATGTGCCTT
 ACTCTAGGACCAAGAATATTGTCCCAGTAAGCAAAGTAGCTGCTAATAAAGGTGA
 TTTGCCACTTAAAGCAATCTCTGTCTTGGCAACAGCTGGAGATGGCGGTGGGCAAAG
 AGTCGACATCACTGCATTTCCAATGTCCAAATGCTCCGGAGATATCAAG
 CGTCATCTTTTACGTGGGCGGAACCTTGTCGCTGTTTGACGCACCTCTCTTTCCTAGCG
 GGACACCGTAGGTTACGT

SEQ ID NO:11

>NM_018325.5 Homo sapiens, субъединица комплекса C9orf72-SMCR8 (C9orf72),
 транскрипционный вариант 2, мРНК
 GGTTGCGGTGCCTGCGCCCGCGGCGGAGGGCGCAGGCGGTGGCGAGTGGATATC
 TCCGGAGCATTGG
 ATAATGTGACAGTTGGAATGCAGTGATGTCGACTCTTTGCCACCGCCATCTCCAGC
 TGTTGCCAAGACA
 GAGATTGCTTTAAGTGGCAAATCACCTTTATTAGCAGCTACTTTTGCTTACTGGGAC
 AATATTCTTGGTC
 CTAGAGTAAGGCACATTTGGGCTCCAAAGACAGAACAGGTACTTCTCAGTGATGGA
 GAAATAACTTTTCT
 TGCCAACCACACTCTAAATGGAGAAATCCTTCGAAATGCAGAGAGTGGTGCTATAG
 ATGTAAAGTTTTTT
 GTCTTGTCTGAAAAGGGAGTGATTATTGTTTCATTAATCTTTGATGGAAACTGGAAT
 GGGGATCGCAGCA
 CATATGGACTATCAATTATACTTCCACAGACAGAACTTAGTTTCTACCTCCCACTTCA
 TAGAGTGTGTGT
 TGATAGATTAACACATATAATCCGGAAAGGAAGAATATGGATGCATAAGGAAAGAC
 AAGAAAATGTCCAG
 AAGATTATCTTAGAAGGCACAGAGAGAATGGAAGATCAGGGTCAGAGTATTATTCC
 AATGCTTACTGGAG

AAGTGATTCTGTAATGGAAGTCTTTCATCTATGAAATCACACAGTGTTCTGAAG
AAATAGATATAGC
TGATACAGTACTCAATGATGATGATATTGGTGACAGCTGTCATGAAGGCTTTCTTCT
CAATGCCATCAGC
TCACACTTGCAAACCTGTGGCTGTTCCGTTGTAGTAGGTAGCAGTGCAGAGAAAGTA
AATAAGATAGTCA
GAACATTATGCCTTTTTCTGACTCCAGCAGAGAGAAAATGCTCCAGGTTATGTGAAG
CAGAATCATCATT
TAAATATGAGTCAGGGCTCTTTGTACAAGGCCTGCTAAAGGATTCAACTGGAAGCTT
TGTGCTGCCTTTC
CGGCAAGTCATGTATGCTCCATATCCCACCACACACATAGATGTGGATGTCAATACT
GTGAAGCAGATGC
CACCTGTGATGAACATATTTATAATCAGCGTAGATACATGAGATCCGAGCTGACAG
CCTTCTGGAGAGC
CACTTCAGAAGAAGACATGGCTCAGGATACGATCATCTACACTGACGAAAGCTTTA
CTCCTGATTTGAAT
ATTTTTCAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTAGTGAAAGCCTTCCTGGATCAGGTC
TTTCAGCTGAAAC
CTGGCTTATCTCTCAGAAGTACTTTCCTTGCACAGTTTCTACTTGTCTTCACAGAAA
AGCCTTGACACT
AATAAAATATATAGAAGACGATACGCAGAAGGGAAAAAAGCCCTTTAAATCTCTTC
GGAACCTGAAGATA
GACCTTGATTTAACAGCAGAGGGCGATCTTAACATAATAATGGCTCTGGCTGAGAA
AATTAAACCAGGCC
TACACTCTTTTATCTTTGGAAGACCTTTCTACACTAGTGTGCAAGAACGAGATGTTCT
AATGACTTTTTTA
AATGTGTAACCTTAATAAGCCTATTCCATCACAATCATGATCGCTGGTAAAGTAGCTC
AGTGGTGTGGGGA
AACGTTCCCCTGGATCATACTCCAGAATTCTGCTCTCAGCAATTGCAGTTAAGTAAG
TTACACTACAGTT
CTCACAAGAGCCTGTGAGGGGATGTCAGGTGCATCATTACATTGGGTGTCTCTTTTC
CTAGATTTATGCT
TTTGGGATACAGACCTATGTTTACAATATAATAAATATTATTGCTATCTTTTAAAGAT
ATAATAATAGGA
TGTAAACTTGACCACAACACTACTGTTTTTTTGAATAACATGATTCATGGTTTACATGTG
TCAAGGTGAAAT
CTGAGTTGGCTTTTACAGATAGTTGACTTTCTATCTTTTGGCATTCTTTGGTGTGTAG
AATTACTGTAAT
ACTTCTGCAATCAACTGAAAACCTAGAGCCTTTAAATGATTTCAATTCCACAGAAAGA
AAGTGAGCTTGAA

CATAGGATGAGCTTTAGAAAAGAAAATTGATCAAGCAGATGTTTAATTGGAATTGATT
ATTAGATCCTACT
TTGTGGATTTAGTCCCTGGGATTCAGTCTGTAGAAATGTCTAATAGTTCTCTATAGTC
CTTGTTCCCTGGT
GAACCACAGTTAGGGTGTGTTTGTGTTATTTTATTGTTCTTGCTATTGTTGATATTCTATG
TAGTTGAGCTC
TGTA AAAAGGAAATTGTATTTTATGTTTTAGTAATTGTTGCCAACTTTTTAAATTAATT
TTCATTATTTTT
GAGCCAAATTGAAATGTGCACCTCCTGTGCCTTTTTTCTCCTTAGAAAATCTAATTAC
TTGGAACAAGTT
CAGATTTCACTGGTCAGTCATTTTCATCTTGTTTTCTTCTTGCTAAGTCTTACCATGTA
CCTGCTTTGGC
AATCATTGCAACTCTGAGATTATAAAATGCCTTAGAGAATATACTAACTAATAAGAT
CTTTTTTTCAGAA
ACAGAAAATAGTTCCTTGAGTACTTCCTTCTTGCAATTTCTGCCTATGTTTTTGAAGTT
GTTGCTGTTTGC
CTGCAATAGGCTATAAGGAATAGCAGGAGAAATTTTACTGAAGTGCTGTTTTCTAG
GTGCTACTTTGGC
AGAGCTAAGTTATCTTTTGTGTTTTCTTAATGCGTTTGGACCATTTTGCTGGCTATAAAA
TAACTGATTAAT
ATAATTCTAACACAATGTTGACATTGTAGTTACACAAACACAAATAAATATTTTATT
TAAAATTCTGGAA
GTAATATAAAAAGGGAAAATATATTTATAAGAAAGGGATAAAGGTAATAGAGCCCTT
CTGCCCCCACCCA
CCAAATTTACACAACAAAATGACATGTTCGAATGTGAAAGGTCATAATAGCTTTCCC
ATCATGAATCAGA
AAGATGTGGACAGCTTGATGTTTTAGACAACCACTGAACTAGATGACTGTTGTACTG
TAGCTCAGTCATT
TAAAAAATATATAAATACTACCTTGTAGTGTCCATACTGTGTTTTTTACATGGTAG
ATTCTTATTTAAG
TGCTAACTGGTTATTTTCTTTGGCTGGTTTATTGTACTGTTATACAGAATGTAAGTTG
TACAGTGAAATA
AGTTATTAAGCATGTGTA AACATTGTTATATATCTTTTTCTCCTAAATGGAGAATTTT
GAATAAAATATA
TTTGAAATTTT

SEQ ID NO:12

обратнокомплементарная последовательность SEQ ID NO:11

AAAATTTCAAATATATTTTATTCAAATTTCTCCATTTAGGAGAAAAGATATATAACA
ATGTTTACACATGCTTTAATAACTTATTTCACTGTACA ACTTACATTCTGTATAACAG
TACAATAAACAGCCAAAGAAAATAACCAGTTAGCACTTAAATAAGAATCTACCAT

GTAAAAAACACAGTATGGGACACTACAAGGTAGTATTTATATATTTTTTAAATGACT
GAGCTACAGTACAACAGTCATCTAGTTCAGTGGTTGTCTAAAACATCAAGCTGTCCA
CATCTTTCTGATTCATGATGGGAAAGCTATTATGACCTTTCACATTCGAACATGTCAT
TTTGTGTGTAAATTTGGTGGGTGGGGGGCAGAAGGGCTCTATTACCTTTATCCCTTT
CTTATAAATATATTTTTCCCTTTTATATTACTTCCAGAATTTTAAATAAAATATTTATTT
GTGTTTGTGTAACACTACAATGTCAACATTGTGTTAGAATTATATTAATCAGTTATTTTA
TAGCCAGCAAAATGGTCCAAACGCATTAAGAAAACAAAAGATAACTTAGCTCTGCC
AAAGTAGCACCTAGGAAAACAGCACTTCAGTAAAATTTCTCCTGCTATTCCTTATAG
CCTATTGCAGGCAAACAGCAACAACCTTCAAAAACATAGGCAGAAATGCAAGAAGG
AAGTACTCAAGGAACACTATTTTCTGTTTCTGAAAAAAGATCTTATTAGTTAGTATAT
TCTCTAAGGCATTTTATAATCTCAGAGTTGCAATGATTGCCAAAGCAGGTACATGGT
AAGACTTAGCAAGAAGAAAACAAGATGAAAATGACTGACCAGTGAAATCTGAACTT
GTTCCAAGTAATTAGATTTTCTAAGGAGAAAAAAGGCACAGGAGGTGCACATTTCA
ATTTGGCTCAAAAATAATGAAAATTAATTTAAAAAGTTGGCAACAATTACTAAAAC
ATAAAATACAATTTCCCTTTTACAGAGCTCAACTACATAGAATATCAACAATAGCAAG
ACAATAAAATAAACAAAACACCCTAACTGTGGTTCACCAGGAACAAGGACTATAG
AGAACTATTAGACATTTCTACAGACTGAATCCCAGGGACTAAATCCACAAAGTAGG
ATCTAATAATCAATTCCAATTAACATCTGCTTGATCAATTTTCTTTCTAAAGCTCAT
CCTATGTTCAAGCTCACTTTCTTTCTGTGGAATTGAAATCATTTAAAGGCTCTAGTTT
TCAGTTGATTGCAGAAGTATTACAGTAATTCTACACACCAAAGAATGCCAAAAGAT
AGAAAGTCAACTATCTGTAAGCAACTCAGATTTACCTTGACACATGTAAACCA
TGAATCATGTATTTCAAAAAACAGTAGTTGTGGTCAAGTTTACATCCTATTATTAT
ATCTTTAAAAGATAGCAATAATATTTATTATATTGTAACATAGGTCTGTATCCCAA
AAGCATAAATCTAGGAAAAGAGACACCCAATGTAATGATGCACCTGACATCCCCTC
ACAGGCTCTTGTGAGAAGTGTAGTGTAACCTTACTTAACTGCAATTGCTGAGAGCAGA
ATTCTGGAGTATGATCCAGGGGAACGTTTCCCCACACCACTGAGCTACTTTACCAGC
GATCATGATTGTGATGGAATAGGCTTATTAAGTTACACATTTAAAAAGTCATTAGAA
CATCTCGTTCTTGCACACTAGTGTAGAAAGGTCTTCCAAAGATAAAAGAGTGTAGGC
CTGGTTTAATTTTCTCAGCCAGAGCCATTATTATGTTAAGATCGCCCTCTGCTGTTAA
ATCAAGGTCTATCTTCAGGTTCCGAAGAGATTTAAAGGGCTTTTTTCCCTTCTGCGTA
TCGTCTTCTATATATTTTATTAGTGTCAAGGCTTTTCTGTGAAGGACAAGTAGAACT
GTGCAAGGAAAGTACTTCTGAGAGATAAGCCAGGTTTCAGCTGAAAGACCTGATCC
AGGAAGGCTTTCCTAGAGTGTCTCTGTGTAAGACATCTTGAAAAATATTCAAATCA
GGAGTAAAGCTTTCGTCAGTGTAGATGATCGTATCCTGAGCCATGTCTTCTTCTGAA
GTGGCTCTCCAGAAGGCTGTCAGCTCGGATCTCATGTATCTACGCTGATTATAAATA
TGTTTCATGACAGGGTGGCATCTGCTTACAGTATTGACATCCACATCTATGTGTGTG
GTGGGATATGGAGCATAACATGACTTGCCGAAAGGCAGCACAAAGCTTCCAGTTGA
ATCCTTTAGCAGGCCTTGTACAAAGAGCCCTGACTCATATTTAAATGATGATTCTGC
TTCACATAACCTGGAGCATTCTCTCTGCTGGAGTCAGAAAAAGGCATAATGTTCT
GACTATCTTATTTACTTTCTCTGCACTGCTACCTACTACAACGGAACAGCCACAGGTT

TGCAAGTGTGAGCTGATGGCATTGAGAAGAAAGCCTTCATGACAGCTGTCACCAAT
 ATCATCATCATTGAGTACTGTATCAGCTATATCTATTTCTTCAGGAACACTGTGTGAT
 TTCATAGATGAAAGCAGTTCCATTACAGGAATCACTTCTCCAGTAAGCATTGGAATA
 AACTCTGACCCTGATCTTCCATTCTCTCTGTGCCTTCTAAGATAATCTTCTGGACAT
 TTTCTTGTCTTTCCCTTATGCATCCATATTCTTCCCTTTCCGGATTATATGTGTTAATCTA
 TCAACACACACTCTATGAAGTGGGAGGTAGAAACTAAGTTCTGTCTGTGGAAGTAT
 AATTGATAGTCCATATGTGCTGCGATCCCCATTCCAGTTTCCATCAAAGATTAATGA
 AACAATAATCACTCCCTTTTCAGACAAGACAAAAAACTTTACATCTATAGCACCACT
 CTCTGCATTTCGAAGGATTTCTCCATTTAGAGTGTGGTTGGCAAGAAAAGTTATTTCT
 CCATCACTGAGAAGTACCTGTTCTGTCTTTGGAGCCCAAATGTGCCTTACTCTAGGA
 CCAAGAATATTGTCCAGTAAGCAAAAGTAGCTGCTAATAAAAGGTGATTTGCCACTT
 AAAGCAATCTCTGTCTTGGCAACAGCTGGAGATGGCGGTGGGCAAAGAGTCGACAT
 CACTGCATTTCAAAGTGCACATTATCCAAATGCTCCGGAGATATCCAAGTCCGACCG
 CCTGCGCCTCCGCCGCCGCGGGCGCAGGCACCGCAACC

SEQ ID NO:13

>NC_000009.12:c27573866-27546546 хромосома 9 Homo sapiens, GRCh38.p13
 первичная сборка; часть хромосомы 9 человека, несущая ген C9orf72 (нуклеотиды
 27546546..27573866 сборки хромосомы 9)

ACGTAACCTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGTGCGTCAAACAGCGACAAGTTC
 CGCCACGTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTCAGCCGTCCCTGCTGCCCGGTTGCTTC
 TCTTTTGGGGGCGGGGTCTAGCAAGAGCAGGTGTGGGTTTAGGAGGTGTGTGTTTTT
 GTTTTTCCACCCTCTCTCCCCACTACTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGGTGAACA
 AGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAGAAGAAAACAAGGAGGGAAACAACCGCAG
 CCTGTAGCAAGCTCTGGAAGTCAAGGAGTCGCGCGCTAGGGGCGGGGCGGGGCGG
 GGGCGTGGTTCGGGGCGGGCCCGGGGGCGGGCCCGGGGCGGGGCTGCGGTTGCGGT
 GCCTGCGCCCGCGGCGGCGGAGGCGCAGGCGGTGGCGAGTGGGTGAGTGAGGAGG
 CGGCATCCTGGCGGGTGGCTGTTTGGGGTTCGGCTGCCGGGAAGAGGCGCGGGTAG
 AAGCGGGGCTCTCCTCAGAGCTCGACGCATTTTTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGAC
 CGAAGCTGGGTGTCGGGCTTTGCCTCTAGCGACTGGTGAATTGCCTGCATCCGGG
 CCCCAGGCTTCCCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCAGGGACAAGGGATGGG
 GATCTGGCCTCTTCCCTTGCTTTCCCGCCCTCAGTACCCGAGCTGTCTCCTTCCCGGG
 ACCCGCTGGGAGCGCTGCCGCTGCGGGCTCGAGAAAAGGGAGCCTCGGGTACTGAG
 AGGCCTCGCCTGGGGGAAGGCCGGAGGGTGGGCGGCGCGCGGCTTCTGCGGACCAA
 GTCGGGGTTCGCTAGGAACCCGAGACGGTCCCTGCCGGCGAGGAGATCATGCGGGA
 TGAGATGGGGGTGTGGAGACGCCTGCACAATTTAGCCCAAGCTTCTAGAGAGTGG
 TGATGACTTGCATATGAGGGCAGCAATGCAAGTCGGTGTGCTCCCCATTCTGTGGGA
 CATGACCTGGTTGCTTACAGCTCCGAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGAAGTGAC
 TATTGTGACTTGGGCATCACTTACTGATGGTAATCAGTTGTCTAAAGAAGTGACA
 GATTACATGTCGTGTGCTCATTGGGTCTATCTGGCCGCGTTGAACACCACCAGGCT
 TTGTATTCAGAAACAGGAGGGAGGTCTGCACTTTCCAGGAGGGGTGGCCCTTTCA

GATGCAATCGAGATTGTTAGGCTCTGGGAGAGTAGTTGCCTGGTTGTGGCAGTTGGT
AAATTTCTATTCAAACAGTTGCCATGCACCAGTTGTTCAACAACAAGGGTACGTAATC
TGTCTGGCATTACTTCTACTTTTGTACAAAGGATCAAAAAAAAAAAGATACTGTTA
AGATATGATTTTTCTCAGACTTTGGGAAACTTTTAAACATAATCTGTGAATATCACAG
AAACAAGACTATCATATAGGGGATATTAATAACCTGGAGTCAGAATACTTGAAATA
CGGTGTCATTTGACACGGGCATTGTTGTCACCACCTCTGCCAAGGCCTGCCACTTTA
GGAAAACCTGAATCAGTTGGAAACTGCTACATGCTGATAGTACATCTGAAACAAG
AACGAGAGTAATTACCACATTCCAGATTGTTCACTAAGCCAGCATTACCTGCTCCA
GGAAAAAATTACAAGCACCTTATGAAGTTGATAAAATATTTTGTGGCTATGTTGG
CACTCCACAATTTGCTTTCAGAGAAACAAAGTAAACCAAGGAGGACTTCTGTTTTTC
AAGTCTGCCCTCGGGTCTATTCTACGTTAATTAGATAGTTCCCAGGAGGACTAGGT
TAGCCTACCTATTGTCTGAGAACTTGGAAGTGTGAGAAATGGCCAGATAGTGATAT
GAACTTCACCTCCAGTCTTCCCTGATGTTGAAGATTGAGAAAGTGTGTGAACTTT
CTGGTACTGTAAACAGTTCCTGTCCTTGAAGTGGTCTGGGCAGCTCCTGTTGTGG
AAAGTGGACGGTTTAGGATCCTGCTTCTTTGGGCTGGGAGAAAATAAACAGCAT
GGTTACAAGTATTGAGAGCCAGGTTGGAGAAGGTGGCTTACACCTGTAATGCCAGA
GCTTTGGGAGGCGGAGGCAAGAGGATCACTTGAAGCCAGGAGTTCAAGCTCAACCT
GGGCAACGTAGACCCTGTCTCTACAAAAAATTA AAAACTTAGCCGGGCGTGGTGAT
GTGCACCTGTAGTCTAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGGGTCATTTGAGCCC
AAGAGTTTGAAGTTACCGAGAGCTATGATCCTGCCAGTGCATTCCAGCCTGGATGAC
AAAACGAGACCCTGTCTCTAAAAACAAGAAGTGAGGGCTTTATGATTGTAGAATT
TTCCTACAATAGCAGTGGACCAACCACCTTTCTAAATACCAATCAGGGAAGAGAT
GGTTGATTTTTTAAACAGACGTTTTAAAGAAAAAGCAAAACCTCAAACCTAGCACTCTA
CTAACAGTTTTAGCAGATGTTAATTAATGTAATCATGTCTGCATGTATGGGATTATTT
CCAGAAAGTGTATTGGGAAACCTCTCATGAACCCTGTGAGCAAGCCACCGTCTCACT
CAATTTGAATCTTGGCTTCCCTCAAAGACTGGCTAATGTTTGGTAACTCTCTGGAG
TAGACAGCACTACATGTACGTAAGATAGGTACATAAACAACCTATTGGTTTTGAGCTG
ATTTTTTTCAGCTGCATTTGCATGTATGGATTTTTCTCACCAAAGACGATGACTTCAA
GTATTAGTAAAATAATTGTACAGCTCTCCTGATTATACTTCTCTGTGACATTTCAATTT
CCCAGGCTATTTCTTTTGGTAGGATTTAAACTAAGCAATTCAGTATGATCTTTGTCC
TTCATTTTCTTTCTTATTCTTTTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTTTTTCTTGAGGCAGAG
TCTCTCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCCATCTCAGCTCATTGCAACCT
CTGCCACCTCCGGGTTCAAGAGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATT
ACAGGTGTCCACCACCACACCCGGCTAATTTTTTGTATTTTAGTAGAGGTGGGGTT
TCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAGCTCCTGACCTCAGGTGATCCACCTGCCTC
GGCCTACCAAAGAGCTGGGATAACAGGTGTGACCCACCATGCCCGGCCATTTTTTT
TTTCTTATTCTGTTAGGAGTGAGAGTGTAACCTAGCAGTATAATAGTTCAATTTTCA
ACGTGGTAAAAGTTTCCCTATAATTCAATCAGATTTTGCTCCAGGGTTCAGTTCTGTT
TTAGGAAATACTTTTATTTTTCAGTTTAAATGATGAAATATTAGAGTTGTAATATTGCCT
TTATGATTATCCACCTTTTTAACCTAAAAGAATGAAAGAAAAATATGTTTGCAATAT

AATTTTATGGTTGTATGTTAACTTAATTCATTATGTTGGCCTCCAGTTTGCTGTTGTT
AGTTATGACAGCAGTAGTGTCATTACCATTTCAATTCAGATTACATTCCTATATTTGA
TCATTGTAAACTGACTGCTTACATTGTATTA AAAACAGTGGATATTTTAAAGAAGCT
GTACGGCTTATATCTAGTGCTGTCTCTTAAGACTATTA AATTGATAACAACATATTTAA
AAGTAAATATTACCTAAATGAATTTTTGAAATTACAAATACACGTGTTAAAACCTGTC
GTTGTGTTCAACCATTTCTGTACATACTTAGAGTTAACTGTTTTGCCAGGCTCTGTAT
GCCTACTCATAATATGATAAAAGCACTCATCTAATGCTCTGTAAATAGAAGTCAGTG
CTTTCCATCAGACTGAACTCTCTTGACAAGATGTGGATGAAATCTTTAAGTAAAAT
TGTTTTACTTTGTCATACATTTACAGATCAAATGTTAGCTCCCAAAGCAATCATATGG
CAAAGATAGGTATATCATAGTTTGCCTATTAGCTGCTTTGTATTGCTATTATTATAAA
TAGACTTCACAGTTTTAGACTTGCTTAGGTGAAATTGCAATCTTTTTACTTTTCAGTC
TTAGATAACAAGTCTTCAATTATAGTACAATCACACATTGCTTAGGAATGCATCATT
AGGCGATTTTGTCAATTATGCAAACATCATAGAGTGTACTTACACAAACCTAGATAGT
ATAGCCTTTATGTACCTAGGCCGTATGGTATAGTCTGTTGCTCCTAGGCCACAAACC
TGTACAACCTGTTACTGTACTGAATACTATAGACAGTTGTAACACAGTGGTAAATATT
TATCTAAATATATGCAAACAGAGAAAAGGTACAGTAAAAGTATGGTATAAAAAGATA
ATGGTATACCTGTGTAGGCCACTTACCACGAATGGAGCTTGCAGGACTAGAAGTTGC
TCTGGGTGAGTCAGTGAGTGAGTGGTGAATTAATGTGAAGGCCTAGAACACTGTAC
ACCACTGTAGACTATAAACACAGTACGCTGAAGCTACACCAAATTTATCTTAACAGT
TTTTCTTCAATAAAAAATTATAACTTTTTAACTTTGTAACTTTTTAATTTTTTAACTT
TTAAAATACTTAGCTTGAAACACAAATACATTGTATAGCTATACAAAATATTTTTT
CTTTGTATCCTTATTCTAGAAGCTTTTTTCTATTTTCTATTTTAAATTTTTTTTTTACT
TGTTAGTCGTTTTTGTAAAAACTAAAACACACACTTTCACCTAGGCATAGACAG
GATTAGGATCATCAGTATCACTCCCTTCCACCTCACTGCCTTCCACCTCCACATCTTG
TCCCACTGGAAGGTTTTTAGGGGCAATAACACACATGTAGCTGTCACCTATGATAAC
AGTGCTTTCTGTTGAATACCTCCTGAAGGACTTGCCTGAGGCTGTTTTACATTTAACT
TAAAAA AAAAAAAGTAGAAGGAGTCACTCTAAAATAACAATAAAAGGCATAGT
ATAGTGAATACATAAACCAGCAATGTAGTAGTTTATTATCAAGTGTTGTACACTGTA
ATAATTGTATGTGCTATACTTTAAATAACTTGCAAAATAGTACTAAGACCTTATGAT
GGTTACAGTGTCACTAAGGCAATAGCATATTTTCAGGTCCATTGTAATCTAATGGGA
CTACCATCATATATGCAGTCTACCATTGACTGAAACGTTACATGGCACATAACTGTA
TTTGCAAGAATGATTTGTTTTACATTAATATCACATAGGATGTACCTTTTTAGAGTGG
TATGTTTATGTGGATTAAGATGTACAAGTTGAGCAAGGGGACCAAGAGCCCTGGGT
TCTGTCTTGGATGTGAGCGTTTATGTTCTTCTCCTCATGTCTGTTTTCTCATTA AATTC
AAAGGCTTGAACGGGCCCTATTTAGCCCTTCTGTTTTCTACGTGTTCTAAATAACTAA
AGCTTTTAAATTCTAGCCATTTAGTGTAGAACTCTCTTTGCAGTGATGAAATGCTGTA
TTGGTTTCTTGGCTAGCATATTA AATATTTTTATCTTTGTCTTGATACTTCAATGTCGT
TTTAAACATCAGGATCGGGCTTCAGTATTCTCATAACCAGAGAGTTCCTGAGGATA
CAGGACTGTTTGCCATTTTTTGTATGGCTCCAGACTTGTGGTATTTCCATGTCTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTGTACCTTTTAGCGGCTTTAAAGTATTTCTGTTGTTAGGTGTTGT

ATTACTTTTCTAAGATTACTTAACAAAGCACCACAAACTGAGTGGCTTTAAACAACA
GCAATTTATTCTCTCACAATTCTAGAAGCTAGAAGTCCGAAATCAAAGTGTTGACAG
GGGCATGATCTTCAAGAGAGAAGACTCTTTCCTTGCCTCTTCTGGCTTCTGGTGGTT
ACCAGCAATCCTGAGTGTTCCTTTCTTGCCTTGTAGTTTCAACAATCCAGTATCTGCC
TTTTGTCTTCACATGGCTGTCTACCATTTGTCTCTGTGTCTCCAAATCTCTCTCCTTAT
AAACACAGCAGTTATTGGATTAGGCCCCACTCTAATCCAGTATGACCCCATTTTAAC
ATGATTACACTTATTTCTAGATAAGGTCACATTCACGTACACCAAGGGTTAGGAATT
GAACATATCTTTTTGGGGGACACAATTCAACCCACAAGTGTCAAGTCTCTAGCTGAGC
CTTCCCTTCTGTTTTTCTCCTTTTTAGTTGCTATGGGTTAGGGGCCAAATCTCCAGT
CATACTAGAATTGCACATGGACTGGATATTTGGGAATACTGCGGGTCTATTCTATGA
GCTTTAGTATGTAACATTTAATATCAGTGTAAGAAGCCCTTTTTTAAGTTATTTCTT
TGAATTTCTAAATGTATGCCCTGAATATAAGTAACAAGTTACCATGTCTTGTA AAAAT
GATCATATCAACAAACATTTAATGTGCACCTACTGTGCTAGTTGAATGTCTTTATCCT
GATAGGAGATAACAGGATTCCACATCTTTGACTTAAGAGGACAAACCAAATATGTC
TAAATCATTTGGGGTTTTGATGGATATCTTTAAATTGCTGAACCTAATCATTGGTTTTC
ATATGTCATTGTTTAGATATCTCCGGAGCATTGGATAATGTGACAGTTGGAATGCA
GTGATGTCGACTCTTTGCCACCGCCATCTCCAGCTGTTGCCAAGACAGAGATTGCT
TTAAGTGGCAAATCACCTTTATTAGCAGCTACTTTTGCTTACTGGGACAATATTCTTG
GTCCTAGAGTAAGGCACATTTGGGCTCCAAAGACAGAACAGGTACTTCTCAGTGAT
GGAGAAATAACTTTTCTTGCCAACCACACTCTAAATGGAGAAATCCTTCGAAATGCA
GAGAGTGGTGCTATAGATGTAAGTTTTTTGTCTTGTCTGAAAAGGGAGTGATTATT
GTTTCATTAATCTTTGATGGAACTGGAATGGGGATCGCAGCACATATGGACTATCA
ATTATACTCCACAGACAGAACTTAGTTTTCTACCTCCCACTTCATAGAGTGTGTGTTG
ATAGATTAACACATATAATCCGGAAAGGAAGAATATGGATGCATAAGGTAAGTGAT
TTTTCAGCTTATTAATCATGTTAACCTATCTGTTGAAAGCTTATTTTCTGGTACATAT
AAATCTTATTTTTTTAATTATATGCAGTGAACATCAAACAATAAATGTTATTTATTTT
GCATTTACCCTATTAGATACAAATACATCTGGTCTGATACCTGTCATCTTCATATTA
CTGTGGAAGGTACGAAATGGTAGCTCCACATTATAGATGAAAAGCTAAAGCTTAGA
CAAATAAAGAACTTTTAGACCCTGGATTCTTCTTGGGAGCCTTTGACTCTAATACC
TTTTGTTTCCCTTTCATTGCACAATTCTGTCTTTTGCTTACTACTATGTGTAAGTATAA
CAGTTCAAAGTAATAGTTTCATAAGCTGTTGGTCATGTAGCCTTTGGTCTCTTTAACC
TCTTTGCCAAGTTCCAGGTTCATAAAATGAGGAGGTTGAATGGAATGGTTCCCAAG
AGAATTCCTTTAATCTTACAGAAATTATTGTTTTCTAAATCCTGTAGTTGAATATA
TAATGCTATTTACATTTAGTATAGTTTTGATGTATCTAAAGAACACATTGAATTCTC
CTTCTGTGTTCCAGTTTGATACTAACCTGAAAGTCCATTAAGCATTACCAGTTTTAA
AAGGCTTTTGCCCAATAGTAAGGAAAATAATATCTTTTAAAAGAATAATTTTTTAC
TATGTTTGCAGGCTTACTTCTTTTTTCTCACATTATGAAACTCTTAAAATCAGGAGA
ATCTTTTAAACAACATCATAATGTTTAATTTGAAAAGTGCAAGTCATTCTTTTCTTT
TTGAAACTATGCAGATGTTACATTGACTGTTTTCTGTGAAGTTATCTTTTTTCTACTG
CAGAATAAAGGTTGTTTTGATTTTATTTTGTATTGTTTATGAGAACATGCATTTGTTG

GGTTAATTTCTACCCCTGCCCCATTTTTTCCCTAAAGTAGAAAGTATTTTTCTTGT
GAACTAAATTACTACACAAGAACATGTCTATTGAAAAATAAGCAAGTATCAAAATG
TTGTGGGTTGTTTTTTAAATAAATTTTCTCTTGCTCAGGAAAGACAAGAAAATGTCC
AGAAGATTATCTTAGAAGGCACAGAGAGAATGGAAGATCAGGTATATGCAAATTGC
ATACTGTCAAATGTTTTTCTCACAGCATGTATCTGTATAAGGTTGATGGCTACATTTG
TCAAGGCCTTGAGACATACGAATAAGCCTTTAATGGAGCTTTTATGGAGGTGTACA
GAATAAACTGGAGGAAGATTTCCATATCTTAAACCCAAAGAGTTAAATCAGTAAAC
AAAGGAAAATAGTAATTGCATCTACAAATTAATATTTGCTCCCTTTTTTTTTCTGTTT
GCCCAGAATAAATTTGGATAACTTGTCATAGTAAAAATAAAAAAATTTGTCTCTG
ATATGTTCTTTAAGGTACTACTTCTCGAACCTTTCCCTAGAAGTAGCTGTAACAGAA
GGAGAGCATATGTACCCCTGAGGTATCTGTCTGGGGTGTAGGCCAGGTCCACACA
ATATTTCTTCTAAGTCTTATGTTGTATCGTTAAGACTCATGCAATTTACATTTTATTCC
ATAACTATTTTAGTATTAATAAATTTGTCAGTGATATTTCTTACCCTCTCCTCTAGGAAA
ATGTGCCATGTTTATCCCTTGGCTTTGAATGCCCTCAGGAACAGACACTAAGAGTT
TGAGAAGCATGGTTACAAGGGTGTGGCTTCCCCTGCGGAAACTAAGTACAGACTAT
TTCAGTAAAGCAGAGAAGTTCTTTTGAAGGAGAATCTCCAGTGAAGAAAGAGTT
CTTCACTTTTACTTCCATTTCTCTTGTGGGTGACCCTCAATGCTCCTTGTAAACTC
CAATATTTTAAACATGGCTGTTTTGCCTTTCTTTGCTTCTTTTTAGCATGAATGAGAC
AGATGATACTTTAAAAAAGTAATTAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AATACAGAACCCAATACAATGATCTCCTTTACCAAATTGTTATGTTTGTACTTTTGTA
GATAGCTTTCCAATTCAGAGACAGTTATTCTGTGTAAAGGTCTGACTTAACAAGAAA
AGATTTCCCTTTACCCAAAGAATCCCAGTCCTTATTTGCTGGTCAATAAGCAGGGTC
CCCAGGAATGGGGTAACTTTCAGCACCTCTAACCCTAGTTATTAGTAGACTAAT
TAAGTAACTTATCGCAAGTTGAGGAACTTAGAACCAACTAAAATTCTGCTTTTAC
TGGGATTTTGTTTTTTCAAACCAGAAACCTTACTTAAGTTGACTACTATTAATGAAT
TTTGGTCTCTCTTTAAGTGCTCTTCTTAAAAATGTTATCTTACTGCTGAGAAGTTCA
AGTTTGGGAAGTACAAGGAGGAATAGAACTTAAGAGATTTTCTTTTAGAGCCTCTT
CTGTATTTAGCCCTGTAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTGTGTTGAGCTTCA
GTGAGGCTATTCATTCACTTATACTGATAATGTCTGAGATACTGTGAATGAAATACT
ATGTATGCTTAAACCTAAGAGGAAATATTTCCCAAATTATTCTTCCCGAAAAGGA
GGAGTTGCCTTTTGATTGAGTTCTTGCAAATCTCACACGACTTTATTTTGAACAATA
CTGTTTGGGGATGATGCATTAGTTTGAACAACCTCAGTTGTAGCTGTCATCTGATA
AAATTGCTTCACAGGGAAGGAAATTTAACACGGATCTAGTCATTATTCTTGTTAGAT
TGAATGTGTGAATTGTAATTGTAACAGGCATGATAATTACTTTAAAAACTAAA
AACAGTGAATAGTTAGTTGTGGAGGTTACTAAAGGATGGTTTTTTTTTAAATAAAAC
TTTCAGCATTATGCAAATGGGCATATGGCTTAGGATAAACTTCCAGAAGTAGCATC
ACATTTAAATTCTCAAGCACTTAATAATATGGGGCTCTGAAAACTGGTTAAGGTT
ACTCCAAAATGGCCCTGGGTCTGACAAAGATTCTAACTTAAAGATGCTTATGAAG
ACTTTGAGTAAAATCATTTCAATAAATAAGTGAGGAAAAACAACACTAGTATTAATTC
ATCTTAAATAATGTATGATTTAAAAATATGTTTAGCTAAAAATGCATAGTCATTTG

ACAATTTTCATTTATATCTCAAAAAATTTACTTAACCAAGTTGGTCACAAAACCTGATG
AGACTGGTGGTGGTAGTGAATAAATGAGGGACCATCCATATTTGAGACACTTTACAT
TTGTGATGTGTTATACTGAATTTTCAGTTTGATTCTATAGACTACAAATTTCAAAATT
ACAATTTCAAGATGTAATAAGTAGTAATATCTTGAAATAGCTCTAAAGGGAATTTTT
CTGTTTTATTGATTCTTAAAATATATGTGCTGATTTTTGATTTGCATTTGGGTAGATTA
TACTTTTATGAGTATGGAGGTTAGGTATTGATTCAAGTTTTCTTACCTATTTGGTAA
GGATTTCAAAGTCTTTTTGTGCTTGGTTTTCTCATTTTTTAAATATGAAATATATTGA
TGACCTTTAACAAATTTTTTTTTATCTCAAATTTTAAAGGAGATCTTTTCTAAAAGAGG
CATGATGACTTAATCATTGCATGTAACAGTAAACGATAAACCAATGATTCCATACTC
TCTAAAGAATAAAAGTGAGCTTTAGGGCCGGGCATGGTCAGAAATTTGACACCAAC
CTGGCCAACATGGCGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATCAGCCGGGCAT
GGTGGCGGCACCTATAGTCCCAGCTACTTGGGAGGATGAGACAGGAGAGTCACTTG
AACCTGGGAGGAGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGCCATTGCACTCCAGCCTGA
GCAATGAAAGCAAACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAGAATAAAAAG
TGAGCTTTGGATTGCATATAAATCCTTTAGACATGTAGTAGACTTGTTTGATACTGTG
TTTGAACAAATTACGAAGTATTTTCATCAAAGAATGTTATTGTTTGATGTTATTTTTA
TTTTTTATTGCCAGCTTCTCTCATATTACGTGATTTTCTTCACTTCATGTCACCTTTAT
TGTGCAGGGTCAGAGTATTATTCCAATGCTTACTGGAGAAGTGATTCCGTGAATGGA
ACTGCTTTTCATCTATGAAATCACACAGTGTTCTGAAGAAATAGATGTAAGTTTAAA
TGAGAGCAATTATACACTTTATGAGTTTTTTGGGGTTATAGTATTATTATGTATATTA
TTAATATTCTAATTTTAAATAGTAAGGACTTTGTCATACATACTATTACATACAGTAT
TAGCCACTTTAGCAAATAAGCACACACAAAATCCTGGATTTTATGGCAAAACAGAG
GCATTTTTGATCAGTGATGACAAAATTAATTCATTTTGTATTTCATTACTTTTTAT
AATTCCTAAAAGTGGGAGGATCCCAGCTCTTATAGGAGCAATTAATATTTAATGTAG
TGTCTTTTGAACAAAACCTGTGTGCCAAAGTAGTAACCATTAATGGAAGTTTACTTG
TAGTCACAAATTTAGTTTCCTTAATCATTGTTGAGGACGTTTTGAATCACACACTAT
GAGTGTTAAGAGATACTTTAGGAACTATTCTTGTTGTTTTCTGATTTTGTCAATTA
GGTTAGTCTCCTGATTCTGACAGCTCAGAAGAGGAAGTTGTTCTTGTA AAAAATTGTT
TAACCTGCTTGACCAGCTTTCACATTTGTTCTTCTGAAGTTTATGGTAGTGCACAGAG
ATTGTTTTTTGGGGAGTCTTGATTCTCGGAAATGAAGGCAGTGTGTTATATTGAATC
CAGACTTCCGAAAACCTGTATATTA AAAAGTGTTATTTCAACACTATGTTACAGCCAG
ACTAATTTTTTTATTTTTTGATGCATTTTAGATAGCTGATACAGTACTCAATGATGAT
GATATTGGTGACAGCTGTCATGAAGGCTTCTTCTCAAGTAAGAATTTTTCTTTTCAT
AAAAGCTGGATGAAGCAGATACCATCTTATGCTCACCTATGACAAGATTTGGAAGA
AAGAAAATAACAGACTGTCTACTTAGATTGTTCTAGGGACATTACGTATTTGAACTG
TTGCTTAAATTTGTGTTATTTTTCACTCATTATATTTCTATATATATTTGGTGTTATTC
CATTTGCTATTTAAAGAAACCGAGTTTCCATCCCAGACAAGAAATCATGGCCCCTTG
CTTGATTCTGGTTTTCTTGTTTTACTTCTCATTAAAGCTAACAGAATCCTTTCATATTA
AGTTGTACTGTAGATGAACTTAAGTTATTTAGGCGTAGAACAAAATTATTCATATTT
ATACTGATCTTTTTCCATCCAGCAGTGGAGTTTAGTACTTAAGAGTTTGTGCCCTTAA

ACCAGACTCCCTGGATTAATGCTGTGTACCCGTGGGCAAGGTGCCTGAATTCTCTAT
ACACCTATTTCCCTCATCTGTAAAATGGCAATAATAGTAATAGTACCTAATGTGTAGG
GTTGTTATAAGCATTGAGTAAGATAAATAATAAAGCACTTAGAACAGTGCCTGG
AACATAAAAAACACTTAATAATAGCTCATAGCTAACATTTCCCTATTTACATTTCTTCTA
GAAATAGCCAGTATTTGTTGAGTGCCTACATGTTAGTTCCTTTACTAGTTGCTTTACA
TGTATTATCTTATATTCTGTTTTAAAGTTTCTTCACAGTTACAGATTTTCATGAAATTT
TACTTTTAATAAAAAGAGAAGTAAAAGTATAAAGTATTCACTTTTATGTTACAGTCT
TTTCCTTTAGGCTCATGATGGAGTATCAGAGGCATGAGTGTGTTAACCTAAGAGCC
TTAATGGCTTGAATCAGAAGCACTTTAGTCCTGTATCTGTTTCAGTGTCCAGCCTTTTCAT
ACATCATTTTAAATCCCATTTGACTTTAAGTAAGTCACTTAATCTCTCTACATGTCAA
TTTCTTCAGCTATAAAAATGATGGTATTTCAATAAATAAATACATTAATTAATGATA
TTATACTGACTAATTGGGCTGTTTTAAGGCTCAATAAGAAAATTTCTGTGAAAGGTC
TCTAGAAAATGTAGGTTCCCTATACAAATAAAAAGATAACATTGTGCTTATAGCTTCGG
TGTTTATCATATAAAGCTATTCTGAGTTATTTGAAGAGCTCACCTACTTTTTTTTGT
TTAGTTTGTAAATTGTTTTATAGGCAATGTTTTAATCTGTTTTCTTTAACTTACAGT
GCCATCAGCTCACACTTGCAAACCTGTGGCTGTTCCGTTGTAGTAGGTAGCAGTGCA
GAGAAAGTAAATAAGGTAGTTTATTTTATAATCTAGCAAATGATTTGACTCTTTAAG
ACTGATGATATATCATGGATTGTCATTTAAATGGTAGGTTGCAATTAATAATGATCTA
GTAGTATAAGGAGGCAATGTAATCTCATCAAATTGCTAAGACACCTTGTGGCAACA
GTGAGTTTGAATAAACTGAGTAAGAATCATTTATCAGTTTATTTTGATAGCTCGGA
AATACCAGTGTCCAGTAGTGTATAAATGGTTTTGAGAATATATTAATAATCAGATATAT
AAAAAAAATTACTCTTCTATTTCCCAATGTTATCTTTAACAAATCTGAAGATAGTCA
TGTACTTTTGGTAGTAGTTCCAAAGAAATGTTATTTGTTTATTCATCTTGATTTTCATT
GTCTTCGCTTTCCCTTCTAAATCTGTCCCTTCTAGGGAGCTATTGGGATTAAGTGGTCA
TTGATTATTATACTTTATTCAGTAATGTTTCTGACCCTTTCCTTCAGTGCTACTTGAGT
TAATTAAGGATTAATGAACAGTTACATTTCCAAGCATTAGCTAATAAACTAAAGGAT
TTTGCACTTTTCTTCACTGACCATTAGTTAGAAAGAGTTCAGAGATAAGTATGTGTA
TCTTTCAATTTAGCAAACCTAATTTTTTAAAAAAGTTTTACATAGGAAATATGTTG
GAAATGATACTTTACAAAGATATTCATAATTTTTTTTTGTAATCAGCTACTTTGTATA
TTTACATGAGCCTTAATTTATATTTCTCATATAACCATTTATGAGAGCTTAGTATACC
TGTGTCATTATATTGCATCTACGAAGTGTGACCTTATTCCTTCTGTTACCTCAAACA
GGTGGCTTTCCATCTGTGATCTCCAAAGCCTTAGGTTGCACAGAGTGACTGCCGAGC
TGCTTTATGAAGGGAGAAAGGCTCCATAGTTGGAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAC
ATTTTTCCCATCCTCCATCCTCTTGAGGGAGAATAGCTTACCTTTTATCTTGTTTTAAT
TTGAGAAAGAAGTTGCCACCACTCTAGGTTGAAAACCACTCCTTTAACATAATAACT
GTGGATATGGTTTGAATTTCAAGATAGTTACATGCCTTTTTATTTTTCTAATAGAGC
TGTAGGTCAAATATTATTAGAATCAGATTTCTAAATCCCACCAATGACCTGCTTAT
TTTAAATCAAATTCATAATTAATTCTCTTCTTTTTGGAGGATCTGGACATTCTTTGA
TATTTCTTACAACGAATTTTCATGTGTAGACCCACTAACAGAAGCTATAAAAAGTTGC
ATGGTCAAATAAGTCTGAGAAAGTCTGCAGATGATATAATTCACCTGAAGAGTCAC

AGTATGTAGCCAAATGTTAAAGGTTTTGAGATGCCATACAGTAAATTTACCAAGCAT
TTTCTAAATTTATTTGACCACAGAATCCCTATTTTAAGCAACAACCTGTTACATCCCAT
GGATTCCAGGTGACTAAAGAATACTTATTTCTTAGGATATGTTTTATTGATAATAAC
AATTAATAATTTTCAGATATCTTTCATAAGCAAATCAGTGGTCTTTTTACTTCATGTTTT
AATGCTAAAATATTTTCTTTTATAGATAGTCAGAACATTATGCCTTTTTTCTGACTCCA
GCAGAGAGAAAATGCTCCAGGTATGTGAAGCAGAATCATCATTTAAATATGAGTC
AGGGCTCTTTGTACAAGGCCTGCTAAAGGTATAGTTTCTAGTTATCACAAGTGAAAC
CACTTTTCTAAAATCATTTTTGAGACTCTTATAGACAAATCTTAAATATTAGCATT
AATGTATCTCATATTGACATGCCAGAGACTGACTTCCTTTACACAGTTCTGCACAT
AGACTATATGTCTTATGGATTTATAGTTAGTATCATCAGTGAAACACCATAGAATAC
CCTTTGTGTTCCAGGTGGGTCCCTGTTCCCTACATGTCTAGCCTCAGGACTTTTTTTTT
TTAACACATGCTTAAATCAGGTTGCACATCAAAAATAAGATCATTTCTTTTTAACTA
AATAGATTTGAATTTTATTGAAAAAAAATTTTAAACATCTTTAAGAAGCTTATAGGA
TTTAAGCAATTCCTATGTATGTGTACTAAAATATATATATTTCTATATATAATATATA
TTAGAAAAAAATTGTATTTTTCTTTTATTTGAGTCTACTGTCAAGGAGCAAAACAGA
GAAATGTAAATTAGCAATTATTTATAATACTTAAAGGGAAGAAAGTTGTTACCTTG
TTGAATCTATTATTGTTATTTCAATTATAGTCCCAAGACGTGAAGAAATAGCTTTCCT
AATGGTTATGTGATTGTCTCATAGTGACTACTTTCTTGAGGATGTAGCCACGGCAA
ATGAAATAAAAAAATTTAAAATTTGTTGCAAATACAAGTTATATTAGGCTTTTGTGC
ATTTTCAATAATGTGCTGCTATGAACTCAGAATGATAGTATTTAAATATAGAACTA
GTAAAGGAAACGTAGTTTCTATTTGAGTTATACATATCTGTAAATTAGAACTTCTC
CTGTTAAAGGCATAATAAAGTGCTTAATACTTTTGTTCCTCAGCACCCCTCTCATTTA
ATTATATAATTTTAGTTCTGAAAGGGACCTATAACCAGATGCCTAGAGGAAATTTCAA
AACTATGATCTAATGAAAAAATTTAATAGTTCTCCATGCAAATACAAATCATATA
GTTTTCCAGAAAATACCTTTGACATTATACAAAGATGATTATCACAGCATTATAATA
GTAAAAAATGGAAATAGCCTCTTTCTTCTGTTCTGTTTCATAGCACAGTGCCTCATA
CGCAGTAGGTTATTATTACATGGTAACTGGCTACCCCAACTGATTAGGAAAGAAGTA
AATTTGTTTTATAAAAATACATACTCATTGAGGTGCATAGAATAATTAAGAAATTA
AAGACACTTGTAATTTTGAATCCAGTGAATACCCACTGTTAATATTTGGTATATCTCT
TTCTAGTCTTTTTTTCCCTTTTGCATGTATTTTCTTTAAGACTCCCACCCCACTGGAT
CATCTCTGCATGTTCTAATCTGCTTTTTTTCACAGCAGATTCTAAGCCTCTTTGAATAT
CAACACAACTTCAACAACCTCATCTATAGATGCCAAATAATAAATTCATTTTTATT
TACTTAACCACTTCCCTTTGGATGCTTAGGTCATTCTGATGTTTTGCTATTGAAACCAA
TGCTATACTGAACACTTCTGTCACTAAAACCTTTGCACACACTCATGAATAGCTTCTTA
GGATAAATTTTTAGAGATGGATTTGCTAAATCAGAGACCATTTTTTAAAATTA
ACAATTATTCATATCGTTTGGCATGTAAGACAGTAAATTTTCTTTTATTTTGCAGG
ATTCAACTGGAAGCTTTGTGCTGCCTTTCCGGCAAGTCATGTATGCTCCATATCCCAC
CACACACATAGATGTGGATGTCAATACTGTGAAGCAGATGCCACCCTGTCATGAAC
ATATTTATAATCAGCGTAGATACATGAGATCCGAGCTGACAGCCTTCTGGAGAGCCA
CTTCAGAAGAAGACATGGCTCAGGATACGATCATCTACACTGACGAAAGCTTTACTC

CTGATTTGTACGTAATGCTCTGCCTGCTGGTACTGTAGTCAAGCAATATGAAATTGT
GTCTTTTACGAATAAAAACAAAACAGAAGTTGCATTTAAAAAGAAAGAAATATTAC
CAGCAGAATTATGCTTGAAGAAACATTTAATCAAGCATTTTTTTCTTAAATGTTCTTC
TTTTTCCATAACAATTGTGTTTACCCTAAAATAGGTAAGATTAACCCTTAAAGTAAAT
ATTTAACTATTTGTTTAAATAAATATATATTGAGCTCCTAGGCACTGTTCTAGGTACCG
GGCTTAATAGTGGCCAACCAGACAGCCCCAGCCCCAGCCCCCTACATTGTGTATAGTC
TATTATGTAACAGTTATTGAATGGACTTATTAACAAAACCAAAGAAGTAATTCTAAG
TCTTTTTTTTTCTTGACATATGAATATAAAATACAGCAAAACTGTTAAAATATATTAAT
GGAACATTTTTTTACTTTGCATTTTATATTGTTATTCACTTCTTATTTTTTTTTAAAA
AAAAAGCCTGAACAGTAAATTCAAAAGGAAAAGTAATGATAATTAATTGTTGAGCA
TGGACCCAACCTGAAAAAAAATGATGATGATAAATCTATAATCCTAAAACCTA
AGTAAACACTTAAAAGATGTTCTGAAATCAGGAAAAGAATTATAGTATACTTTTGTG
TTTCTCTTTTATCAGTTGAAAAAAGGCACAGTAGCTCATGCCTGTAAGAACAGAGCT
TTGGGAGTGCAAGGCAGGCGGATCACTTGAGGCCAGGAGTTCAGACCAGCCTGGG
CAACATAGTGAAACCCCATCTCTACAAAAAATAAAAAAGAATTATTGGAATGTGTT
TCTGTGTGCCTGTAATCCTAGCTATTCCGAAAGCTGAGGCAGGAGGATCTTTTGAGC
CCAGGAGTTTGAGGTTACAGGGAGTTATGATGTGCCAGTGTACTCCAGCCTGGGGA
ACACCGAGACTCTGTCTTATTTAAAAAAAATGCTTGAATAATGC
CTGGCACATAGAAGGTAACAGTAAGTGTTAACTGTAATAACCCAGGTCTAAGTGTG
TAAGGCAATAGAAAAATTGGGGCAAATAAGCCTGACCTATGTATCTACAGAATCAG
TTTGAGCTTAGGTAACAGACCTGTGGAGCACCAGTAATTACACAGTAAGTGTTAACC
AAAAGCATAGAATAGGAATATCTTGTTCAAGGGACCCCCAGCCTTATACATCTCAA
GGTGCAGAAAGATGACTTAATATAGGACCCATTTTTTCTAGTTCTCCAGAGTTTTT
ATTGGTTCTTGAGAAAGTAGTAGGGGAATGTTTTAGAAAATGAATTGGTCCAACCTGA
AATTACATGTCAGTAAGTTTTTATATATTGGTAAATTTTAGTAGACATGTAGAAGTTT
TCTAATTAATCTGTGCCTTGAAACATTTTCTTTTTTCTAAAGTGCTTAGTATTTTTTC
CGTTTTTTGATTGGTACTTGGGAGCTTTTTTGAGGAAATTTAGTGAAGTGCAGAATG
GGTTTGCAACCATTTGGTATTTTTGTTTTGTTTTTAGAGGATGTATGTGTATTTAAC
ATTTCTAATCATTTTTAGCCAGCTATGTTTGTGTTTGTGATTGACAAACTACAGTT
AGACAGCTATTCTATTTGCTGATCATGACAAAATAATATCCTGAATTTTTAAATTT
TGCATCCAGCTCTAAATTTTCTAAACATAAAATTGTCCAAAAAATAGTATTTTCAGC
CACTAGATTGTGTGTTAAGTCTATTGTCACAGAGTCATTTTACTTTTAAGTATATGTT
TTTACATGTTAATTATGTTTGTATTTTTAATTTTAACTTTTTAAATAATTCCAGTCA
CTGCCAATACATGAAAAATTGGTCACTGGAATTTTTTTTTTACTTTTATTTTAGGTT
CATGTGTACATGTGCAGGTGTGTTATACAGGTAATTGCGTGTGCATGAGGGTTTGGT
GTACAGGTGATTTCAATACCAGGTAATAAGCATAGTACCCAATAGGTAGTTTTTTG
ATCCTCACCTTCTCCCACCCTCAAGTAGGCCCTGGTGTGCTGTTTCTTCTTTGTG
TCCATGTATACTCAGTGTTTAGCTCCCCTTAGAAGTGAGAACATGCGGTAGTTGGT
TTTCTGTTCTGGATTAGTTCACTTAGGATAATGACCTCTAGCTCCATCTGGTTTTTA
TGGCTGCATAGTATTCCATGGTGTATATGTATCACATTTTCTTTATCCAGTCTACCAT

TGATAGGCATTTAGGTTGATTCCCTGTCTTTGTTATCATGAATAGTGCTGTGATGAAC
ATACACATGCATGTGTCTTTATGGTAGAAAAATTTGTATTCCTTTAGGTACATATAG
ATAAATGGGGTTGCTAGGGTGAATGGTAGTTCTATTTTCAGTTATTTGAGAAATCTT
CAAACCTGCTTTTCATAATAGCTAAACTAATTTACAGTCCCGCCAGCAGTGTATAAGT
GTTCCCTTTTCTCCACAACCTTGCCAACATCTGTGATTTTTTTGACTTTTTAATAATAG
CCATTCCTAGAGAATTGATTTGCAATTCTCTATTAGTGATATTAAGCATTTTTTTCATA
TGCTTTTTAGCTGTCTGTATATATTCTTCTGAAAAATTTTCATGTCCTTTGCCAGTTT
GTAGTGGGGTGGGTTGTTTTTTGCTTGTTAATTAGTTTTAAGTTCCTTCCAGATTCTG
CATATCCCTTTGTTGGATACATGGTTTGCAGATATTTTTCTCCATTGTGTAGGTTGT
CTTTTACTCTGTTGATAGTTTCTTTTGCCATGCAGGAGCTCGTTAGGTCCCATTTGTG
TTTTTTTTGTTGCAGTTGCTTTTGGCGTCTTCATCATAAAATCTGTGCCAGGGCCTA
TGTCAGAATGGTATTTCTAGGTTGTCTTCCAGGGTTTTTACAATTTTAGATTTTAC
GTTTATGTCTTTAATCCATCTTGAGTTGATTTTTGTATATGGCACAAAGGAAGGGGTCC
AGTTTCACTCCAATTCCTATGGCTAGCAATTATCCAGCACCATTTATTGAATACGG
AGTCCTTTCCCATTGCTTGTTTTTTGTCAACTTTGTTGAAGATCAGATGGTTGTAAG
TGTGTGGCTTTATTTCTTGGCTCTCTATTCTCCATTGGTCTATGTGTCTGTTTTATAA
CAGTACCCTGCTGTTCAAGTTCCTATAGCCTTTTAGTATAAAATCGGCTAATGTGAT
GCCTCCAGCTTTGTTCTTTTTGCTTAGGATTGCTTTGGCTATTTGGGCTCCTTTTTGGG
TCCATATTAATTTTAAAACAGTTTTTTCTGGTTTTGTGAAGGATATCATTGGTAGTTT
ATAGGAATAGCATTGAATCTGTAGATTGCTTTGGGCAGTATGGCCATTTTAAACAATA
TTAATTCTTCTATCTATGAATATGGAATGTTTTTCCATGTGTTTGTGTCTCTCTTTA
TACCTGATGTATAAAGAAAAGCTGGTATTATTCCTACTCAATCTGTTCCAAAAAATT
GAGGAGGAGGAACCTTCCCTAATGAGGCCAGCATCTTCTGATACCAAAAACCTGG
CAGAGACACAACAGAAAAAAGAAAACCTCAGGCCAATATCCTTGATGAATATAGAT
GCAAAAATCCTCAACAAAATACTAGCAAACCAATCCAGCAGCACATCAAAAAGCT
GATCTACTTTGATCAAGTAGGCTTTATCCCTGGGATGCAAGGTTGGTTCAACATACA
CAAATCAATAAGTGTGATTCATCACATAAACAGAGCTAAAAACAAAAACCACAAGA
TTATCTCAATAGGTAGAGAAAAGGTTGTCAATAAAATTTAACATCCTCCATGTTAAA
AACCTTCAGTAGGTCAGGTGTAGTGACTCACACCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGG
CCAAGGCGGGCATATCTCTTAAGCCAGGAGTTCAAGACGAGCCTAGGCAGCATGG
TGAAACCCCATCTCTACAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTAGCTTGGTATGGTGAC
ATGCACCTATAGTCCAGCTATTCAGGAGGTTGAGGTGGGAGGATTGTTTGAGCCCG
GGAGGCAGAGGTTGGCAGCGAGCTGAGATCATGCCACCGCACTCCAGCCTGGGCAA
CGGAGTGAGACCCTGTCTCAAAAAAGAAAAATCACAAACAATCCTAAACAAACTAG
GCATTGAAGGAACATGCCTCAAAAAATAAGAACCATCTATGACAGACCCATAGCC
AATATCTTACCAAATGGGCAAAAGCTGGAAGTATTCTCCTTGAGAACCGTAACAAG
ACAAGGATGTCCACTCTCACCCTCCTTTTCAGCATAGTTCTGGAAGTCTTAGCCAG
AGCAATCAGGAAAGAGAAAGAAAGAAAGACATTCAGATAGGAAGAGAAGAAGTCA
AACTATTTCTGTTTGCAGGCAGTATAATTCTGTACCTAGAAAATCTCATAGTCTCTGC
CCAGAAACTCCTAAATCTGTTAAAAATTTAGCAAAGTTTTGGCATTCTCTATACTC

CAACACCTTCCAAAGTGAGAGCAAAATCAAGAACACAGTCCCATTACAAATAGCCG
CAAAACGAATAAAATACCTAGGAATCCAGCTAACCAGGGAGGTGAAAGATCTCTAT
GAGAATTACAAAACACTGCTGAAAGAAATCAGAGATGACACAAAACAAATGGAAAT
GTTCTTTTTTAAACACCTTGCTTTATCTAATTCACTTATGATGAAGATACTCATTAGT
GGAACAGGTATAATAAGTCCACTCGATTAATATAAGCCTTATTCTCTTTCCAGAGC
CCAAGAAGGGGCACTATCAGTGCCCAGTCAATAATGACGAAATGCTAATATTTTTCC
CCTTTACGGTTTCTTTCTTCTGTAGTGTGGTACACTCGTTTCTTAAGATAAGGAACT
TGAACCTACCTTCTGTTTGCTTCTACACATACCCATTCTCTTTTTTTGCCACTCTGGTC
AGGTATAGGATGATCCCTACCACTTTCAGTTAAAACTCCTCCTCTTACTAAATGTTT
TCTTACCCTCTGGCCTGAGTAGAACCTAGGGAAAATGGAAGAGAAAAAGATGAAAG
GGAGGTGGGGCCTGGGAAGGGAATAAGTAGTCTGTTTGTGTTGTGTTTGTCTTAG
CACCTGCTATATCCTAGGTGCTGTGTTAGGCACACATTATTTAAGTGGCCATTATAT
TACTACTACTACTCTGGTCTGTTGCCAAGGTAGGTAGTACTTTCTTGGATAGTTGGTT
CATGTTACTTACAGATGGTGGGCTTGTGAGGCAAACCCAGTGGATAATCATCGGAG
TGTGTTCTCTAATCTCACTCAAATTTTTCTTCACATTTTTTGGTTTGTGTTTGGTTTTG
ATGGTAGTGGCTTATTTTTGTTGCTGGTTTGTGTTTTTGTGTTTTTTTTGAGATGGCAAGA
ATTGGTAGTTTTATTTATTAATTGCCTAAGGGTCTCTACTTTTTTTAAAAGATGAGAG
TAGTAAAATAGATTGATAGATACATACATACCCTTACTGGGGACTGCTTATATTCTT
TAGAGAAAAATTACATATTAGCCTGACAAACACCAGTAAAATGTAAATATATCCT
TGAGTAAATAAATGAATGTATATTTTGTGTCTCCAAATATATATATCTATATTCTTAC
AAATGTGTTTATATGTAATATCAATTTATAAGA ACTTAAAATGTTGGCTCAAGTGAG
GGATTGTGGAAGGTAGCATTATATGGCCATTTCAACATTTGAACTTTTTTCTTTTCTT
CATTTTCTTCTTTTCTTCAGGAATATTTTTCAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTAG
TGAAAGCCTTCTGGATCAGGTAAATGTTGAACTTGAGATTGTCAGAGTGAATGATA
TGACATGTTTTCTTTTTTAATATATCCTACAATGCCTGTTCTATATATTTATATTCCCC
TGGATCATGCCCCAGAGTTCTGCTCAGCAATTGCAGTTAAGTTAGTTACACTACAGT
TCTCAGAAGAGTCTGTGAGGGCATGTCAAGTGCATCATTACATTGGTTGCCTCTTGT
CCTAGATTTATGCTTCGGGAATTCAGACCTTTGTTTACAATATAATAAATATTATTGC
TATCTTTTAAAGATATAATAATAAGATATAAAGTTGACCACA ACTACTGTTTTTTGA
AACATAGAATTCTGGTTTACATGTATCAAAGTGAAATCTGACTTAGCTTTTACAGA
TATAATATATACATATATATATCCTGCAATGCTTGTACTATATATGTAGTACAAGTAT
ATATATATGTTTGTGTGTGTATATATATATAGTACGAGCATATATACATATTACCAG
CATTGTAGGATATATATATGTTTATATATTA AAAAAAAGTTATAAACTTAAAACCCT
ATTATGTTATGTAGAGTATATGTTATATATGATATGTAAAATATATAACATATACTCT
ATGATAGAGTGTAATATATTTTTTATATATATTTTAAACATTTATAAAATGATAGAATT
AAGAATTGAGTCCTAATCTGTTTTATTAGGTGCTTTTTGTAGTGTCTGGTCTTTCTAA
AGTGTCTAAATGATTTTTCTTTTACTTATTAATGGGGAAGAGCCTGTATATTAACA
ATTAAGAGTGCAGCATTCCATACGTCAAACAACAAACATTTTAATTCAAGCATTAAAC
CTATAACAAGTAAGTTTTTTTTTTTTTTTTGAGAAAGGGAGGTTGTTTATTTGCCTGA
AATGACTCAAAAATATTTTTGAAACATAGTGTACTTATTTAAATAACATCTTTATTGT

TTCATTCTTTTAAAAAATATCTACTTAATTACACAGTTGAAGGAAATCGTAGATTAT
ATGGAACTTATTTCTTAATATATTACAGTTTGTTATAATAACATTCTGGGGATCAGGC
CAGGAACTGTGTCATAGATAAAGCTTTGAAATAATGAGATCCTTATGTTTACTAGA
AATTTTGGATTGAGATCTATGAGGTCTGTGACATATTGCGAAGTTCAAGGAAAATTC
GTAGGCCTGGAATTTTCATGCTTCTCAAGCTGACATAAAATCCCTCCACTCTCCACC
TCATCATATGCACACATTCTACTCCTACCCACCCACTCCACCCCCTGCAAAAGTACA
GGTATATGAATGTCTCAAACCATAGGCTCATCTTCTAGGAGCTTCAATGTTATTTG
AAGATTTGGGCAGAAAAAATTAAGTAATACGAAATAACTTATGTATGAGTTTTAAA
AGTGAAGTAAACATGGATGTATTCTGAAGTAGAATGCAAAATTTGAATGCATTTTTA
AAGATAAATTAGAAAATTTCTAAAAACTGTCAGATTGTCTGGGCCTGGTGGCTTATG
CCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGTCCGAGGTGGGTGGATCACAAGGTCAGGAGAT
CGAGACCATCCTGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAGTATACAAAAATTAG
CTGGGCGTGGCAGCGTGTGCCTGTAATCCCAGCTACCTGGGAGGCTGAGGCAGGAG
AATCGCTTGAACCCAGGAGGTGTAGGTTGCAGTGAGTCAAGATCGCGCCACTGCAC
TTTAGCCTGGTGACAGAGCTAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCAGATT
GTTCTACACCTAGTGCTTCTATACCACACTCCTGTTAGGGGGCATCAGTGGAATG
GTTAAGGAGATGTTTAGTGTGTATTGTCTGCCAAGCACTGTCAACACTGTCATAGAA
ACTTCTGTACGAGTAGAATGTGAGCAAATTATGTGTTGAAATGGTTCCTCTCCCTGC
AGGTCTTTCAGCTGAAACCTGGCTTATCTCTCAGAAGTACTTTCCTTGCACAGTTTCT
ACTTGTCTTTCACAGAAAAGCCTTGACACTAATAAAATATATAGAAGACGATACGT
GAGTAAACTCCTACACGGAAGAAAAACCTTTGTACATTGTTTTTTTTGTTTTGTTTCC
TTTGTACATTTTCTATATCATAATTTTTGCGCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
CCATTATTTTLAGGCAGAAGGGAAAAAGCCCTTAAATCTCTTCGGAACCTGAAGA
TAGACCTTGATTTAACAGCAGAGGGCGATCTTAACATAATAATGGCTCTGGCTGAGA
AAATTAACCAGGCCTACACTCTTTTATCTTTGGAAGACCTTCTACACTAGTGTGC
AAGAACGAGATGTTCTAATGACTTTTTAAATGTGTAACCTTAATAAGCCTATTCCATC
ACAATCATGATCGCTGGTAAAGTAGCTCAGTGGTGTGGGGAAACGTTCCCCTGGATC
ATACTCCAGAATTCTGCTCTCAGCAATTGCAGTTAAGTAAGTTACACTACAGTTCTC
ACAAGAGCCTGTGAGGGGATGTCAGGTGCATCATTACATTGGGTGTCTCTTTTCCTA
GATTTATGCTTTTGGGATACAGACCTATGTTTACAATATAATAAATATTATTGCTATC
TTTTAAAGATATAATAATAGGATGTAAACTTGACCACAACACTACTGTTTTTTTGAAT
ACATGATTCATGGTTTACATGTGTCAAGGTGAAATCTGAGTTGGCTTTTACAGATAG
TTGACTTTCTATCTTTTGGCATTCTTTGGTGTGTAGAATTACTGTAATACTTCTGCAA
TCAACTGAAAACCTAGAGCCTTAAATGATTTCAATTCCACAGAAAGAAAGTGAGCTT
GAACATAGGATGAGCTTTAGAAAAGAAAATTGATCAAGCAGATGTTTAATTGGAATT
GATTATTAGATCCTACTTTGTGGATTTAGTCCCTGGGATTCAGTCTGTAGAAATGTCT
AATAGTTCTCTATAGTCCTTGTTCCTGGTGAACCACAGTTAGGGTGTTTTGTTTATTT
TATTGTTCTTGCTATTGTTGATATTCTATGTAGTTGAGCTCTGTAAAAGGAAATTGTA
TTTTATGTTTTAGTAATTGTTGCCAACTTTTTAAATTAATTTTCATTATTTTTGAGCCA
AATTGAAATGTGCACCTCCTGTGCCTTTTTTCTCCTTAGAAAATCTAATTACTTGGAA

CAAGTTCAGATTTCACTGGTCAGTCATTTTCATCTTGTTTTCTTCTTGCTAAGTCTTAC
 CATGTACCTGCTTTGGCAATCATTGCAACTCTGAGATTATAAAATGCCTTAGAGAAT
 ATACTAACTAATAAGATCTTTTTTTCAGAAACAGAAAATAGTTCCTTGAGTACTTCC
 TTCTTGCATTTCTGCCTATGTTTTTGAAGTTGTTGCTGTTTGCCTGCAATAGGCTATA
 AGGAATAGCAGGAGAAATTTACTGAAGTGCTGTTTTCTAGGTGCTACTTTGGCAG
 AGCTAAGTTATCTTTTGTCTTAATGCGTTTGGACCATTTTGTGGCTATAAAATA
 ACTGATTAATATAATTCTAACACAATGTTGACATTGTAGTTACACAAACACAAATAA
 ATATTTTATTTAAAATTCTGGAAGTAATATAAAAGGGAAAATATATTTATAAGAAAG
 GGATAAAGGTAATAGAGCCCTTCTGCCCCCACCACCAAATTTACACAACAAAAT
 GACATGTTCGAATGTGAAAGGTCATAATAGCTTTCCCATCATGAATCAGAAAGATGT
 GGACAGCTTGATGTTTTAGACAACCACTGAACTAGATGACTGTTGTACTGTAGCTCA
 GTCATTTAAAAAATATATAAATACTACCTTGTAGTGTCCATACTGTGTTTTTTACAT
 GGTAGATTCTTATTTAAGTGCTAACTGGTTATTTTCTTTGGCTGGTTTATTGTACTGTT
 ATACAGAATGTAAGTTGTACAGTGAAATAAGTTATTAAGCATGTGTAAACATTGTT
 ATATATCTTTTCTCCTAAATGGAGAATTTTGAATAAAATATATTTGAAATTTT

SEQ ID NO:14

обратнокомплементарная последовательность SEQ ID NO:13

AAAATTTCAAATATATTTTATTCAAATTTCTCCATTTAGGAGAAAAGATATATAACA
 ATGTTTACACATGCTTTAATAACTTATTTCACTGTACAACCTTACATTCTGTATAACAG
 TACAATAAACAGCCAAAGAAAATAACCAGTTAGCACTTAAATAAGAATCTACCAT
 GTAAAAAACACAGTATGGGACACTACAAGGTAGTATTTATATATTTTTTAAATGACT
 GAGCTACAGTACAACAGTCATCTAGTTCAGTGGTTGTCTAAAACATCAAGCTGTCCA
 CATCTTTCTGATTCATGATGGGAAAGCTATTATGACCTTTCACATTCGAACATGTCAT
 TTTGTTGTGTAAATTTGGTGGGTGGGGGGCAGAAGGGCTCTATTACCTTTATCCCTTT
 CTTATAAATATATTTTCCCTTTTATATTACTTCCAGAATTTTAAATAAAATATTTATTT
 GTGTTTGTGTAACACTACAATGTCAACATTGTGTTAGAATTATATTAATCAGTTATTTTA
 TAGCCAGCAAATGGTCCAAACGCATTAAGAAAACAAAAGATAACTTAGCTCTGCC
 AAAGTAGCACCTAGGAAAACAGCACTTCAGTAAAATTTCTCCTGCTATTCCCTTATAG
 CCTATTGCAGGCAAACAGCAACAACCTTCAAAAACATAGGCAGAAATGCAAGAAGG
 AAGTACTCAAGGAACCTATTTTCTGTTTCTGAAAAAAGATCTTATTAGTTAGTATAT
 TCTCTAAGGCATTTTATAATCTCAGAGTTGCAATGATTGCCAAAGCAGGTACATGGT
 AAGACTTAGCAAGAAGAAAACAAGATGAAAATGACTGACCAGTGAAATCTGAACTT
 GTTCCAAGTAATTAGATTTTCTAAGGAGAAAAAAGGCACAGGAGGTGCACATTTCA
 ATTTGGCTCAAAAATAATGAAAATTAATTTAAAAAGTTGGCAACAATTAATAAAC
 ATAAAATACAATTTCCCTTTTACAGAGCTCAACTACATAGAATATCAACAATAGCAAG
 AACAATAAAATAAACAAAACACCCTAACTGTGGTTCACCAGGAACAAGGACTATAG
 AGAACTATTAGACATTTCTACAGACTGAATCCCAGGGACTAAATCCACAAAGTAGG
 ATCTAATAATCAATTCCAATTAACATCTGCTTGATCAATTTTCTTTCTAAAGCTCAT
 CCTATGTTCAAGCTCACTTTCTTTCTGTGGAATTGAAATCATTTAAAGGCTCTAGTTT
 TCAGTTGATTGCAGAAGTATTACAGTAATTCTACACACCAAAGAATGCCAAAAGAT

AGAAAGTCAACTATCTGTAAAAGCCAACTCAGATTTACCTTGACACATGTAAACCA
TGAATCATGTATTTCAAAAAACAGTAGTTGTGGTCAAGTTTACATCCTATTATTAT
ATCTTTAAAAGATAGCAATAATATTTATTATATTGTAAACATAGGTCTGTATCCCAA
AAGCATAAATCTAGGAAAAGAGACACCCAATGTAATGATGCACCTGACATCCCCTC
ACAGGCTCTTGTGAGAACTGTAGTGTAACCTACTTAACTGCAATTGCTGAGAGCAGA
ATTCTGGAGTATGATCCAGGGGAACGTTTCCCCACACCACTGAGCTACTTTACCAGC
GATCATGATTGTGATGGAATAGGCTTATTAAGTTACACATTTAAAAAGTCATTAGAA
CATCTCGTTCTTGCACACTAGTGTAGAAAGGTCTTCCAAAGATAAAAAGAGTGTAGGC
CTGGTTTAATTTTCTCAGCCAGAGCCATTATTATGTTAAGATCGCCCTCTGCTGTTAA
ATCAAGGTCTATCTTCAGGTTCCGAAGAGATTTAAAGGGCTTTTTTCCCTTCTGCCTA
AAAATAATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGCGCAAAAATTATGAT
ATAGAAAATGTACAAAGGAAACAAAACAAAAACAATGTACAAAGGTTTTTCTTC
CGTGTAGGAGTTTTACTCACGTATCGTCTTCTATATATTTTTATTAGTGTCAAGGCTTT
TCTGTGAAGGACAAGTAGAACTGTGCAAGGAAAGTACTTCTGAGAGATAAGCCAG
GTTTCAGCTGAAAGACCTGCAGGGAGAGGAACCATTTCAACACATAATTTGCTCAC
ATTCTACTCGTACAGAAGTTTTCTATGACAGTGTTGACAGTGCTTGGCAGACAATACA
CACTAAACATCTCCTTAACCATTTCCACTGATGCCCCCTAACAGGAGTGTGGTATAG
AAGCACTAGGTGTAGGAACAATCTGATATTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTAGC
TCTGTCACCAGGCTAAAGTGCAGTGGCGCGATCTTGACTCACTGCAACCTACACCTC
CTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCAGGTAGCTGGGATTACAGGCACA
CGCTGCCACGCCAGCTAATTTTTGTATACTTAGTAGAGACGGGGTTTTACCATGTT
GGCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTTGTGATCCACCCACCTCGGACTCCCAAAGT
GCTGGGATTACAGGCATAAGCCACCAGGCCAGACAATCTGACAGTTTTTTAGAAGT
TTTTCTAATTTATCTTTAAAATGCATTCAAATTTTGCATTCTACTTCAGAATACATCC
ATGTTTACTTCACTTTTAAAACCTACACATAAGTTATTTTCGTATTACTTAATTTTTTCT
GCCCAAATCTTCAAATAACATTGAAGCTCCTAGAAGATGAGCCTATGGTTTTGAGAC
ATTCATATACTGTACTTTTGCAGGGGGTGGAGTGGGTGGGTAGGAGTAGAATGTGT
GCATATGATGAGGTGGAGAGTGGGAGGGATTTTATGTCAGCTTGAGAAGCATGAAA
TTCCAGGCCTACGAATTTTCTTGAACCTCGCAATATGTCACAGACCTCATAGATCTC
AATCCAAAATTTCTAGTAAACATAAGGATCTCATTATTTCAAAGCTTTATCTATGAC
ACAGTTTCTGGCCTGATCCCCAGAATGTTATTATAACAACTGTAATATATTAAGA
AATAAGTTCCATATAATCTACGATTTCTTCAACTGTGTAATTAAGTAGATATTTTTT
AAAAGAATGAAACAATAAAGATGTTATTTAAATAAGTACACTATGTTTCAAAAATA
TTTTTGAGTCATTTACAGGCAAATAAACAACCTCCCTTTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
CTTACTTGTTATAGGTTAATGCTTGAATTAATAATGTTTGTGTTTGACGTATGGAATG
CTGCACTCTTAATTGTTAATATACAGGCTCTTCCCATTAAATAAGTCAAAAGGAAAA
ATCATTTAGACACTTTAGAAAGACCAGACACTACAAAAGCACCTAATAAAACAGA
TTAGGACTCAATTCTTAATTCTATCATTTTATAAATGTTAAAATATATATAAAAAATA
TATTACACTCTATCATAGAGTATATGTTATATATTTTACATATCATATATAACATATA
CTCTACATAACATAATAGGGTTTTAAGTTTATAACTTTTTTTTTAATATATAAACATAT

ATATATCCTACAATGCTGGTAATATGTATATATGCTCGTACTATATATATATACACA
CACAAACATATATATATACTTGTACTACATATATAGTACAAGCATTGCAGGATATAT
ATATGTATATATTATATCTGTAAAAGCTAAGTCAGATTTCACTTTGATACATGTAAA
CCAGGAATTCTATGTTTCAAAAAACAGTAGTTGTGGTCAACTTTATATCTTATTATTA
TATCTTTAAAAGATAGCAATAATATTTATTATATTGTAAACAAAGGTCTGAATTTCC
GAAGCATAAATCTAGGACAAGAGGCAACCAATGTAATGATGCACTTGACATGCCCT
CACAGACTCTTCTGAGAACTGTAGTGTAACTAACTTAACTGCAATTGCTGAGCAGAA
CTCTGGGGCATGATCCAGGGGAATATAAATATATAGAACAGGCATTGTAGGATATA
TTAAAAAAGAAAACATGTCATATCATTCACTCTGACAATCTCAAGTTCAACATTTAC
CTGATCCAGGAAGGCTTTCACTAGAGTGTCTCTGTGTAAGACATCTTGAAAAATATT
CCTGAAGAAAAGAAGAAAATGAAGAAAAGAAAAAAGTTCAAATGTTGAAATGGCC
ATATAATGCTACCTTCCACAATCCCTCACTTGAGCCAACATTTAAGTTCTTATAAAT
TGATATTACATATAAACACATTTGTAAGAATATAGATATATATATTTGGAGACACAA
AATATACATTCATTTATTTACTCAAGGATATATTTACATTTTACTGGTGTTTGTCAGG
CTAATATGTAATTTTTTCTCTAAAGAATATAAGCAGTCCCCAGTAAGGGTATGTATG
TATCTATCAATCTATTTTACTACTCTCATCTTTTTAAAAAAGTAGAGACCCTTAGGCA
ATTAATAAATAAAACTACCAATTCTTGCCATCTCAAAAAAAAAACAAAAACAAACC
AGCAACAAAAATAAGCCACTACCATCAAAAACCAAAACAAACCAAAAAATGTGAA
GAAAAATTTGAGTGAGATTAGAGAACACACTCCGATGATTATCCACTGGGTTTGCCT
CAACAAGCCCACCATCTGTAAGTAACATGAACCAACTATCCAAGAAAGTACTACCT
ACCTTGGAACGACCAGAGTGAGTAGTAATATAATGGCCACTTAAAATAATGT
GTGCCTAACACAGCACCTAGGATATAGCAGGTGCTAAAGCAAACACACAAACAAAC
AGGACTACTTATTCCTTCCCAGGCCCCACCTCCCTTTCATCTTTTTTCTCTTCCATTTT
CCCTAGGTTCTACTCAGGCCAGAGGGTAAGAGAACATTTAGTAAGAGGAGGAGTTT
TTAACTGAAAGTGGTAGGGATCATCCTATACCTGACCAGAGTGGCAAAAAAAGAGA
ATGGGTATGTGTAGAAGCAAACAGGAAGGTAGTTCAAGTTTCTTATCTTAAGAAA
CGAGTGTACCACACTACAGAAGAAAGAAACCGTAAAGGGGAAAAATATTAGCATT
CGTCATTATTGACTGGGCACTGATAGTGCCCTTCTTGGGCTCTGGAAAGAGAATAA
GGCTTATATTTAATCGAGTGGACTTATTATACCTGTTCCACTGAATGAGTATCTTCAT
CATAAGTGAATTAGATAAAGCAAGGTGTTAAAAAAGAACATTTCCATTTGTTTGTGT
CATCTCTGATTTCTTTCAGCAGTGTTTTGTAATTCTCATAGAGATCTTTCACCTCCCT
GGTTAGCTGGATTCCTAGGTATTTTATTCGTTTTGCGGCTATTGTGAATGGGACTGTG
TTCTTGATTTTGCTCTCACTTTGGAAGGTGTTGGAGTATAGAGAATGCCAAAACCTT
GCTGAAATTTTAAACAGATTTAGGAGTTTCTGGGCAGAGACTATGAGATTTTCTAGG
TACAGAATTATACTGCCTGCAAACAGAAATAGTTTGACTTCTTCTCTCCTATCTGAA
TGTCTTTCTTTCTTTCTTTTCTGATTGCTCTGGCTAGGACTTCCAGAACTATGCTGA
AAAGGAGTGGTGAGAGTGGACATCCTTGTCTTGTTACGGTTCTCAAGGAGAATACTT
CCAGCTTTTGCCATTTGGTAAGATATTGGCTATGGGTCTGTCATAGATGGTTCTTAT
TTTTTTGAGGCATGTTCCCTTCAATGCCTAGTTTGTGTTAGGATTGTTTGTGATTTTTCTT
TTTTGAGACAGGGTCTCACTCCGTTGCCAGGCTGGAGTGCGGTGGCATGATCTCAG

CTCGCTGCCAACCTCTGCCTCCCGGGCTCAAACAATCCTCCCACCTCAACCTCCTGA
ATAGCTGGGACTATAGGTGCATGTCACCATACCAAGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTGTAGAGATGGGGTTTCACCATGCTGCCTAGGCTCGTCTTGAACCTCTGGGCTTA
AGAGATATGCCCCGCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGTCACTAC
ACCTGACCTACTGAAGGTTTTTAACATGGAGGATGTTAAATTTTATTGACAACCTTTT
CTCTACCTATTGAGATAATCTTGTGGTTTTTTGTTTTTAGCTCTGTTTATGTGATGAATC
ACACTTATTGATTTGTGTATGTTGAACCAACCTTGCATCCCAGGGATAAAGCCTACT
TGATCAAAGTAGATCAGCTTTTTGATGTGCTGCTGGATTTGGTTTGCTAGTATTTTGT
TGAGGATTTTTGCATCTATATTCATCAAGGATATTGGCCTGAAGTTTTCTTTTTCTG
TTGTGTCTCTGCCAGGTTTTGGTATCAGAATGATGCTGGCCTCATTAGGGAAGAGTT
CCTCCTCCTCAATTTTTTGAACAGATTGAGTAGGAATAATACCAGCTTTTCTTTATA
CATCAGGTATAAAGAGATGACACAAACACATGGAAAAACATTCCATATTCATAGAT
AGGAAGAATTAATATTGTTAAAATGGCCATACTGCCCAAAGCAATCTACAGATTCA
ATGCTATTCCTATAAACTACCAATGATATCCTTCACAAAACCAGAAAAAACTGTTTT
AAAATTAATATGGACCCAAAAAGGAGCCCAAATAGCCAAAGCAATCCTAAGCAA
AAGAACAAAGCTGGAGGCATCACATTAGCCGATTTTATACTAAAAGGCTATAGGAA
CCTGAACAGCAGGGTACTGTTATAAAAACAGACACATAGACCAATGGAGAATAGAG
AGCCAAGAAATAAAGCCACACACTTACAACCATCTGATCTTCAACAAAGTTGACAA
AAAACAAGCAATGGGGAAAGGACTCCGTATTCAATAAATGGTGCTGGGATAATTGC
TAGCCATAGGAATTGGAGTGAACTGGACCCCTTCTTGTGCCATATACAAAAATCA
ACTCAAGATGGATTAAGACATAAACGTAAAATCTAAAATTGTAAAAACCCTGGAA
GACAACCTAGGAAATACCATTCTGGACATAGGCCCTGGCACAGATTTTATGATGAA
GACGCCAAAAGCAACTGCAACAAAAACAAACACAAATGGGACCTAACGAGCTCCT
GCATGGCAAAGAACTATCAACAGAGTAAAAGACAACCTACACAATGGGAGAAA
AATATCTGCAAACCATGTATCCAACAAAGGGATATGCAGAATCTGGAAGGAACTTA
AACTAATTAACAAGCAAAAAACAACCCACCCCACTACAACTGGGCAAAGGACAT
GAAAATTTTTTCAGAAGAATATATACAGACAGCTAAAAGCATATGAAAAAATGCTT
AATATCACTAATAGAGAATTGCAAATCAATTCTCTAGGAATGGCTATTATTA AAAAG
TCAAAAAATCACAGATGTTGGCAAGGTTGTGGAGAAAAGGGAACACTTATACACTG
CTGGCGGGACTGTAAATTAGTTTAGCTATTATGAAAAGCAGTTTGAAGATTTCTCAA
ATAACTGAAAATAGA ACTACCATTACCCCTAGCAACCCATTATTCTATATGTACCT
AAAGGAATACAAATTTTTCTACCATAAAGACACATGCATGTGTATGTTTCATCACAGC
ACTATTCATGATAACAAAGACAGGGAATCAACCTAAATGCCTATCAATGGTAGACT
GGATAAAGAAAATGTGATACATATACACCATGGAATACTATGCAGCCATAAAAACC
AGATGGAGCTAGAGGTCATTATCCTAAGTGA ACTAATCCAGGAACAGAAAACCAAC
TACCGCATGTTCTCACTTCTAAGTGGGAGCTAAACACTGAGTATACATGGACACAAA
GAAGGAAACAGCAACACCAGGGCCTACTTGAGGGTGGGAGAAGGGTGAGGATCAA
AAA ACTACCTATTGGGTACTATGCTTATTACCTGGGTAATGAAATCACCTGTACACC
AAACCCTCATGACACGCAATTTACCTGTATAACACACCTGCACATGTACACATGAAC
CTAAAATAAAAGTCAAAAAAAAATTCCAGTGACCAATTTTTTCATGTATTGGCAGTG

ACTGGAATTATTTTAAAAAGTTAAAATTA AAAATAACAAACATAATTAACATGTAA
AAACATATACTTAAAAGTAAAATGACTCTGTGACAATAGACTTAACACACAATCTA
GTGGCTGAAAATACTATTTTTTGGACAATTTTATGTTTAGAAAATTTAGAGCTGGAT
GCAAATTTAAAAATTCAGGATATTATTTTGT CATGATCAGCAAATGAGAATAGCT
GTCTAACTGTAGTTTGTCAAATCAGCAAACAAACATAGCTGGCTAAAAATGATTA
AGAAATGTTAAAATACACATACATCCTCTAAAAAACAAAACAAAAATACCAAATGG
TTGCAAACCCATTCTGCAGTTCACTAAATTTCTCAAAAAAGCTCCCAAGTAACCAA
TCAAAAAACGGAAAAAATACTAAGCACTTTAGGAAAAAAGAAAATGTTTCAAGGCA
CAGATTAATTAGAAACTTCTACATGTCTACTAAAATTTACCAATATATAAAAACTT
ACTGACATGTAATTTAGTTGGACCAATTCATTTTCTAAAACATTCCCCTACTACTTT
CTCAAGAACCAATAAAAACTCTGGAGA ACTAGGAAAAAATGGGTCCTATATTAAGT
CATCTTTCTGCACCTTGAGATGTATAAGGCTGGGGGTCCCTTGAACAAGATATTCCT
ATTCTATGCTTTTGGTTAACACTTACTGTGTAATTACTGGTGCTCCACAGGTCTGTTA
CCTAAGCTCAA ACTGATTCTGTAGATACATAGGTCAGGCTTATTTGCCCAATTTTTT
TATTGCCTTACACACTTAGACCTGGGTTATTACAGTTAACACTTACTGTTACCTTCTA
TGTGCCAGGCATTATTGCAAGCATTTTTTTTTTTTTTTTTTAAATAAGACAGAGTCT
CGGTGTTCCCCAGGCTGGAGTACACTGGCACATCATAACTCCCTGTAACCTCAA ACT
CCTGGGCTCAAAGATCCTCCTGCCTCAGCTTTCGGAATAGCTAGGATTACAGGCAC
ACAGAAACACATTCCAATAATTCTTTTTTATTTTTTGTAGAGATGGGGTTTCACTATG
TTGCCAGGCTGGTCTGGA ACTCCTGGCCTCAAGTGATCCGCCTGCCTTGC ACTCCC
AAAGCTCTGTTCTTACAGGCATGAGCTACTGTGCCTTTTTTCAACTGATAAAAGAGA
AACACAAAAGTATACTATAATTCTTTTCTGATTT CAGAACATCTTTTAAGTGTTTAC
TTAGGGTTTTAGGATTATAGATTTATCATCATCATTTTTTTTTTTTCAAGTTGGGTCCAT
GCTCAACAATTAATTATCATTACTTTTCTTTTGAATTTACTGTT CAGGCTTTTTTTTT
TAAAAAAAATAAGAAGTGAATAACAATATAAAATGCAAAGTAAAAAAATGTTCC
ATTAATATATTTTAAACAGTTTTGCTGTATTTTATATTCATATGTCAAGAAAAAAAAG
ACTTAGAATTACTTCTTTGGTTTTGTTAATAAGTCCATTCAATAACTGTTACATAATA
GACTATACACAATGTAGGGGCTGGGGCTGGGGCTGTCTGGTTGGCCACTATTAAGCC
CGGTACCTAGAACAGTGCCTAGGAGCTCAATATATATTTATTAACAAATAGTTAAA
TATTTACTTTAAGGGTTAATCTTACCTATTTTAGGGTAAACACAATTGTATGGAAAA
AGAAGAACATTTAAGAAAAAAATGCTTGATTAAATGTTTCTTCAAGCATAATTCTGC
TGGTAATATTTCTTTCTTTTAAATGCAACTTCTGTTTTGTTTTTATTCGTAAAAGACA
CAATTCATATTGCTTGACTACAGTACCAGCAGGCAGAGCATTACGTACAAATCAGG
AGTAAAGCTTTCGTCAGTGTAGATGATCGTATCCTGAGCCATGTCTTCTTCTGAAGT
GGCTCTCCAGAAGGCTGTCAGCTCGGATCTCATGTATCTACGCTGATTATAAATATG
TTCATGACAGGGTGGCATCTGCTTACAGTATTGACATCCACATCTATGTGTGTGGT
GGGATATGGAGCATA CATGACTTGCCGAAAGGCAGCACAAAGCTTCCAGTTGAAT
CCTGTCAAATAAAAAGGAAAATTTACTGTCTTACATGCCAAACGATATGAATAATTG
TTTTTTAATTTTAAAAAATGGTCTCTGATTTAGCAAATCCATCTCTAAAAATTTATCC
TAAGAAGCTATTCATGAGTGTGTGCAAAGTTTTAGTGACAGAAGTGTT CAGTATAGC

ATTGGTTTCAATAGCAAAACATCAGAATGACCTAAGCATCCAAAGGAAGTGGTTAA
GTAATAAAAAATGAATTTATTATTTGGCATCTATAGATGAAGTTGTTGAAGTTTGTG
TTGATATTCAAAGAGGCTTAGAATCTGCTGTGAAAAAAGCAGATTAGAACATGCAG
AGATGATCCAGTGGGGGTGGGAGTCTTAAAGAAAATACATGCAAAAGGGAAAAAA
AGACTAGAAAGAGATATACCAAATATTAACAGTGGGTATTCACTGGATTCAAATT
ACAAGTGTCTTTAATTTCTTAATTATTCTATGCACCTCAATGAGTATGTATTTTTAT
AAAACAAATTTACTTCTTTCCTAATCAGTTGGGGTAGCCAGTTACCATGTAATAATA
ACCTACTGCGTATGAGGCACTGTGCTATGAACAGAACAGAAGAAAGAGGCTATTC
CATTTTTTTACTATTATAATGCTGTGATAATCATCTTTGTATAATGTCAAAGGTATTT
TCTGGAAAACATATGATTTGTATTTGCATGGAGAACTATTAATATTTTTTTCATTAG
ATCATAGTTTTTGAAATTTCTCTAGGCATCTGGTATAGGTCCCTTTCAGAACTAAAAT
TATATAATTAATGAGAGGGTGCTGAGGAAACAAAAGTATTAAGCACTTTATTATG
CCTTTAACAGGAGAAGTTCTAATTTACAGATATGTATAACTCAAATAGAACTACGT
TTCCTTTAACTAGTTTCTATATTTAAATACTATCATTCTGAGTTCATAGCAGCACATT
ATTGAAAATGCACAAAAGCCTAATATAACTTGTATTTGCAACAATTTTTAAATTTTTT
TATTTCATTTTGCCGTGGCTACATCCTCAAGAAAGTAGTCACTATGAGACAATCACA
TAACCATTAGGAAAGCTATTTCTTCACGTCTTGGGACTATAATTGAAATAACAATAA
TAGATTCAACAAGGTGAACAACCTTTCTTCCCTTTAAGTATTATAAATAATTGCTAATT
TACATTTCTCTGTTTTGCTCCTTGACAGTAGACTCAAATAAAAGAAAAATAACAATTT
TTTTCTAATATATATTATATATAGAAATATATATATTTTTAGTACACATACATAGGAAT
TGCTTAAATCCTATAAGCTTCTTAAAGATGTTTAAAATTTTTTTTCAATAAAATTCAA
ATCTATTTAGTTAAAAAGAAATGATCTTATTTTTGATGTGCAACCTGATTTAAGCAT
GTGTTAAAAAAGAGCCTGAGGCTAGACATGTAGGAACAGGGACCCACCTGG
AACACAAAGGGTATTCTATGGTGTTCCTGATGATACTAACTATAAATCCATAAGA
CATATAGTCTATGTGCAGAACTGTGTAAAGGAAGTCAGTCTCTGGGCATGTCAATAT
GAGATACATTAATGCTAATATTTAAGATTTGTCTATAAAGAGTCTCAAAAATGATT
TTAGAAAAGTGGTTTCACTTGTGATAACTAGAACTATACCTTTAGCAGGCCTTGTA
CAAAGAGCCCTGACTCATATTTAAATGATGATTCTGCTTACATAACCTGGAGCATT
TTCTCTCTGCTGGAGTCAGAAAAAGGCATAATGTTCTGACTATCTATAAAAGAAAAT
ATTTTAGCATTAAAACATGAAGTAAAAAGACCACTGATTTGCTTATGAAAGATATCT
GAAATTTAATTGTTATTATCAATAAAACATATCCTAAGAAATAAGTATTCTTTAGT
CACCTGGAATCCATGGGATGTAACAGTTGTTGCTTAAAATAGGGATTCTGTGGTCAA
ATAAATTTAGAAAATGCTTGGTAAATTTACTGTATGGCATCTCAAACCTTTAACAT
TTGGCTACATACTGTGACTCTTCAGGTGAATTATATCATCTGCAGACTTTCTCAGACT
TATTTGACCATGCAACTTTTATAGCTTCTGTTTAGTGGGTCTACACATGAAATTCGTT
GTAAGAAATATCAAAGAATGTCCAGATCCTCCAAAAAGAAGAGAATTAATTATTGA
ATTTGATTTAAAATAAGCAGGTCATTGGGTGGGATTTAGAAATCTGATTCTAATAAT
ATTTGACCTACAGCTCTATTAGGAAAAATAAAAAGGCATGTAACCTATCTTGAAATTC
AAACCATATCCACAGTTATTATGTTAAAGGAGTGGTTTTCAACCTAGAGTGGTGGCA
ACTTCTTTCTCAAATTAACAAGATAAAAGGTAAGCTATTCTCCCTCAAGAGGATG

GAGGATGGGAAAAATGTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAACTCCAACCTATGGAGCCTT
TCTCCCTTCATAAAGCAGCTCGGCAGTCACTCTGTGCAACCTAAGGCTTTGGAGATC
ACAGATGGAAAGCCACCTGTTTGAGGTAACAGAAGGAATAAGGTCCTAGTTCGTA
GATGCAATATAATGACACAGGTATACTAAGCTCTCATAAATGGTTATATGAGAAAT
ATAAATTAAGGCTCATGTAAATATACAAAGTAGCTGATTACAAAAAAAAAATTATGA
ATATCTTTGTAAAGTATCATTTCACACATATTTCTATGTAAAACCTTTTTTAAAAAA
TTAGGTTTGCTGAAATTGAAAGATACACATACTTATCTCTGAACTCTTTCTAACTAAT
GGTCAGTGAAGAAAAGTGCAAAATCCTTTAGTTTATTAGCTAATGCTTGGAAATGTA
ACTGTTCAATTAATCCTTAATTAACTCAAGTAGCACTGAAGGAAAGGGTCAGAAACAT
TACTGAATAAAGTATAATAATCAATGACCACTTAATCCCAATAGCTCCCTAGAAGGG
ACAGATTTAGAAGGAAAGCGAAGACAATGAAATCAAGATGAATAAACAAATAACA
TTTCTTTGGAACACTACTACAAAAGTACATGACTATCTTCAGATTTGTAAAGATAAC
ATTGGGAAATAGAAGAGTAATTTTTTTTATATATCTGATTTTAATATATTCTCAAAC
CATTTATACACTACTGACACTGGTATTTCCGAGCTATCAAATAAACTGATAAATGA
TTCTTACTCAGTTTATTTCAAACACTGTTGCCACAAGGTGTCTTAGCAATTTGATG
AGATTACATTGCCTCCTTATACTACTAGATCATTTTAATTGCAACCTACCATTTAAAT
GACAATCCATGATATATCATCAGTCTTAAAGAGTCAAATCATTGCTAGATTATAAA
ATAAACTACCTTATTTACTTTCTCTGCACTGCTACCTACTACAACGGAACAGCCACA
GGTTTGCAAGTGTGAGCTGATGGCACTGTAAGTTAAAGAAAACAGATTA AAAACAT
TGCCTATAAAACAATTTAACAACTAAAAACAAAAAAAAGTAGGTGAGCTCTTCAA
ATAACTCAGAATAGCTTTATATGATAAACACCGAAGCTATAAGCACAATGTTATCTT
TTATTTGTATAGGAACCTACATTTTCTAGAGACCTTTCACAGAAATTTTCTTATTGAG
CCTTAAAACAGCCCAATTAGTCAGTATAATATCATTTAATTAATGTATTTATTTATTG
AAATACCATCATTTTATAGCTGAAGAAATTGACATGTAGAGAGATTAAGTGACTTAC
TTAAAGTCAAATGGGATTTAAAATGATGTATGAAAGGCTGCACTGAACAGATACA
GGACTAAAGTGCTTCTGATTCAAGCCATTAAGGCTCTTAGGTAAACACACTCATGC
CTCTGATACTCCATCATGAGCCTAAAGGAAAAGACTGTGAACATAAAAGTGAATAC
TTTATACTTTTACTTCTCTTTTATTA AAAAGTAAAATTTTATGAAAATCTGTAACCTGTG
AAGAACTTTAAAACAGAATATAAGATAATACATGTAAAGCAACTAGTAAAGGAAC
TAACATGTAGGCACTCAACAAATACTGGCTATTTCTAGAAGAAATGTAATAGGAA
ATGTTAGCTATGAGCTATTATTAAGTGTTTTTTATGTTCCAGGCACTGTTCTAAGTGCT
TTATATTATTTATCTTACTCAATGCTTATAACAACCCTACACATTAGGTACTATTACT
ATTATTGCCATTTTACAGATGAGGAAATAGGTGTATAGAGAATTCAGGCACCTTGCC
CACGGGTACACAGCATTAAATCCAGGGAGTCTGGTTTAAAGGGCACAACTCTTAAGT
ACTAACTCCACTGCTGGATGGAAAAAGATCAGTATAAATATGAATAATTTTGTCTT
ACGCCTAAATAACTTAAGTTCATCTACAGTACA ACTTAATATGAAAGGATTCTGTTA
GCTTTAATGAGAAGTAAAACAAGAAACCAGAATCAAGCAAGGGGCCATGATTTCTT
GTCTGGGATGGAACTCGGTTTCTTTAAATAGCAAATGGAATAACACCAAATATATA
TAGAAATATAATGAGTGAAAAATAACACAAATTTAAGCAACAGTTCAAATACGTAA
TGTCCCTAGAACAATCTAAGTAGACAGTCTGTTATTTTCTTTCTTCAAATCTTGTC

TAGGTGAGCATAAGATGGTATCTGCTTCATCCAGCTTTTATGAAAAGAAAATTCTT
ACTTGAGAAGAAAGCCTTCATGACAGCTGTCACCAATATCATCATCATTGAGTACTG
TATCAGCTATCTAAAATGCATCAAAAAATAAAAAAATTAGTCTGGCTGTAACATAGT
GTTGAAATAACACTTTTAATATAACAAGTTTTTCGGAAGTCTGGATTCAATATAACACA
CTGCCTTCATTTCCGAGAATCAAGACTCCCCAAAAACAATCTCTGTGCACTACCAT
AACTTCAGAAGAACAATGTGAAAGCTGGTCAAGCAGGTAAACAATTTTTACAA
GAACAACCTCCTCTTCTGAGCTGTCAGAATCAGGAGACTAACCTAAATGACAAAATC
AGAAAACAACAAGAATAGTTTCCTAAAGGTATCTCTTAACACTCATAGTGTGTGATT
CAAAACGTCCTCAACAAATGATTAAGGAACTAAATTTGTGACTACAAGTAACTT
CCATTAATGGTTACTACTTTGGCACACAGTTTTGTTCAAAAGACACTACATTAAT
ATTAATTGCTCCTATAAAGAGCTGGGATCCTCCCCTTTTAGGAATTATAAAAGTAAT
GAAATAAACAAAATGAATTTAATTTTGTGCATCACTGATCAAAAATGCCTCTGTTTTG
CCATAAAATCCAGGATTTTGTGTGTGCTTATTTGCTAAAGTGGCTAATACTGTATGT
GAATAGTATGTATGACAAAGTCCTTACTATTAATAATTAGAATATTAATAATATACAT
ATAAATACTATAACCCCAAAAAACTCATAAAGTGTATAATTGCTCTCATTTAACTT
ACATCTATTTCTTCAGGAACACTGTGTGATTTTCATAGATGAAAGCAGTTCATTACA
GGAATCACTTCTCCAGTAAGCATTGGAATAATACTCTGACCCTGCACAATAAAGTGA
CATGAAGTGAAGAAAATCACGTAATATGAGAGAAGCTGGGCAATAAAAAATAAAA
ATAACATCAAACAATAACATTCTTTGATGAAAATACTTCGTAATTTGTTCAAACACA
GTATCAAACAAGTCTACTACATGTCTAAAGGATTTATATGCAATCCAAAGCTCACTT
TTATTCTTTCTTTTCTTTTTTTTTTTTTGAGATGGAGTTTTGCTTTCATTGCTCAGGCTG
GAGTGCAATGGCGTGATCTCAGCTCACTGCAACCTCTCCTCCCAGGTTCAAGTGACT
CTCCTGTCTCATCCTCCAAGTAGCTGGGACTATAGGTGCCGCCACCATGCCCGGCT
GATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTCGCCATGTTGGCCAGGTTGGTGTCAA
ATTTCTGACCATGCCCGGCCCTAAAGCTCACTTTTATTCTTTAGAGAGTATGGAATC
ATTGGTTTATCGTTTACTGTTACATGCAATGATTAAGTCATCATGCCTCTTTTAGAAA
AGATCTCCTTTAAAATTTGAGATAAAAAAAATTTGTTAAAGGTCATCAATATATTTT
ATATTTAAAAATGAGGAAAACCAAGCACAAAAGACTTTGAAATCCTTACCAAATA
GGTAAGGAAAACCTGAATCAATACCTAACCTCCATACTCATAAAAGTATAATCTACC
CAAATGCAAATCAAATCAGCACATATATTTAAGAATCAATAAAACAGAAAAATT
CCCTTTAGAGCTATTTCAAGATATTACTACTTATTACATCTTGAAATTGTAATTTTGA
AATTTGTAGTCTATAGAATCAAACCTGAAAATTCAGTATAACACATCACAAATGTAAA
GTGTCTCAAATATGGATGGTCCCTCATTTATTCCTACCACCACCAGTCTCATCAGTT
TTGTGACCAACTTGGTTAAGTAAATTTTTTGGAGATATAAATGAAATTGTCAAATGAC
TATGCATTTTTAGCTAAACATATTTTTTAAATCATACATTATTTAAGATGAATTTAAT
ACTAGTTGTTTTTCTCACTTATTTTATGAAATGATTTTACTCAAAGTCTTCATAAGC
ATCTTTAAGTTAGAATCTTTGTCAGACCCAGGGCCATTTTTGGAGTAACCTTAACCA
GTTTTTCAGAGCCCCATATTATTAAGTTGCTTGAGAATTTAAATGTGATGCTACTTCT
GGAAGTTTTATCCTAAGCCATATGCCCATTTGCATAATGCTGAAAGTTTTATTTAAA
AAAAACCATCCTTTAGTAACCTCCACAACCTAACTATTCCTGTTTTTAGTTTTTAAA

GTAATAATTATCATGCCTGTTTACAATTACAATTCACACATTCAATCTAACAAGAAT
AATGACTAGATCCGTGTTAAATTTCCCTCCCTGTGAAGCAATTTTATCAGATGACAG
CTACAACCTGAAGTTGTTTCAAACATAATGCATCATCCCCAACAGTATTGTTCAAAT
AAAGTCGTTGTGAGATTTGCAAGAACTCAATCAAAAAGGCAACTCCTCCTTTTCGGGA
AGAATAATTTTGGGAAAATATTTCCCTCTTAGGTTAAGCATAACATAGTATTTTCATTCA
CAGTATCTCAGACATTATCAGTATAAGTGAATGAATAGCCTCACTGAAGCTCAACAA
CACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATCCTACAGGGCTAAATACAGAAGAGGCT
CTAAAAGAAAATCTCTTAAGTTTCTATTCCCTCCTTGTACTTCCCAAACCTTGAACCTCT
CAGCAGTAAGATAACATTTTTAAGAAGAGCACTTAAAAGAGAGACCAAATTCATT
AATAGTAGTCAACTTAAGTAAAGGTTTCTGGTTTGAAAAACAAAATCCCAGTAAA
AGCAGAATTTTAGTTGGTTCTAAGTTTCCCTCAACTTGCATAAGTTTACTTAATTAGT
CTACTAATAACTAGTGGGTTAGAGGGTGCTGAAAGTTACCCCATTCCTGGGGACCCT
GCTTATTGACCAGCAAATAAGGACTGGGATTCTTTGGGTAAAGGGAAATCTTTTCTT
GTTAAGTCAGACCTTTACACAGAATAACTGTCTCTGAATTGGAAAGCTATCTACAAA
AGTACAAACATAACAATTTGGTAAAGGAGATCATTGTATTGGGTTCTGTATTATGGC
CATGTATTTTACAAGTTTTTTTTTTTTAATTACTTTTTTAAAGTATCATCTGTCTCATT
CATGCTAAAAGAAGCAAAGAAAGGCAAACAGCCATGTTTAAAATATTGGAGTTT
TACAAGGAGCATTGAGGGTCACCCACAAGAGGAAATGGAAGTAAAAGTGAAGAAC
TCTTTCTTCACTGGAGATTCTCCTTCAAAGAACTTCTCTGCTTTACAGTGAAATAGT
CTGTACTTAGTTTCCGCAGGGGAAGCCACACCCTTGTAACCATGCTTCTCAAACCTCT
TAGTGTCTGTTCCCTGAGGGGCATTCAAAGCCAAGGGATAAACATGGCACATTTTCT
AGAGGAGAGGGTAAGAAATATCACTGACAAATTTAATACTAAAATAGTTATGGAA
TAAAATGTAAATTGCATGAGTCTTAACGATACAACATAAGACTTAGAAGAAATATT
GTGTGGACCTGGGCCTACACCCAGACAGATACCTCAGGGGTACATATGCTCTCCTT
CTGTTACAGCTACTTCTAGGGAAAGGTTGAGAAAGTAGTACCTTAAAGAACATATCA
GAGACAATTTTTTTTATTTTTACTATGAACAAGTTATCCAAAATTTATTCTGGGCAA
CAGAAAAAAAAAAGGGAGCAAATATTAATTTGTAGATGCAATTACTATTTTCTTTGT
TACTGATTTAACTCTTTGGGTTTAAAGATATGGAAATCTTCCCTCAGTTTATTCTGTA
CACCTCCATAAAAGCTCCATTAAGGCTTATTCGTATGTCTCCAAGGCCTTGACAAA
TGTAGCCATCAACCTTATACAGATACATGCTGTGAGAAAAACATTTGACAGTATGCA
ATTTGCATATACCTGATCTTCCATTCTCTCTGTGCCTTCTAAGATAATCTTCTGGACA
TTTTCTTGTCTTTCCTGAGCAAGAGAAAATTTATTTAAAAAACAACCCACAACATT
TTGATACTTGCTTATTTTTCAATAGACATGTTCTTGTGTAGTAATTTAGTTCACAAGA
AAAATACTTTCTACTTTAGGGAAAAAATGGGGGCAGGGGTAGGAAATTAACCCAAC
AAATGCATGTTCTCATAAACAATACAAAATAAAAATCAAACAACCTTTATTCTGCAG
TGAAAAAAGATAACTTCACAGAAAACAGTCAATGTAACATCTGCATAGTTTCAA
AAGGAAAAGAATGACTTGCATTTTCAAATTAACATTATGATGTTGTTTAAAAGAT
TCTCCTGATTTTAAAGAGTTTCATAATGTGAGAAAAAAGGAAGTAAGCCTGCAAACAT
AGTAAAAAATTATTCTTTTAAAAGATATTATTTTCTTACTATTGGGCAAAGCCTT
TAAAACCTGGTAATGCTTAATGGACTTTCAGGTTAGTATCAAACCTGGAACACAGGAA

GGAGAATTCAATGTGTTCTTTAGATACATCAAAACTATACTGAAATGTAAATAGCAT
TATATATTCAACTACAGGATTTAGGAAAACAATAATTTCTGTAAGATTAAGGAAT
TCTCTTGGGAACCATTCCATTCAACCTCCTCATTTTATGAACCTGGGAAGTTGGCAA
AGAGGTTAAAGAGACCAAAGGCTACATGACCAACAGCTTATGAACTATTACTTTG
AACTGTTATACTTACACATAGTAGTAAGCAAAAGACAGAATTGTGCAATGAAAGGG
AAACAAAAGGTATTAGAGTCAAAGGCTCCCAAGAAGAATCCAGGGTCTAAAAGTTT
CTTTATTTGTCTAAGCTTTAGCTTTTCATCTATAATGTGGAGCTACCATTTTCGTACCTT
CCACAGTTAATATGAAGATGACAGGTATCAGACCAGATGTATTTGTATCTAATAGGG
TAAATGCAAAATAAATAACATTTATTGTTTGTATGTTCACTGCATATAATTAAAAAA
TAAGATTTATATGTACCAGAAAATAAGCTTTCAACAGATAGGTTAACATGATTAATA
AGCTGAAAAATCACTTACCTTATGCATCCATATTCTTCCTTTCCGGATTATATGTGTT
AATCTATCAACACACACTCTATGAAGTGGGAGGTAGAACTAAGTTCTGTCTGTGGA
AGTATAATTGATAGTCCATATGTGCTGCGATCCCCATTCCAGTTTCCATCAAAGATT
AATGAAACAATAATCACTCCCTTTTCAGACAAGACAAAAAACTTTACATCTATAGCA
CCACTCTCTGCATTTCCGAAGGATTTCTCCATTTAGAGTGTGGTTGGCAAGAAAAGTT
ATTTCTCCATCACTGAGAAGTACCTGTTCTGTCTTTGGAGCCCAAATGTGCCTTACTC
TAGGACCAAGAATATTGTCCCAGTAAGCAAAAGTAGCTGCTAATAAAGGTGATTTG
CCACTTAAAGCAATCTCTGTCTTGGCAACAGCTGGAGATGGCGGTGGGCAAAGAGT
CGACATCACTGCATTCCAAGTGCACATTATCCAAATGCTCCGGAGATATCTAAACA
ATGACATATGAAACCAATGATTAGGTTTCAGCAATTTAAAGATATCCATCAAACCCC
AAATGATTTAGACATATTTGGTTTGTCTCTTAAGTCAAAGATGTGGAATCCTGTTAT
CTCCTATCAGGATAAAGACATTCAACTAGCACAGTAGGTGCACATTAATGTTTGT
GATATGATCATTTTACAAGACATGGTAACTTGTACTTATATTCAGGGCATAATTT
AGAAATTCAAAGAAATAACTTAAAAAAGGGCTTCTTTACTGATATTAATGTTAC
ATACTAAAGCTCATAGAATAGACCCGCAGTATCCCAAATATCCAGTCCATGTGCAA
TTCTAGTATGACTGGAGATTTGGCCCCTAACCCATAGCAACTAAAAAGGAGAAAAA
CAGGAAGGGAAAGGCTCAGCTAGAGACTGACACTTGTGGGTTGAATTGTGTCCCCC
AAAAAGATATGTTCAATTCCTAACCTTGGTGTACGTGAATGTGACCTTATCTAGAA
ATAAGTGTAAATCATGTTAAAATGGGGTCATACTGGATTAGAGTGGGGCCTAATCCA
ATAACTGCTGTGTTTATAAGGAGAGAGATTTGGAGACACAGAGACAAATGGTAGAC
AGCCATGTGAAGACAAAAGGCAGATACTGGATTGTTGAACTACAAGGCAAGAAA
GGAACACTCAGGATTGCTGGTAACCACCAGAAGCCAGGAAGAGGCAAGGAAAGAG
TCTTCTCTTGAAGATCATGCCCTGTCAACACTTTGATTTCCGACTTCTAGCTTCT
AGAATTGTGAGAGAATAAATTGCTGTTGTTTAAAGCCACTCAGTTTGTGGTGCTTTG
TTAAGTAATCTTAGAAAAGTAATACAACACCTAACACAGAAATACTTTAAAGCCG
CTAAAAGGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACATGGAAATACCACAAGTCTGG
AGCCATAACAAAAAATGGGCAAACAGTCCTGTATCCTCAGTGAAGTCTCTGGTTATG
AGAATACTGAAGCCCGATCCTGATGTTTAAAACGACATTGAAGTATCAAGACAAAG
ATAAAAATATTTAATATGCTAGCCAAGAAACCAATACAGCATTTCATCACTGCAA
GAGAGTTCTACACTAAATGGCTAGAATTTAAAAGCTTTAGTTATTTAGAACACGTAG

AAAACAGAAGGGCTAAATAGGGCCCGTTCAAGCCTTTGAATTTAATGAGAAAACAG
ACATGAGGAGAAGAACATAAACGCTCACATCCAAGACAGAACCCAGGGCTCTTGGT
CCCCTTGCTCAACTTGTACATCTTAATCCACATAAACATAACCACTCTAAAAAGGTAC
ATCCTATGTGATATTAATGTAAAACAAATCATTCTTGCAAATACAGTTATGTGCCAT
GTAACGTTTCAGTCAATGGTAGACTGCATATATGATGGTAGTCCCATTAGATTACAA
TGGACCTGAAAATATGCTATTGCCTTAGTGACACTGTAACCATCATAAGGTCTTAGT
ACTATTTTGCAAGTTATTTAAAGTATAGCACATAACAATTATTACAGTGTACAACACT
TGATAATAAACTACTACATTGCTGGTTTATGTATTCACTATACTATGCCTTTTATTGT
TATTTTAGAGTGCACCTCTTCTACTTTTTTTTTTTTTTAAGTTAAATGTAAAACAGCCTC
AGGCAAGTCCTTCAGGAGGTATTCAACAGAAAGCACTGTTATCATAGGTGACAGCT
ACATGTGTGTTATTGCCCTAAAAACCTTCCAGTGGGACAAGATGTGGAGGTGGAA
GGCAGTGAGGTGGAAGGGAGTGATACTGATGATCCTAATCCTGTCTATGCCTAGGT
GAAAGTGTGTGTGTTTTAGTTTTTAACAAAAACGACTAACAAGTAAAAAAAAAAAT
TTAAAATAGAAAATAGAAAAAGCTTCTAGAATAAGGATACAAAGAAAAAATATTT
TTGTATAGCTATACAATGTATTTGTGTTTCAAGCTAAGTATTTTAAAAGTTAAAAAA
TTAAAAGTTTACAAAGTTAAAAGTTATAATTTTTTATTGAAGAAAACTGTTAAG
ATAAATTTGGTGTAGCTTCAGCGTACTGTGTTTATAGTCTACAGTGGTGTACAGTGT
CTAGGCCTTCACATTAATTCACCACTCACTCACTGACTCACCCAGAGCAACTTCTAG
TCCTGCAAGCTCCATTCGTGGTAAGTGGCCTACACAGGTATACCATTATCTTTTATAC
CATACTTTTACTGTACCTTTTCTCTGTTTGCATATATTTAGATAAATATTTACCACTGT
GTTACAACCTGTCTATAGTATTCAGTACAGTAACAGTTGTACAGGTTTGTGGCCTAGG
AGCAACAGACTATACCATACGGCCTAGGTACATAAAGGCTATACTATCTAGGTTTGT
GTAAGTACACTCTATGATGTTTGCATAATGACAAAATCGCCTAATGATGCATTCCTA
AGCAATGTGTGATTGTACTATAATTGAAGACTTGTTATCTAAGACTGAAAGTAAAAA
GAATTGCAATTTACCTAAGCAAGTCTAAAACCTGTGAAGTCTATTTATAATAATAGC
AATACAAAGCAGCTAATAGGCAAACCTATGATATACCTATCTTTGCCATATGATTGCT
TTGGGAGCTAACATTTGATCTGTAAATGTATGACAAAGTAAACAATTTTACTTAAAG
AATTCATCCACATCTTGTCAAGAGAGTTCAGTCTGATGGAAAGCACTGACTTCTAT
TTACAGAGCATTAGATGAGTGCTTTTATCATATTATGAGTAGGCATACAGAGCCTGG
CAAAACAGTTAACTCTAAGTATGTACAGAAATGGTTGAACACAACGACAGTTTTAA
CACGTGTATTTGTAATTTCAAAAATTCATTTAGGTAATATTTACTTTTAAATATGTTG
TATCAATTTAATAGTCTTAAGAGACAGCACTAGATATAAGCCGTACAGCTTCTTTAA
AATATCCACTGTTTTTAAATACAATGTAAGCAGTCAGTTTACAATGATCAAATATAGG
AATGTAATCTGAATTGAAATGGTAATGACACTACTGCTGTCATAACTAACAACAGCA
AACTGGAGGCCAACATAATGAATTAAGTTAACATAACAACCATAAAATTATATTGCA
AACATATTTTTCTTTCATTCTTTTAGGTTAAAAAGGTGGATAATCATAAAGGCAATA
TTACAACCTAATATTTTCATCATTAAACTGAAAATAAAAAGTATTTCTAAAACAGAA
CTGAACCCTGGAGCAAAATCTGATTGAATTATAGGGAACTTTTACCACGTTGTGAA
AATTGAACCTATTATACTGCTAGTTACACTCTCACTCCTAACAGAATAAGAAAAAAA
AATGGGCCGGGCATGGTGGGTCACACCTGTTATCCCAGCTCTTTGGTAGGCCGAGGC

AGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGCTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACC
CCACCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGTGGACACCTGTAAT
CCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCTCTTGAACCCGGAGGTGGCAGAG
GTTGCAATGAGCTGAGATGGCGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGAGAGAC
TCTGCCTCAAGAAAAAACAACAAACAAACAAACAAAAAGAATAAGAAAGAAAA
TGAAGGACAAAGATCATACTGAATTGCTTAGTTTTAAATCCTACCAAAGAAATAG
CCTGGGAAATGAAATGTCACAGAGAAGTATAATCAGGAGAGCTGTACAATTATTTT
ACTAATACTTGAAGTCATCGTCTTTGGTGAGAAAAATCCATACATGCAAATGCAGCT
GAAAAAATCAGCTCAAACCAATAGTTGTTTTATGTACCTATCTTACGTACATGTAG
TGCTGTCTACTCCAGAGAGTTACCAAACATTAGCCAGTCTTTTGAGGGAAGCCAAGA
TTCAAATTGAGTGAGACGGTGGCTTGCTCACAGGGTTCATGAGAGGTTTCCCAATAC
ACTTTCTGGAAATAATCCATACATGCAGACATGATTACATTAATTAACATCTGCTA
AAACTGTTAGTAGAGTGCTAAGTTTGAGGTTTTGCTTTTTCTTTAAACGTCTGTAAA
AAATCAACCATCTCTTCCCTGATTGGTATTTAGAAAGGTGGTTGGTCCACTGCTATT
GTAGTGAAAATTCTACAATCATAAAGCCCTCACTTCTTGTTTTTTAGAGACAGGGTC
TCGTTTTGTCATCCAGGCTGGAATGCACTGGCAGGATCATAGCTCTCGGTAACCTCA
AACTCTTGGGCTCAAATGACCCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTAGGACTACAG
GTGCACATCACCACGCCCGGCTAAGTTTTTAATTTTTGTAGAGACAGGGTCTACGT
TGCCCAGGTTGAGCTTGAACCTCCTGGCTTCAAGTGATCCTCTTGCCTCCGCCTCCCAA
AGCTCTGGCATTACAGGTGTAAGCCACCTTCTCCAACCTGGCTCTCAATACTTGTA
CCATGCTGTTTTATTTTCTCCAGCCCAAAGAGAAGCAGGATCCTAAACCGTCCACTT
TCCACAACAGGAGCTGCCAGGACCACTTCAAGGACAGTGAACGTGTTTACAGTACC
AGAAAGTTCACAACACTTTCTCAATCTTCAACATCAGGGAAGACTGGAAGGTGAAG
TTCATATCACTATCTGGCCATTTCTCACAGTTCCAAGTTTCTCAGACAATAGGTAGGC
TAACCTAGTCCTCCTGGGAACATCTAATTAACGTAGAATAGAACCCGAGGGCAGA
CTTGAAAAACAGAAGTCCTCCTTGGTTTACTTTGTTTCTCTGAAAGCAAATTGTGGA
GTGCCAACATAGCCAAACAAAATATTTTATCAACTTCATAAGGTGCTTGTAATTTTT
TCCTGGAGCAGGTAAATGCTGGCTTAGTGAACAATCTGGAATGTGGTAATTACTCTC
GTTCTTGTTCAGATGTACTATCAGCATGTAGCAGTTTCCAACCTGATTCAGGGTTTTT
CTAAAGTGGCAGGCCTTGGCAGAGGTGGTGACAACAATGCCCGTGTCAAATGACAC
CGTATTTCAAGTATTCTGACTCCAGGTTATTAATATCCCCTATATGATAGTCTTGTTT
CTGTGATATTCACAGATTATGTTAAAAGTTTCCCAAAGTCTGAGAAAAATCATATCT
TAACAGTATCTTTTTTTTTTTGATCCTTTGTACAAAAGTAGAAGTAATGCCAGACAG
ATTACGTACCCTTGTTGTGAACAACCTGGTGCATGGCAACTGTTTGAATAGAAATTA
CCAACCTGCCACAACCAGGCAACTACTCTCCAGAGCCTAACAAATCTCGATTGCATCT
GAAAGGGCCACCCCTCCTGGGAAAGTGCAGGACCTCCCTCCTGTTTCTGAATACAAA
GCCTGGTGGTGTCAACCGCGGCCAGATAGACCCAATGAGCACACGGACATGTAATC
TGTGCACTTCTTTAGACAACCTGATTACCATCAGTCAAGTGATGCCCAAGTCACAATA
GTCACTTCTTTAAGCAAGTCTGTGTCATCTCGGAGCTGTGAAGCAACCAGGTCATG
TCCCACAGAATGGGGAGCACACCGACTTGCATTGCTGCCCTCATATGCAAGTCATCA

CCACTCTCTAGAAGCTTGGGCTGAAATTGTGCAGGCGTCTCCACACCCCCATCTCAT
 CCCGCATGATCTCCTCGCCGGCAGGGACCGTCTCGGGTTCCTAGCGAACCCCGACTT
 GGTCCGCAGAAGCCGCGCGCCGCCACCCTCCGGCCTTCCCCAGGGCAGGCCTCTC
 AGTACCCGAGGCTCCCTTTTCTCGAGCCCGCAGCGGCAGCGCTCCCAGCGGGTCCCC
 GGGAAGGAGACAGCTCGGGTACTGAGGGCGGGAAAGCAAGGAAGAGGCCAGATCC
 CCATCCCTTGTCCTGCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGGGAAGCCCGGGGCC
 GGATGCAGGCAATTCACCAGTCGCTAGAGGGCGAAAGCCCACACCCAGCTTCGGT
 CAGAGAAATGAGAGGGAAAGTAAAAATGCGTCGAGCTCTGAGGAGAGCCCCGCTT
 CTACCCGCGCCTCTTCCCGGCAGCCGAACCCCAAACAGCCACCCGCCAGGATGCCG
 CCTCCTCACTACCCACTCGCCACCGCCTGCGCCTCCGCCGCCGCCGGGCGCAGGCAC
 CGCAACCGCAGCCCCGCCCGGGCCCGCCCCGGGCCGCCCGACCACGCCCCGG
 CCCC GGCCCCGGCCCCCTAGCGCGCGACTCCTGAGTTCAGAGCTTGCTACAGGCTGC
 GGTTGTTTTCCCTCCTTGTTTTCTTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTACC
 CTCAGCGAGTACTGTGAGAGCAAGTAGTGGGGAGAGAGGGTGGGAAAAACAAAA
 CACACACCTCCTAAACCCACACCTGCTCTTGCTAGACCCCGCCCCCAAAGAGAAGC
 AACCGGGCAGCAGGGACGGCTGACACACCAAGCGTCATCTTTTACGTGGGCGGAAC
 TTGTCGCTGTTTGACGCACCTCTCTTTCTAGCGGGACACCGTAGGTTACGT

SEQ ID NO:15

>NG_031977.2 Homo sapiens, субъединица комплекса C9orf72-SMCR8 (C9orf72),
 RefSeqGene (LRG_658) на хромосоме 9

TTGTAAGTTCTCTGAGGCATCCCCAGAAGCTGATGCTGCCATGCTTCCTATACAGCC
 TGCAGAACCATGAGTCAATTAACCTCTTTTCTTTGTAAATTACCCAGTCTCAAGTAT
 TTCTTTATAGCAATGCAAGAATGGACTAATACAGAAAATTGTTACTGAGAAGAAGG
 GCATTGCTATAAAGATACCTGAAAATGTAGAAGTGACTTTGGAACCGGCTAACAGG
 CAGAAGTTGAAACATTTTAGAGGGCTCAGAAGAAGACAGAAAGATGAGAGAAAGT
 TTGGAACTCGCTAGGAACCTTGTTGAGTGGTTGTAACCAAAATACTGATAGTGATATA
 GACAGTGAAGTCCAGGCTGAGGAGGTCTCAGATGGAAATGAGAAATTTATTGGGAA
 TGAGTAAAGGTCAGGTTTGCTATGCTTTAGCAAAGAGCTTAGCTGCATTGTTCCCTCT
 GTTCTAGGGATCTGTGAAATCTTAGACTTAAGAATGATGATTTAGGGTATCTGGCAG
 AAGAAATTTCTAAGCAGCAGAGTGTTCAAGAAGTAACCTAGCTGCTTCTAATAGCCT
 ATGCTCATAGGCATGAGCACAGAAATGACCTGAAATTGGAACCTTAACTTAAAAGG
 GAAGCAGAGCATAAAAGTTTGTAATTTTGCAGCCTGGCCATGTGGTAGTAAAGAA
 AAGCTCGTTCTCAGGAGAGGAAGTCAAGCAGGCTGCATAAATTTGCATAACTAAAA
 GGAAGGCAAGGGCTGATAACCAAAACAATGGGGAGAAAGACTCATAGGACTAACA
 GGCATTTTATTTTATTTTATTTTATTTTATTATTATTATACTTTAAGTTTTAGGGTAC
 ATGTGCACAATGTGCAGGTTAGTTGCATATGTATACATGTGCCATGCTGGTGTGCTG
 CACCCATTAACCTCGTCATTTAGCATTAGGTATATCTCCTAATGCTATCCCTCCCCCT
 CCCCCACCCACAACAGTCCCCAGAGTGTGATGTTCCCTTCTGTGTCCATGTGTTC
 TCATTGTTCAATTCCACCTATGAGTGAGAACATGTGGTGTGTTGGTTTTTTGACCTTG
 CAATAGTTTACTGAGAATGACGATTTCCAATTTTCATCCATGTCCCTACAAAGGACAT

GAACTCATCATTTTTTATGGCTGCATAGTATTCCATGGTGTATATGTGCCACATTTTC
TTAATCCAGTCTATCACTGTTGGACATTTGGGTTGGTTCCAAGTCTTTGCTATTGTGA
ATAGTGCCACAATAAACATAGTGTGCATGTGTCTTTATAGCAGCAGGATTTATAGTC
CTTTGGGTATATACCCAGTGATGGGATGGCTGGGTCAAATGGTATTTCTAGTTCTAG
ATCCCTGAGGAATCGCCACACTGACTTCCACAATGGTGAAGTACTTTACAGTCCCA
CCAACAGTGTAAGAGTGTTCCTAATAGGCATTTTAGGCTTTCATGGTGGTCCCTCTC
ATCACAGGCCCCGAGGCCTAGGAGGACTGAATCATTTCCCTGGGCCAGGCCTAGGGC
CCCTGCTCCCTCTTACAGCCTTGGGACTCTGCTCCCTGAATCCCAGCTGCTCAAAGG
GGCCCAGGTACTGTTACAGTAGGTAGCTAATCAGGCATGAGTGGGGTAAGAGAGAA
GTCCCCACCACCCACCAGGAATGTCAGGCAACCATCAGATGATGGTCAGGCAGTTG
TCATACTGCCTCTCTAAAATAGTAATTGGTTGCAGCCAGCACCAGGGAGAGGCAACT
TCTCAATAGATAGAAACACCTGAAATTGGTAACTGGGCGCTTCCAATAAGATCTCAG
GAACTGAGAGAGTGGGCTTAACATGCACATTAAGAGGCCAAAATGGTGAAGTATGAC
CTTTGGGGGCATTCCACCGGAAAAGGGAAGAAAGCCTCAGGTAAGCATGTATACAA
CTCCAGTAAACACACTGCACACGCTCACCTTCCAAGTGCAAGCAGGGCACCATGCA
TGCGGCAAGCTCACCTTAGGGAAGGACCAAGGGAAAGGGGCACAAGATGTCAGA
AGTAGGCCAGTGTATAAGATCCTAGGTTCAAGGTCAAACAGGGCAGTTGACCTCA
AGGTGCCCACTTGGGCCTCTTCCAAATGTACTTTCCTTTCATTCTGTTCTAAAGCTT
TTTAATAAACTTTTACTCCTGCTCTGAACTTGTGCGCAGTCTCTTTTTTCTGCCTTATGC
CTCTTGGTCAAATTCTTTCTTCTGAGGAGGCAAGAATTGAGGTTGCTGCAGACCCAC
ATGGATTTGCAGCTGGTAACTCAGATAACTTTCACCAGTAAGAATACAGTTCAGGCT
GCTGCTTACAGGGTGCCAGGCATAAGCCTTGGTGGCTTCCATAAGCTGTGAAGCCG
GCGGGCGCACATAATGCAAGAGTTGAGGCTTAAGAAGCTCTGCCTAGATTTTAGAG
GATGTATGAAAAAGCCTGGATGTCCAGACAGAAGCCTGTTACTGGGGTGGAAATCCT
CATGGAGAACATCTACTAGGGAAGCAAGGAGAAGAAATGTGGGGTTGCAGCCCCCA
CAGAGAGTCCCCTGGGGCACTGCCTAGCAGAGCTATGACAAGACAGCCACCGTCCT
CCAGACCCCAGAATGGTAGATCCACCAACAACCTGCACCCTGCAGCCTGGAAAAGC
TGCAAGCACTCAATGCTAGCCCATGAGAGCAGCTGTGGGAGATGAACCCTGGAAAA
CCACAGGGGTGGTTCTGCCCAAGGTTTTGGGAGCCCACTCATTGCATCAGTGTTCCT
TGGGTGTGAGTCAAAGGAGATTATTTAGAGCTTTAACATTTAATGACTGCCCGGCT
GGCTTTCAGACTTGCAATGGGGCCCTATAGCCTCTTTCTTTTGGCAGATTTCTCCCTT
TCGGAATGGCAGTATCTGCCCAATGCCTATACCCCCATTGTATCTTTGAAGCAATTA
CCTTGTTTTTTGATTTTACAGGTTCATAGGTAGAAGGGACTAGCTTCGTCTCAGGTGA
GACTTGGGACTTTGGACTTTTGAATGAATGCTGGATCGAGTTAAGACTTTGGGGAAC
TGTTGGTAAGGCACGACAGTATTTTGAATATGAGAAGGACATTAGATTTGGGAGG
GGCCAGAGTTGGAATAACATGGTTTGGATCTCTGTCCCCACCCAAATCTCATGTTCA
ACTGTAATCCCCAGTGTGGAGGTTGGGCCTGGTGGGAGGTGAGTGGATTATGGGG
TGGCTTCTAATGGTTTTGTACAGTCCCCTCTTGGTACTATATAGTGAGTTCTGACAAG
ATCTAGTTGTTTAAACGTATGTAGCACCTCCCATTTCTCTCTTCCCCAGTTCCCTGCC
ATGTGAAGTCTGGGGTCTCCCTATGCCTTCCATCATGATTTTAAGTTCCTATGGCCT

GCCCAGAAGCTGATCCAGCCATGCTTCTTGTACAGCCTGCAGA ACTGTGAGCCATTA
AACTTTTCTTTATAAATTACCCAGTTTCAGTTATTTCTTTATAGCAGTGTAAGAATGG
ACTAACACAATTATTAACGCTAGTCCTCATGTTGTACATTAAATCTCTAGATGTATTA
GACGTA ACTGCAACTTTGTACCCTACCCTACAATTTTCTTTCCCCCAAGCCCCCAA
CCAAGGGTCTACTCTGTTTCTATAAATTCAGTTGTTTTTTAATTCCACGTATAAGTGA
AGTACA ACTCAGTGTAGAACTTGGTAAATGCTAGCTACTTGTATAAGCTGTCAGT
CAAATAAAAAATACAGAGATGAATCTCTAAATTAAGTGATTTATTTGGGAAGAAAG
AATTGCAATTAGGGCATA CATGTAGATCAGATGGTCTTCGGTATATCCACACAACAA
AGAAAAGGGGGAGGTTTTGTTAAAAAAGAGAAATGTTACATAGTGCTCTTTGAGAA
AATTCATTGGCACTATTAAGGATCTGAGGAGCTGGTGAGTTTCAACTGGTGAGTGAT
GGTGGTAGATAAAAATTAGAGCTGCAGCAGGTCATTTTAGCAACTATTAGATAAAAC
TGGTCTCAGGTCACAACGGGCAGTTGCAGCAGCTGGACTTGGAGAGAATTACTCTG
TGGGAGCAGTGTCATTTGTCTAAGTGCTTTTCTACCCCCTACCCCCTACTATTTAGT
TGGGTATAAAAAGAATGACCCAATTTGTATGATCAACTTTCACAAAGCATAGAACA
GTAGGAAAAGGGTCTGTTTCTGCAGAAGGTGTAGACGTTGAGAGCCATTTTGTGTAT
TTATTCCTCCCTTTCTTCCCTCGGTGAATGATTAACGTTCTGTGTGATTTTTAGTGA
TGAAAAGATTAATGCTACTCACTGTAGTAAGTGCCATCTCACACTTGCAGATCAA
AAGGCACACAGTTTAAAAAACCTTTGTTTTTTTACACATCTGAGTGGTGTAATGCT
ACTCATCTGTAGTAAGTGGAATCTATACACCTGCAGACCAAAAGACGCAAGGTTTC
AAAAATCTTTGTGTTTTTTACACATCAAACAGAATGGTACGTTTTTCAAAGTTAAA
AAAAACA ACTCATCCACATATTGCAACTAGCAAAAATGACATTCCCAGTG TGAA
AATCATGCTTGAGAGAATTCTTACATGTAAAGGCAAAATTGCGATGACTTTGCAGGG
GACCGTGGGATTCCCGCCCGCAGTGCCGGAGCTGTCCCCTACCAGGGTTTGCAGTGG
AGTTTTGAATGCACTTAACAGTGTCTTACGGTAAAAACAAAATTTTCATCCACCAATT
ATGTGTTGAGCGCCCACTGCCTACCAAGCACAAACAAAACCATTCAAACCACGAA
ATCGTCTTCACTTTCTCCAGATCCAGCAGCCTCCCCTATTAAGGTTTCGCACACGCTAT
TGCGCCAACGCTCCTCCAGAGCGGGTCTTAAGATAAAAAGAACAGGACAAGTTGCC
CGCCCCATTTGCTAGCCTCGTGAGAAAACGTCATCGCACATAGAAAACAGACAGA
CGTAACCTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGTGCGTCAAACAGCGACAAGTTCC
GCCACGTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTCAGCCGTCCCTGCTGCCCGGTTGCTTCT
CTTTTGGGGGCGGGGTCTAGCAAGAGCAGGTGTGGGTTTAGGAGGTGTGTGTTTTG
TTTTTCCCACCTCTCTCCCCACTACTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGGTGAACAA
GAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAGAAGAAAACAAGGAGGGAAACAACCGCAGC
CTGTAGCAAGCTCTGGA ACTCAGGAGTCGCGCGCTAGGGGCCGGGGCCGGGGCCGG
GGCGTGGTTCGGGGCGGGGCCGGGGCGGGGCCGGGGCGGGGCTGCGGTTGCGGTGC
CTGCGCCCGCGGCGGCGGAGGCGCAGGCGGTGGCGAGTGGGTGAGTGAGGAGGCG
GCATCCTGGCGGGTGGCTGTTTGGGGTTCGGCTGCCGGGAAGAGGCGCGGGTAGAA
GCGGGGGCTCTCCTCAGAGCTCGACGCATTTTTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGACCG
AAGCTGGGTGTGCGGGCTTTCGCCTCTAGCGACTGGTGGAATTGCCTGCATCCGGGCC
CCGGGCTTCCC GGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGCAGGGACAAGGGATGGGGA

TCTGGCCTCTTCCTTGCTTTCCCGCCCTCAGTACCCGAGCTGTCTCCTTCCCGGGGAC
CCGCTGGGAGCGCTGCCGCTGCGGGCTCGAGAAAAGGGAGCCTCGGGTACTGAGAG
GCCTCGCCTGGGGGAAGGCCGGAGGGTGGGCGGCGCGGGCTTCTGCGGACCAAGT
CGGGGTTGCTAGGAACCCGAGACGGTCCCTGCCGGCGAGGAGATCATGCGGGATG
AGATGGGGGTGTGGAGACGCCTGCACAATTTAGCCCAAGCTTCTAGAGAGTGGTG
ATGACTTGCATATGAGGGCAGCAATGCAAGTCGGTGTGCTCCCCATTCTGTGGGACA
TGACCTGGTTGCTTACAGCTCCGAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGAAGTGACTA
TTGTGACTTGGGCATCACTTGACTGATGGTAATCAGTTGTCTAAAGAAGTGACAGA
TTACATGTCCGTGTGCTCATTGGGTCTATCTGGCCGCGTTGAACACCACCAGGCTTT
GTATTCAGAAACAGGAGGGAGGTCCTGCACTTTCCAGGAGGGGTGGCCCTTTCAG
ATGCAATCGAGATTGTTAGGCTCTGGGAGAGTAGTTGCCTGGTTGTGGCAGTTGGTA
AATTTCTATTCAAACAGTTGCCATGCACCAGTTGTTCAACAAGGGTACGTAATCT
GTCTGGCATTACTTCTACTTTTGTACAAAGGATCAAAAAAAAAAAGATACTGTAA
GATATGATTTTTCTCAGACTTTGGGAAACTTTTAACATAATCTGTGAATATCACAGA
AACAAAGACTATCATATAGGGGATATTAATAACCTGGAGTCAGAATACTTGAAATAC
GGTGTCAATTTGACACGGGCATTGTTGTCACCACCTCTGCCAAGGCCTGCCACTTTAG
GAAAACCCTGAATCAGTTGGAAACTGCTACATGCTGATAGTACATCTGAAACAAGA
ACGAGAGTAATTACCACATTCCAGATTGTTCACTAAGCCAGCATTTACCTGCTCCAG
GAAAAAATTACAAGCACCTTATGAAGTTGATAAAATATTTTGTTTGGCTATGTTGGC
ACTCCACAATTTGCTTTCAGAGAAACAAAGTAAACCAAGGAGGACTTCTGTTTTTCA
AGTCTGCCCTCGGGTTCTATTCTACGTTAATTAGATAGTTCCAGGAGGACTAGGTT
AGCCTACCTATTGTCTGAGAACTTGGAAGTGTGAGAAATGGCCAGATAGTGATAT
GAACTTCACCTCCAGTCTTCCCTGATGTTGAAGATTGAGAAAGTGTGTGAACTTT
CTGGTACTGTAAACAGTTCCTGTCCTTGAAGTGGTCCTGGGCAGCTCCTGTTGTGG
AAAGTGGACGGTTTAGGATCCTGCTTCTTTGGGCTGGGAGAAAATAAACAGCAT
GGTTACAAGTATTGAGAGCCAGGTTGGAGAAGGTGGCTTACACCTGTAATGCCAGA
GCTTTGGGAGGCGGAGGCAAGAGGATCACTTGAAGCCAGGAGTTCAAGCTCAACCT
GGGCAACGTAGACCCTGTCTCTACAAAAAATTA AAAACTTAGCCGGGCGTGGTGAT
GTGCACCTGTAGTCTAGCTACTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGGGTCATTTGAGCCC
AAGAGTTTGAAGTTACCGAGAGCTATGATCCTGCCAGTGCATTCCAGCCTGGATGAC
AAAACGAGACCCTGTCTCTAAAAACAAGAAGTGAGGGCTTTATGATTGTAGAATT
TTCCTACAATAGCAGTGGACCAACCACCTTTCTAAATACCAATCAGGGAAGAGAT
GGTTGATTTTTTAACAGACGTTTAAAGAAAAAGCAAAACCTCAAACCTAGCACTCTA
CTAACAGTTTTAGCAGATGTTAATTAATGTAATCATGTCTGCATGTATGGGATTATTT
CCAGAAAGTGTATTGGGAAACCTCTCATGAACCCTGTGAGCAAGCCACCGTCTCACT
CAATTTGAATCTTGGCTTCCCTCAAAGACTGGCTAATGTTTGGTAACTCTCTGGAG
TAGACAGCACTACATGTACGTAAGATAGGTACATAAACAACCTATTGGTTTTGAGCTG
ATTTTTTTCAGCTGCATTTGCATGTATGGATTTTTCTCACCAAAGACGATGACTTCAA
GTATTAGTAAAATAAATTGTACAGCTCTCCTGATTATACTTCTCTGTGACATTTCAATTT
CCCAGGCTATTTCTTTTGGTAGGATTTAAACTAAGCAATTCAGTATGATCTTTGTCC

TTCATTTTCTTTCTTATTCTTTTTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTTTTCTTGAGGCAGAG
TCTCTCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCCATCTCAGCTCATTGCAACCT
CTGCCACCTCCGGGTCAAGAGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTAGCTGGGATT
ACAGGTGTCCACCACCACACCCGGCTAATTTTTTGTAATTTTAGTAGAGGTGGGGTT
TCACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAGCTCCTGACCTCAGGTGATCCACCTGCCTC
GGCCTACCAAAGAGCTGGGATAACAGGTGTGACCCACCATGCCC GGCCATTTTTTT
TTTTCTTATTCTGTTAGGAGTGAGAGTGTAAGTACTAGCAGTATAATAGTTCAATTTTCACA
ACGTGGTAAAAGTTTTCCCTATAATTCAATCAGATTTTGCTCCAGGGTTCAGTTCTGTT
TTAGGAAATACTTTTATTTTCAGTTTAATGATGAAATATTAGAGTTGTAATATTGCCT
TTATGATTATCCACCTTTTTAACCTAAAAGAATGAAAGAAAAATATGTTTGCAATAT
AATTTTATGGTTGTATGTTAACTTAATTCATTATGTTGGCCTCCAGTTTGCTGTTGTT
AGTTATGACAGCAGTAGTGTCAATTACCATTTCAATTCAGATTACATTCCTATATTTGA
TCATTGTAAACTGACTGCTTACATTGTATTA AAAACAGTGGATATTTTAAAGAAGCT
GTACGGCTTATATCTAGTGCTGTCTCTTAAGACTATTA AATTGATAACAACATATTTAA
AAGTAAATATTACCTAAATGAATTTTTGAAATTACAAATACACGTGTTAAAAGCTGTC
GTTGTGTTCAACCATTTCTGTACATACTTAGAGTTAACTGTTTTGCCAGGCTCTGTAT
GCCTACTCATAATATGATAAAAAGCACTCATCTAATGCTCTGTAAATAGAAGTCAGTG
CTTTCCATCAGACTGAACTCTCTTGACAAGATGTGGATGAAATTCTTTAAGTAAAAT
TGTTTTACTTTGTCATACATTTACAGATCAAATGTTAGCTCCCAAAGCAATCATATGG
CAAAGATAGGTATATCATAGTTTGCCTATTAGCTGCTTTGTATTGCTATTATTATAAA
TAGACTTCACAGTTTTAGACTTGCTTAGGTGAAATTGCAATTCTTTTTACTTTTCAGTC
TTAGATAACAAGTCTTCAATTATAGTACAATCACACATTGCTTAGGAATGCATCATT
AGGCGATTTTGTCAATTATGCAAACATCATAGAGTGTACTTACACAAACCTAGATAGT
ATAGCCTTTATGTACCTAGGCCGTATGGTATAGTCTGTTGCTCCTAGGCCACAAACC
TGTACAACCTGTTACTGTACTGAATACTATAGACAGTTGTAACACAGTGGTAAATATT
TATCTAAATATATGCAAACAGAGAAAAGGTACAGTAAAAGTATGGTATAAAAAGATA
ATGGTATACCTGTGTAGGCCACTTACCACGAATGGAGCTTGCAGGACTAGAAGTTGC
TCTGGGTGAGTCAGTGAGTGAGTGGTGAATTAATGTGAAGGCCTAGAACACTGTAC
ACCACTGTAGACTATAAACACAGTACGCTGAAGCTACACCAAATTTATCTTAACAGT
TTTTCTTCAATAAAAAATTATAACTTTTTAACTTTGTAAACTTTTTAATTTTTAACTT
TTAAAATACTTAGCTTGAAACACAAATACATTGTATAGCTATACAAAATATTTTTT
CTTTGTATCCTTATTCTAGAAGCTTTTTTCTATTTTCTATTTTAAATTTTTTTTTTACT
TGTTAGTCGTTTTTGTAA AAAACTAAAACACACACTTTCACCTAGGCATAGACAG
GATTAGGATCATCAGTATCACTCCCTTCCACCTCACTGCCTTCCACCTCCACATCTTG
TCCCCTGGAAGGTTTTTAGGGGCAATAACACACATGTAGCTGTCACCTATGATAAC
AGTGCTTTCTGTTGAATACCTCCTGAAGGACTTGCTGAGGCTGTTTTACATTTAACT
TAAAAAAAAGTAGAAGGAGTCACTCTAAAATAACAATAAAAGGCATAGT
ATAGTGAATACATAAACCAGCAATGTAGTAGTTTATTATCAAGTGTTGTACACTGTA
ATAATTGTATGTGCTATACTTTAAATAACTTGCAAATAGTACTAAGACCTTATGAT
GGTTACAGTGTCACTAAGGCAATAGCATATTTTCAGGTCCATTGTAATCTAATGGGA

CTACCATCATATATGCAGTCTACCATTGACTGAAACGTTACATGGCACATAACTGTA
TTTGCAAGAATGATTTGTTTTACATTAATATCACATAGGATGTACCTTTTTAGAGTGG
TATGTTTATGTGGATTAAGATGTACAAGTTGAGCAAGGGGACCAAGAGCCCTGGGT
TCTGTCTTGGATGTGAGCGTTTATGTTCTTCTCCTCATGTCTGTTTTCTCATTA AATTC
AAAGGCTTGAACGGGCCCTATTTAGCCCTTCTGTTTTCTACGTGTTCTAAATAACTAA
AGCTTTTAAATTCTAGCCATTTAGTGTAGA ACTCTCTTTGCAGTGATGAAATGCTGTA
TTGGTTTCTTGGCTAGCATATTA AATATTTTTATCTTTGTCTTGATACTTCAATGTCGT
TTTAAACATCAGGATCGGGCTTCAGTATTCTCATAACCAGAGAGTTCACTGAGGATA
CAGGACTGTTTGCCCATTTTTTGTATGGCTCCAGACTTGTGGTATTTCCATGTCTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTGACCTTTTAGCGGCTTTAAAGTATTTCTGTTGTTAGGTGTTGT
ATTACTTTTCTAAGATTACTTAACAAAGCACCACAAACTGAGTGGCTTTAAACAACA
GCAATTTATTCTCTCACAATTCTAGAAGCTAGAAGTCCGAAATCAAAGTGTTGACAG
GGGCATGATCTTCAAGAGAGAAGACTCTTTCCTTGCCCTTTCCTGGCTTCTGGTGGTT
ACCAGCAATCCTGAGTGTTCCCTTTCTTGCCTTGTAGTTTCAACAATCCAGTATCTGCC
TTTTGTCTTCACATGGCTGTCTACCATTTGTCTCTGTGTCTCCAAATCTCTCTCCTTAT
AAACACAGCAGTTATTGGATTAGGCCCCACTCTAATCCAGTATGACCCCATTTAAC
ATGATTACACTTATTTCTAGATAAGGTCACATTCACGTACACCAAGGGTTAGGAATT
GAACATATCTTTTTGGGGGACACAATTCAACCCACAAGTGTCAGTCTCTAGCTGAGC
CTTCCCTTCTGTTTTTCTCCTTTTTAGTTGCTATGGGTTAGGGGCCAAATCTCCAGT
CATACTAGAATTGCACATGGACTGGATATTTGGGAATACTGCGGGTCTATTCTATGA
GCTTTAGTATGTAACATTTAATATCAGTGTAAGAAGCCCTTTTTTAAGTTATTTCTT
TGAATTTCTAAATGTATGCCCTGAATATAAGTAACAAGTTACCATGTCTTGTA A AAT
GATCATATCAACAAACATTTAATGTGCACCTACTGTGCTAGTTGAATGTCTTTATCCT
GATAGGAGATAACAGGATTCCACATCTTTGACTTAAGAGGACAAACCAAATATGTC
TAAATCATTTGGGGTTTTGATGGATATCTTTAAATTGCTGAACCTAATCATTGGTTTTC
ATATGTCATTGTTTAGATATCTCCGGAGCATTGATAATGTGACAGTTGGAATGCA
GTGATGTCGACTCTTTGCCACCGCCATCTCCAGCTGTTGCCAAGACAGAGATTGCT
TTAAGTGGCAAATCACCTTTATTAGCAGCTACTTTTGCTTACTGGGACAATATTCTTG
GTCCTAGAGTAAGGCACATTTGGGCTCCAAAGACAGAACAGGTACTTCTCAGTGAT
GGAGAAATAACTTTTCTTGCCAACCACACTCTAAATGGAGAAATCCTTCGAAATGCA
GAGAGTGGTGCTATAGATGTAAGTTTTTTGTCTTGTCTGAAAAGGGAGTGATTATT
GTTTCATTAATCTTTGATGGAACTGGAATGGGGATCGCAGCACATATGGACTATCA
ATTATACTCCACAGACAGA ACTTAGTTTTCTACCTCCCACTTCATAGAGTGTGTGTTG
ATAGATTAACACATATAATCCGGAAAGGAAGAATATGGATGCATAAGGTAAGTGAT
TTTTCAGCTTATTAATCATGTTAACCTATCTGTTGAAAGCTTATTTTTCTGGTACATAT
AAATCTTATTTTTTTAATTATATGCAGTGAACATCAAACAATAAATGTTATTTATTTT
GCATTTACCCTATTAGATACAAATACATCTGGTCTGATACCTGTCATCTTCATATTA
CTGTGGAAGGTACGAAATGGTAGCTCCACATTATAGATGAAAAGCTAAAGCTTAGA
CAAATAAAGAACTTTTAGACCCTGGATTCTTCTTGGGAGCCTTTGACTCTAATACC
TTTTGTTCCCTTTCATTGCACAATTCTGTCTTTTGCTTACTACTATGTGTAAGTATAA

CAGTTCAAAGTAATAGTTTCATAAAGCTGTTGGTCATGTAGCCTTTGGTCTCTTTAACC
TCTTTGCCAAGTTCCCAGGTTCATAAAATGAGGAGGTTGAATGGAATGGTTCCCAAG
AGAATTCCTTTTAATCTTACAGAAATTATTGTTTTCTAAATCCTGTAGTTGAATATA
TAATGCTATTTACATTTAGTATAGTTTTGATGTATCTAAAGAACACATTGAATTCTC
CTTCTGTGTTCCAGTTTGATACTAACCTGAAAGTCCATTAAGCATTACCAGTTTTAA
AAGGCTTTTGCCCAATAGTAAGGAAAAATAATATCTTTTAAAAGAATAATTTTTTAC
TATGTTTGCAGGCTTACTTCTTTTTTCTCACATTATGAAACTCTTAAAATCAGGAGA
ATCTTTTAAACAACATCATAATGTTTAATTTGAAAAGTGCAAGTCATTCTTTTCTTT
TTGAAACTATGCAGATGTTACATTGACTGTTTTCTGTGAAGTTATCTTTTTTTTACTG
CAGAATAAAGGTTGTTTTGATTTTATTTTGTATTGTTTATGAGAACATGCATTTGTTG
GGTTAATTTCTACCCCTGCCCCATTTTTTCCCTAAAGTAGAAAGTATTTTTTCTTGT
GAACTAAATTACTACACAAGAACATGTCTATTGAAAAATAAGCAAGTATCAAAATG
TTGTGGGTTGTTTTTTTAAATAAATTTTCTCTTGCTCAGGAAAGACAAGAAAATGTCC
AGAAGATTATCTTAGAAGGCACAGAGAGAATGGAAGATCAGGTATATGCAAATTGC
ATACTGTCAAATGTTTTTCTCACAGCATGTATCTGTATAAGGTTGATGGCTACATTTG
TCAAGGCCTTGAGACATACGAATAAGCCTTTAATGGAGCTTTTATGGAGGTGTACA
GAATAAACTGGAGGAAGATTTCCATATCTTAAACCCAAAGAGTTAAATCAGTAAAC
AAAGGAAAATAGTAATTGCATCTACAAATTAATATTTGCTCCCTTTTTTTTTCTGTTT
GCCCAGAATAAATTTGGATAACTTGTTTCATAGTAAAAATAAAAAAAATTTGTCTCTG
ATATGTTCTTTAAGGTAATACTTCTCGAACCTTTCCCTAGAAGTAGCTGTAACAGAA
GGAGAGCATATGTACCCCTGAGGTATCTGTCTGGGGTGTAGGCCAGGTCCACACA
ATATTTCTTCTAAGTCTTATGTTGTATCGTTAAGACTCATGCAATTTACATTTTATTCC
ATAACTATTTTAGTATTAATAAATTTGTCAGTGATATTTCTTACCCTCTCCTCTAGGAAA
ATGTGCCATGTTTATCCCTTGGCTTTGAATGCCCTCAGGAACAGACACTAAGAGTT
TGAGAAGCATGGTTACAAGGGTGTGGCTTCCCCTGCGGAAACTAAGTACAGACTAT
TTCAGTAAAGCAGAGAAGTTCTTTTGAAGGAGAATCTCCAGTGAAGAAAGAGTT
CTTCACTTTTACTTCCATTTCTCTTGTGGGTGACCCTCAATGCTCCTTGTAAAACTC
CAATATTTTAAACATGGCTGTTTTGCCTTTCTTTGCTTCTTTTTAGCATGAATGAGAC
AGATGATACTTTAAAAAAGTAATTAAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
AATACAGAACCCAATACAATGATCTCCTTTACCAAATTGTTATGTTTGTACTTTTGTA
GATAGCTTTCCAATTCAGAGACAGTTATTCTGTGTAAAGGTCTGACTTAACAAGAAA
AGATTTCCCTTTACCCAAAGAATCCCAGTCCTTATTTGCTGGTCAATAAGCAGGGTC
CCCAGGAATGGGGTAACTTTCAGCACCTCTAACCCTAGTTATTAGTAGACTAAT
TAAGTAACTTATCGCAAGTTGAGGAACTTAGAACCAACTAAAATTCTGCTTTTAC
TGGGATTTTGTTTTTTCAAACCAGAAACCTTTACTTAAGTTGACTACTATTAATGAAT
TTTGGTCTCTCTTTAAGTGCTCTTCTTAAAAATGTTATCTTACTGCTGAGAAGTTCA
AGTTTGGGAAGTACAAGGAGGAATAGAACTTAAGAGATTTTCTTTTAGAGCCTCTT
CTGTATTTAGCCCTGTAGGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTGTTGTTGAGCTTCA
GTGAGGCTATTCATTCATTATACTGATAATGTCTGAGATACTGTGAATGAAATACT
ATGTATGCTTAAACCTAAGAGGAAATATTTCCCAAATTTCTTCCCGAAAAGGA

GGAGTTGCCTTTTGATTGAGTTCTTGCAAATCTCACAACGACTTTATTTTGAACAATA
CTGTTTGGGGATGATGCATTAGTTTGAACAACCTTCAGTTGTAGCTGTCATCTGATA
AAATTGCTTCACAGGGAAGGAAATTTAACACGGATCTAGTCATTATTCTTGTTAGAT
TGAATGTGTGAATTGTAATTGTAACAGGCATGATAATTACTTTAAAACTAAA
AACAGTGAATAGTTAGTTGTGGAGGTTACTAAAGGATGGTTTTTTTTTAAATAAAAC
TTTCAGCATTATGCAAATGGGCATATGGCTTAGGATAAACTTCCAGAAGTAGCATC
ACATTTAAATTCTCAAGCAACTTAATAATATGGGGCTCTGAAAACTGGTTAAGGT
ACTCCAAAATGGCCCTGGGTCTGACAAAGATTCTAACTTAAAGATGCTTATGAAG
ACTTTGAGTAAAATCATTTCATAAAATAAGTGAGGAAAAACAAC TAGTATTAATTC
ATCTTAAATAATGTATGATTTAAAAAATATGTTTAGCTAAAAATGCATAGTCATTTG
ACAATTTCAATTTATATCTCAAAAAATTTACTTAACCAAGTTGGTCACAAAAC TGATG
AGACTGGTGGTGGTAGTGAATAAATGAGGGACCATCCATATTTGAGACACTTTACAT
TTGTGATGTGTTATACTGAATTTTCAGTTTGATTCTATAGACTACAAATTTCAAAT
ACAATTTCAAGATGTAATAAGTAGTAATATCTTGAAATAGCTCTAAAGGGAATTTTT
CTGTTTTATTGATTCTTAAATATATGTGCTGATTTTGATTTGCATTTGGGTAGATTA
TACTTTTATGAGTATGGAGGTTAGGTATTGATTCAAGTTTTCTTACCTATTTGGTAA
GGATTTCAAAGTCTTTTTGTGCTTGGTTTTCTCATTTTTAAATATGAAATATATTGA
TGACCTTTAACAAATTTTTTTTATCTCAAATTTTAAAGGAGATCTTTTCTAAAAGAGG
CATGATGACTTAATCATTGCATGTAACAGTAAACGATAAACCAATGATTCCATACTC
TCTAAAGAATAAAAGTGAGCTTTAGGGCCGGGCATGGTCAGAAATTTGACACCAAC
CTGGCCAACATGGCGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAATCAGCCGGGCAT
GGTGGCGGCACCTATAGTCCCAGCTACTTGGGAGGATGAGACAGGAGAGTCACTTG
AACCTGGGAGGAGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACGCCATTGCACTCCAGCCTGA
GCAATGAAAGCAAACTCCATCTCAAAAAAAAAAAAAAGAAAAGAAAGAATAAAAAG
TGAGCTTTGGATTGCATATAAATCCTTTAGACATGTAGTAGACTTGTTTGATACTGTG
TTTGAACAAATTACGAAGTATTTTCATCAAAGAATGTTATTGTTTGATGTTATTTTTA
TTTTTTATTGCCAGCTTCTCTCATATTACGTGATTTTCTTCACTTCATGTCACCTTAT
TGTGCAGGGTCAGAGTATTATTCCAATGCTTACTGGAGAAGTGATTCCGTGAATGGA
ACTGCTTTCATCTATGAAATCACACAGTGTTCTGAAGAAATAGATGTAAGTTTAAA
TGAGAGCAATTATACACTTTATGAGTTTTTTGGGGTTATAGTATTATTATGTATATTA
TTAATATTCTAATTTTAATAGTAAGGACTTTGTCATACATACTATTACATACAGTAT
TAGCCACTTTAGCAAATAAGCACACAAAAATCCTGGATTTTATGGCAAAACAGAG
GCATTTTTGATCAGTGATGACAAAATTAATTCATTTGTTTATTTCACTTTTAT
AATTCCTAAAAGTGGGAGGATCCCAGCTCTTATAGGAGCAATTAATATTTAATGTAG
TGTCTTTTGAACAACAACTGTGTGCCAAAGTAGTAACCATTAATGGAAGTTTACTTG
TAGTCACAAATTTAGTTTCCTTAATCATTGTTGAGGACGTTTTGAATCACACACTAT
GAGTGTTAAGAGATACTTTAGGAACTATTCTTGTTGTTTTCTGATTTTGTCAATTA
GGTTAGTCTCCTGATTCTGACAGCTCAGAAGAGGAAGTTGTTCTTGTA AAAAATTGTT
TAACCTGCTTGACCAGCTTTCACATTTGTTCTTCTGAAGTTTATGGTAGTGCACAGAG
ATTGTTTTTTGGGGAGTCTTGATTCTCGGAAATGAAGGCAGTGTGTTATATTGAATC

CAGACTTCCGAAAACCTTGTATATTA AAAAGTGTTATTTCAACACTATGTTACAGCCAG
ACTAATTTTTTTATTTTTTGATGCATTTTAGATAGCTGATACAGTACTCAATGATGAT
GATATTGGTGACAGCTGTCATGAAGGCTTTCTTCTCAAGTAAGAATTTTTCTTTTCAT
AAAAGCTGGATGAAGCAGATACCATCTTATGCTCACCTATGACAAGATTTGGAAGA
AAGAAAATAACAGACTGTCTACTTAGATTGTTCTAGGGACATTACGTATTTGAACTG
TTGCTTAAATTTGTGTTATTTTTCACTCATTATATTTCTATATATATTTGGTGTTATTC
CATTTGCTATTTAAAGAAACCGAGTTTCCATCCCAGACAAGAAATCATGGCCCCTTG
CTTGATTCTGGTTTTCTTGTTTTACTTCTCATTAAAGCTAACAGAATCCTTTCATATTA
AGTTGTACTGTAGATGAACTTAAGTTATTTAGGGCGTAGAACAAAATTATTCATATTT
ATACTGATCTTTTTCCATCCAGCAGTGGAGTTTAGTACTTAAGAGTTTGTGCCCTTAA
ACCAGACTCCCTGGATTAATGCTGTGTACCCGTGGGCAAGGTGCCTGAATTCCTCTAT
ACACCTATTTCCCTCATCTGTAAAATGGCAATAATAGTAATAGTACCTAATGTGTAGG
GTTGTTATAAGCATTGAGTAAGATAAATAATAAAGCACTTAGAACAGTGCCTGG
AACATAAAAACACTTAATAATAGCTCATAGCTAACATTTCCATTTACATTTCTTCTA
GAAATAGCCAGTATTTGTTGAGTGCCTACATGTTAGTTCCTTTACTAGTTGCTTTACA
TGTATTATCTTATATTCTGTTTTAAAGTTTCTTCACAGTTACAGATTTTCATGAAATTT
TACTTTTAATAAAAAGAGAAGTAAAAGTATAAAGTATTCACTTTTATGTTACAGTCT
TTTCCCTTAGGCTCATGATGGAGTATCAGAGGCATGAGTGTGTTAACCTAAGAGCC
TTAATGGCTTGAATCAGAAGCACTTTAGTCCTGTATCTGTTTCAGTGTCCAGCCTTTCAT
ACATCATTTTAAATCCCATTTGACTTTAAGTAAGTCACTTAATCTCTCTACATGTCAA
TTTCTTCAGCTATAAAATGATGGTATTTCAATAAATAAATACATTAATTAATGATA
TTATACTGACTAATTGGGCTGTTTTAAGGCTCAATAAGAAAATTTCTGTGAAAGGTC
TCTAGAAAATGTAGGTTCCCTATACAAATAAAAAGATAACATTGTGCTTATAGCTTCGG
TGTTTATCATATAAAGCTATTCTGAGTTATTTGAAGAGCTCACCTACTTTTTTTTGT
TTAGTTTGTAAATTGTTTTATAGGCAATGTTTTTAATCTGTTTTCTTTAACTTACAGT
GCCATCAGCTCACACTTGCAAACCTGTGGCTGTTCCGTTGTAGTAGGTAGCAGTGCA
GAGAAAGTAAATAAGGTAGTTTATTTTATAATCTAGCAAATGATTTGACTCTTTAAG
ACTGATGATATATCATGGATTGTCATTTAAATGGTAGGTTGCAATTA AAAATGATCTA
GTAGTATAAGGAGGCAATGTAATCTCATCAAATTGCTAAGACACCTTGTGGCAACA
GTGAGTTTGAATAAACTGAGTAAGAATCATTTATCAGTTTATTTTGATAGCTCGGA
AATACCAGTGTCCAGTAGTGTATAAATGGTTTTGAGAATATATTA AAAATCAGATATAT
AAAAAAAATTACTCTTCTATTTCCCAATGTTATCTTTAACAAATCTGAAGATAGTCA
TGTACTTTTGGTAGTAGTTCCAAAGAAATGTTATTTGTTTATTCATCTTGATTTTCATT
GTCTTCGCTTTCCCTTCTAAATCTGTCCCTTCTAGGGAGCTATTGGGATTAAGTGGTCA
TTGATTATTATACTTTATTCAGTAATGTTTCTGACCCTTTCCTTCAGTGCTACTTGAGT
TAATTAAGGATTAATGAACAGTTACATTTCCAAGCATTAGCTAATAAACTAAAGGAT
TTTGCACCTTTCTTCACTGACCATTAGTTAGAAAGAGTTCAGAGATAAGTATGTGTA
TCTTTCAATTTAGCAAACCTAATTTTTTAAAAAAGTTTTACATAGGAAATATGTTG
GAAATGATACTTTACAAAGATATTCATAATTTTTTTTTGTAATCAGCTACTTTGTATA
TTTACATGAGCCTTAATTTATATTTCTCATATAACCATTTATGAGAGCTTAGTATACC

TGTGTCATTATATTGCATCTACGAACTAGTGACCTTATTCCTTCTGTTACCTCAAACA
GGTGGCTTTCCATCTGTGATCTCCAAAGCCTTAGGTTGCACAGAGTGACTGCCGAGC
TGCTTTATGAAGGGAGAAAGGCTCCATAGTTGGAGTGTTTTTTTTTTTTTTTTAAAC
ATTTTTCCCATCCTCCATCCTCTTGAGGGAGAATAGCTTACCTTTTATCTTGTTTTAAT
TTGAGAAAGAAGTTGCCACCACTCTAGGTTGAAAACCACTCCTTTAACATAATAACT
GTGGATATGGTTTGAATTTCAAGATAGTTACATGCCTTTTTATTTTTCTAATAGAGC
TGTAGGTCAAATATTATTAGAATCAGATTTCTAAATCCCACCCAATGACCTGCTTAT
TTTAAATCAAATTCATAATTAATTCTCTTCTTTTTGGAGGATCTGGACATTCTTTGA
TATTTCTTACAACGAATTTTCATGTGTAGACCCACTAAACAGAAGCTATAAAAGTTGC
ATGGTCAAATAAGTCTGAGAAAGTCTGCAGATGATATAATTCACCTGAAGAGTCAC
AGTATGTAGCCAAATGTTAAAGGTTTTGAGATGCCATACAGTAAATTTACCAAGCAT
TTTCTAAATTTATTTGACCACAGAATCCCTATTTTAAGCAACAACCTGTTACATCCCAT
GGATTCCAGGTGACTAAAGAATACTTATTTCTTAGGATATGTTTTATTGATAATAAC
AATTAATAATTCAGATATCTTTCATAAGCAAATCAGTGGTCTTTTTACTTCATGTTTT
AATGCTAAAATATTTTCTTTTATAGATAGTCAGAACATTATGCCTTTTTTCTGACTCCA
GCAGAGAGAAAATGCTCCAGGTTATGTGAAGCAGAATCATCATTTAAATATGAGTC
AGGGCTCTTTGTACAAGGCCTGCTAAAGGTATAGTTTCTAGTTATCACAAGTGAAAC
CACTTTTCTAAAATCATTTTTGAGACTCTTATAGACAAATCTTAAATATTAGCATTT
AATGTATCTCATATTGACATGCCCAGAGACTGACTTCCTTTACACAGTTCTGCACAT
AGACTATATGTCTTATGGATTTATAGTTAGTATCATCAGTGAAACACCATAGAATAC
CCTTTGTGTTCCAGGTGGGTCCCTGTTCCCTACATGTCTAGCCTCAGGACTTTTTTTTT
TTAACACATGCTTAAATCAGGTTGCACATCAAAAATAAGATCATTCTTTTTTAATA
AATAGATTTGAATTTTATTGAAAAAAAATTTTAAACATCTTTAAGAAGCTTATAGGA
TTTAAGCAATTCCTATGTATGTGTACTAAAATATATATATTTCTATATATAATATATA
TTAGAAAAAAATTGTATTTTTCTTTTATTTGAGTCTACTGTCAAGGAGCAAAACAGA
GAAATGTAAATTAGCAATTATTTATAATACTTAAAGGGAAGAAAGTTGTTACCTTG
TTGAATCTATTATTGTTATTTCAATTATAGTCCCAAGACGTGAAGAAATAGCTTTCCT
AATGGTTATGTGATTGTCTCATAGTGACTACTTTCTTGAGGATGTAGCCACGGCAA
ATGAAATAAAAAAATTTAAAAAATTGTTGCAAATACAAGTTATATTAGGCTTTTGTGC
ATTTTCAATAATGTGCTGCTATGAACTCAGAATGATAGTATTTAAATATAGAACTA
GTTAAAGGAAACGTAGTTTCTATTTGAGTTATACATATCTGTAAATTAGAACTTCTC
CTGTTAAAGGCATAATAAAGTGCTTAATACTTTTGTTCCTCAGCACCCCTCTCATTTA
ATTATATAATTTTAGTTCTGAAAGGGACCTATAACCAGATGCCTAGAGGAAATTTCAA
AACTATGATCTAATGAAAAAATATTTAATAGTTCTCCATGCAAATACAAATCATATA
GTTTTCCAGAAAATACCTTTGACATTATACAAAGATGATTATCACAGCATTATAATA
GTAAAAAATGGAAATAGCCTCTTTCTTCTGTTCTGTTTCATAGCACAGTGCCTCATA
CGCAGTAGGTTATTATTACATGGTAACTGGCTACCCCAACTGATTAGGAAAGAAGTA
AATTTGTTTTATAAAAATACATACTCATTGAGGTGCATAGAATAATTAAGAAATTA
AAGACACTTGTAATTTTGAATCCAGTGAATACCCACTGTTAATATTTGGTATATCTCT
TTCTAGTCTTTTTTTCCCTTTTGCATGTATTTTCTTTAAGACTCCCACCCCACTGGAT

CATCTCTGCATGTTCTAATCTGCTTTTTTCACAGCAGATTCTAAGCCTCTTTGAATAT
CAACACAAACTTCAACAACCTTCATCTATAGATGCCAAATAATAAATTCATTTTTATT
TACTTAACCACTTCCCTTTGGATGCTTAGGTCATTCTGATGTTTTGCTATTGAAACCAA
TGCTATACTGAACACTTCTGTCACTAAAACCTTTGCACACACTCATGAATAGCTTCTTA
GGATAAATTTTTAGAGATGGATTTGCTAAATCAGAGACCATTTTTTAAAATTAATAA
ACAATTATTCATATCGTTTGGCATGTAAGACAGTAAATTTTCCTTTTATTTTGACAGG
ATTCAACTGGAAGCTTTGTGCTGCCTTTCCGGCAAGTCATGTATGCTCCATATCCCAC
CACACACATAGATGTGGATGTCAATACTGTGAAGCAGATGCCACCCTGTCATGAAC
ATATTTATAATCAGCGTAGATACATGAGATCCGAGCTGACAGCCTTCTGGAGAGCCA
CTTCAGAAGAAGACATGGCTCAGGATACGATCATCTACACTGACGAAAGCTTTACTC
CTGATTTGTACGTAATGCTCTGCCTGCTGGTACTGTAGTCAAGCAATATGAAATTGT
GTCTTTTACGAATAAAAACAAAACAGAAGTTGCATTTAAAAAGAAAGAAATATTAC
CAGCAGAATTATGCTTGAAGAAACATTTAATCAAGCATTTTTTTCTTAAATGTTCTTC
TTTTTCCATACAATTGTGTTTACCCTAAAATAGGTAAGATTAACCCTTAAAGTAAAT
ATTTAACTATTTGTTTAAATAAATATATATTGAGCTCCTAGGCACTGTTCTAGGTACCG
GGCTTAATAGTGGCCAACCAGACAGCCCCAGCCCCAGCCCCCTACATTGTGTATAGTC
TATTATGTAACAGTTATTGAATGGACTTATTAACAAAACCAAAGAAGTAATTCTAAG
TCTTTTTTTTTCTTGACATATGAATATAAAATACAGCAAAACTGTTAAAATATATTAAT
GGAACATTTTTTTACTTTGCATTTTATATTGTTATTCACTTCTTATTTTTTTTTAAAA
AAAAAGCCTGAACAGTAAATTCAAAAGGAAAAGTAATGATAATTAATTGTTGAGCA
TGGACCCAACCTGAAAAAAAATGATGATGATAAATCTATAATCCTAAAACCTA
AGTAAACACTTAAAAGATGTTCTGAAATCAGGAAAAGAATTATAGTATACTTTTGTG
TTTCTCTTTTATCAGTTGAAAAAAGGCACAGTAGCTCATGCCTGTAAGAACAGAGCT
TTGGGAGTGCAAGGCAGGCGGATCACTTGAGGCCAGGAGTTCCAGACCAGCCTGGG
CAACATAGTGAAACCCCATCTCTACAAAAAATAAAAAAGAATTATTGGAATGTGTT
TCTGTGTGCCTGTAATCCTAGCTATTCCGAAAGCTGAGGCAGGAGGATCTTTTGAGC
CCAGGAGTTTGAGGTTACAGGGAGTTATGATGTGCCAGTGTACTCCAGCCTGGGGA
ACACCGAGACTCTGTCTTATTTAAAAAAAATGCTTGAATAATGC
CTGGCACATAGAAGGTAACAGTAAGTGTTAACTGTAATAACCCAGGTCTAAGTGTG
TAAGGCAATAGAAAAATTGGGGCAAATAAGCCTGACCTATGTATCTACAGAATCAG
TTTGAGCTTAGGTAACAGACCTGTGGAGCACCAGTAATTACACAGTAAGTGTAAACC
AAAAGCATAGAATAGGAATATCTTGTTCAAGGGACCCCCAGCCTTATACATCTCAA
GGTGCAGAAAGATGACTTAATATAGGACCCATTTTTTCTAGTCTCCAGAGTTTTT
ATTGGTTCTTGAGAAAGTAGTAGGGGAATGTTTTAGAAAATGAATTGGTCCAACCTGA
AATTACATGTCAGTAAGTTTTTATATATTGGTAAATTTTAGTAGACATGTAGAAGTTT
TCTAATTAATCTGTGCCTTGAACATTTTCTTTTTTCTTAAAGTGCTTAGTATTTTTTC
CGTTTTTTGATTGGTACTTGGGAGCTTTTTTGAGGAAATTTAGTGAACCTGCAGAATG
GGTTTGCAACCATTTGGTATTTTTGTTTTGTTTTTAGAGGATGTATGTGTATTTAAC
ATTTCTAATCATTTTTAGCCAGCTATGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTTTGTGTT
AGACAGCTATTCTCATTTTGCTGATCATGACAAAATAATATCCTGAATTTTTAAATTT

TGCATCCAGCTCTAAATTTTCTAAACATAAAAATTGTCCAAAAAATAGTATTTTCAGC
CACTAGATTGTGTGTTAAGTCTATTGTCACAGAGTCATTTTACTTTTAAGTATATGTT
TTTACATGTTAATTATGTTTGTATTTTTAATTTTAACTTTTTAAAATAATTCCAGTCA
CTGCCAATACATGAAAAATTGGTCACTGGAATTTTTTTTTTACTTTTTATTTTAGGTT
CATGTGTACATGTGCAGGTGTGTTATACAGGTAAATTGCGTGTGCATGAGGGTTTGGT
GTACAGGTGATTTTATTACCCAGGTAATAAGCATAGTACCCAATAGGTAGTTTTTTG
ATCCTCACCTTCTCCCACCCTCAAGTAGGCCCTGGTGTGCTGTTTCTTCTTTGTG
TCCATGTATACTCAGTGTTTAGCTCCCCTTAGAAGTGAGAACATGCGGTAGTTGGT
TTTCTGTTCTGGATTAGTTCACTTAGGATAATGACCTCTAGCTCCATCTGGTTTTTA
TGGCTGCATAGTATTCCATGGTGTATATGTATCACATTTTCTTTATCCAGTCTACCAT
TGATAGGCATTTAGGTTGATTCCCTGTCTTTGTTATCATGAATAGTGCTGTGATGAAC
ATACACATGCATGTGTCTTTATGGTAGAAAAATTTGTATTCCTTTAGGTACATATAG
ATAAATGGGGTTGCTAGGGTGAATGGTAGTTCTATTTTCAGTTATTTGAGAAATCTT
CAAAGTCTTTTCATAATAGCTAAACTAATTTACAGTCCCGCCAGCAGTGTATAAGT
GTTCCCTTTTCTCCACAACCTTGCCAACATCTGTGATTTTTTACTTTTTAATAATAG
CCATTCCTAGAGAATTGATTTGCAATTCTCTATTAGTGATATTAAGCATTTTTTCATA
TGCTTTTTAGCTGTCTGTATATATTCTTCTGAAAAATTTTCATGTCCTTTGCCAGTTT
GTAGTGGGGTGGGTTGTTTTTTGCTTGTTAATTAGTTTTAAGTTCCTTCAGATTCTG
CATATCCCTTTGTTGGATACATGGTTTGCAGATATTTTTCTCCATTGTGTAGGTTGT
CTTTTACTCTGTTGATAGTTTCTTTTGCCATGCAGGAGCTCGTTAGGTCCCATTTGTG
TTTGTTTTTGTTGCAGTTGCTTTTGGCGTCTTCATCATAAAATCTGTGCCAGGGCCTA
TGTCAGAATGGTATTTCTAGGTTGTCTTCCAGGGTTTTTACAATTTTAGATTTTAC
GTTTATGTCTTTAATCCATCTTGAGTTGATTTTTGTATATGGCACAAGGAAGGGGTCC
AGTTTCACTCCAATTCCTATGGCTAGCAATTATCCAGCACCATTATTGAATACGG
AGTCTTTCCCATGCTTGTTTTTTGTCAACTTTGTTGAAGATCAGATGGTTGTAAG
TGTGTGGCTTTATTTCTGGCTCTCTATTCTCCATTGGTCTATGTGTCTGTTTTATAA
CAGTACCCTGCTGTTTCAAGTTTCTATAGCCTTTTAGTATAAAATCGGCTAATGTGAT
GCCTCCAGCTTTGTTCTTTTTGCTTAGGATTGCTTTGGCTATTTGGGCTCCTTTTTGGG
TCCATATTAATTTTAAAACAGTTTTTTCTGGTTTTTGTGAAGGATATCATTGGTAGTTT
ATAGGAATAGCATTGAATCTGTAGATTGCTTTGGGCAGTATGGCCATTTTAAACAATA
TTAATTCTTCTATCTATGAATATGGAATGTTTTTCCATGTGTTTGTGTGCATCTTTTA
TACCTGATGTATAAAGAAAAGCTGGTATTATTCCTACTCAATCTGTTCCAAAAAATT
GAGGAGGAGGAAGTCTTCCCTAATGAGGCCAGCATATTCTGATACCAAAACCTGG
CAGAGACACAACAGAAAAAAGAAAACCTCAGGCCAATATCCTTGATGAATATAGAT
GCAAAAATCCTCAACAAAATACTAGCAAACCAATCCAGCAGCACATCAAAAAGCT
GATCTACTTTGATCAAGTAGGCTTTATCCCTGGGATGCAAGGTTGGTTCAACATACA
CAAATCAATAAGTGTGATTCATCACATAAACAGAGCTAAAAACAAAACCACAAGA
TTATCTCAATAGGTAGAGAAAAGGTTGTCAATAAAATTTAACATCCTCCATGTTAAA
AACCTTCAGTAGGTCAGGTGTAGTGACTCACACCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGG
CCAAGGCGGGCATATCTCTTAAGCCAGGAGTTCAAGACGAGCCTAGGCAGCATGG

TGAAACCCCATCTCTACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTAGCTTGGTATGGTGAC
ATGCACCTATAGTCCCAGCTATTCAGGAGGTTGAGGTGGGAGGATTGTTTGAGCCCG
GGAGGCAGAGGTTGGCAGCGAGCTGAGATCATGCCACCGCACTCCAGCCTGGGCAA
CGGAGTGAGACCCTGTCTCAAAAAAGAAAAATCACAAACAATCCTAAACAAACTAG
GCATTGAAGGAACATGCCTCAAAAAATAAGAACCATCTATGACAGACCCATAGCC
AATATCTTACCAAATGGGCAAAAGCTGGAAGTATTCTCCTTGAGAACCGTAACAAG
ACAAGGATGTCCACTCTCACCCTCCTTTTCAGCATAGTTCTGGAAGTCCTAGCCAG
AGCAATCAGGAAAGAGAAAGAAAGAAAGACATTCAGATAGGAAGAGAAGAAGTCA
AACTATTTCTGTTTGCAGGCAGTATAATTCTGTACCTAGAAAATCTCATAGTCTCTGC
CCAGAAACTCCTAAATCTGTTAAAAATTTTCAGCAAAGTTTTGGCATTCTCTATACTC
CAACACCTTCCAAAGTGAGAGCAAATCAAGAACACAGTCCCATTACAAATAGCCG
CAAAACGAATAAAATACCTAGGAATCCAGCTAACCAGGGAGGTGAAAGATCTCTAT
GAGAATTACAAAACACTGCTGAAAGAAATCAGAGATGACACAAAACAAATGGAAAT
GTTCTTTTTTAACACCTTGCTTTATCTAATTCACTTATGATGAAGATACTCATTCAGT
GGAACAGGTATAATAAGTCCACTCGATTAATATAAGCCTTATTCTCTTTCCAGAGC
CCAAGAAGGGGCACTATCAGTGCCCAGTCAATAATGACGAAATGCTAATATTTTTCC
CCTTTACGGTTTTCTTTCTTCTGTAGTGTGGTACACTCGTTTTCTTAAGATAAGGAACT
TGAACCTCCTGTTTGCTTCTACACATACCCATTCTCTTTTTTTGCCACTCTGGTC
AGGTATAGGATGATCCCTACCCTTTCAGTTAAAACTCCTCCTCTTACTAAATGTTT
TCTTACCCTCTGGCCTGAGTAGAACCTAGGGAAAATGGAAGAGAAAAAGATGAAAG
GGAGGTGGGGCCTGGGAAGGGAATAAGTAGTCTGTTTGTGTGTTTGTCTTTAG
CACCTGCTATATCCTAGGTGCTGTGTTAGGCACACATTATTTAAGTGGCCATTATAT
TACTACTACTACTCTGGTCGTTGCCAAGGTAGGTAGTACTTTCTTGGATAGTTGGTT
CATGTTACTTACAGATGGTGGGCTTGTGAGGCAAACCCAGTGGATAATCATCGGAG
TGTGTTCTCTAATCTCACTCAAATTTTTCTTCACATTTTTTTGGTTTTGTTTTGGTTTTG
ATGGTAGTGGCTTATTTTTGTTGCTGGTTTGTTTTTTTGTTTTTTTTGAGATGGCAAGA
ATTGGTAGTTTTATTTATTAATTGCCTAAGGGTCTCTACTTTTTTTAAAAGATGAGAG
TAGTAAAATAGATTGATAGATACATACATACCCTTACTGGGGACTGCTTATATTCTT
TAGAGAAAAAATTACATATTAGCCTGACAAACACCAGTAAAATGTAAATATATCCT
TGAGTAAATAAATGAATGTATATTTTGTGTCTCCAAATATATATATCTATATTCTTAC
AAATGTGTTTATATGTAATATCAATTTATAAGA ACTTAAAATGTTGGCTCAAGTGAG
GGATTGTGGAAGGTAGCATTATATGGCCATTTCAACATTTGAACTTTTTTCTTTTCTT
CATTTTCTTCTTTTCTTCAGGAATATTTTTCAAGATGTCTTACACAGAGACACTCTAG
TGAAAGCCTCCTGGATCAGGTAAATGTTGAACTTGAGATTGTCAGAGTGAATGATA
TGACATGTTTTCTTTTTTAATATATCCTACAATGCCTGTTCTATATATTTATATTCCCC
TGGATCATGCCCCAGAGTTCTGCTCAGCAATTGCAGTTAAGTTAGTTACACTACAGT
TCTCAGAAGAGTCTGTGAGGGCATGTCAAGTGCATCATTACATTGGTTGCCTCTTGT
CCTAGATTTATGCTTCGGGAATTCAGACCTTTGTTTACAATATAATAAATATTATTGC
TATCTTTTAAAGATATAATAATAAGATATAAAGTTGACCACA ACTACTGTTTTTTGA
AACATAGAATTCTGGTTTACATGTATCAAAGTGAAATCTGACTTAGCTTTTACAGA

TATAATATATACATATATATATATCCTGCAATGCTTGTACTATATATGTAGTACAAGTAT
ATATATATGTTTGTGTGTGTATATATATATAGTACGAGCATATATACATATTACCAG
CATTGTAGGATATATATATGTTTATATATTAATAAAAGTTATAAACTTAAAACCCT
ATTATGTTATGTAGAGTATATGTTATATATGATATGTAAAATATATAACATATACTCT
ATGATAGAGTGTAATATATTTTTTATATATATTTTAAACATTTATAAAATGATAGAATT
AAGAATTGAGTCCTAATCTGTTTTATTAGGTGCTTTTTGTAGTGTCTGGTCTTTCTAA
AGTGTCTAAATGATTTTTCTTTTTGACTTATTAATGGGGAAGAGCCTGTATATTAACA
ATTAAGAGTGCAGCATTCCATACGTCAAACAACAAACATTTTAATTCAAGCATTAAAC
CTATAACAAGTAAGTTTTTTTTTTTTTTTTGAGAAAGGGAGGTTGTTTATTTGCCTGA
AATGACTCAAAAATATTTTTGAAACATAGTGTACTTATTTAAATAACATCTTTATTGT
TTCATTCTTTTAAAAAATATCTACTTAATTACACAGTTGAAGGAAATCGTAGATTAT
ATGGAACTTATTTCTTAATATATTACAGTTTGTTATAATAACATTCTGGGGATCAGGC
CAGGAACTGTGTCATAGATAAAGCTTTGAAATAATGAGATCCTTATGTTTACTAGA
AATTTTGGATTGAGATCTATGAGGTCTGTGACATATTGCGAAGTTCAAGGAAAATTC
GTAGGCCTGGAATTTTCATGCTTCTCAAGCTGACATAAAATCCCTCCACTCTCCACC
TCATCATATGCACACATTCTACTCCTACCCACCCACTCCACCCCCTGCAAAAGTACA
GGTATATGAATGTCTCAAACCATAGGCTCATCTTCTAGGAGCTTCAATGTTATTTG
AAGATTTGGGCAGAAAAAATTAAGTAATACGAAATAACTTATGTATGAGTTTTAAA
AGTGAAGTAAACATGGATGTATTCTGAAGTAGAATGCAAAATTTGAATGCATTTTTA
AAGATAAATTAGAAAATTCTAAAAACTGTCAGATTGTCTGGGCCTGGTGGCTTATG
CCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGTCCGAGGTGGGTGGATCACAAGGTCAGGAGAT
CGAGACCATCCTGCCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAGTATACAAAAATTAG
CTGGGCGTGGCAGCGTGTGCCTGTAATCCCAGCTACCTGGGAGGCTGAGGCAGGAG
AATCGCTTGAACCCAGGAGGTGTAGGTTGCAGTGAGTCAAGATCGCGCCACTGCAC
TTTAGCCTGGTGACAGAGCTAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATATCAGATT
GTTCTACACCTAGTGCTTCTATAACCACACTCCTGTTAGGGGGCATCAGTGGAAATG
GTTAAGGAGATGTTTAGTGTGTATTGTCTGCCAAGCACTGTCAACACTGTCATAGAA
ACTTCTGTACGAGTAGAATGTGAGCAAATTATGTGTTGAAATGGTTCCTCTCCCTGC
AGGTCTTTCAGCTGAAACCTGGCTTATCTCTCAGAAGTACTTTCCTTGCACAGTTTCT
ACTTGTCTTACAGAAAAGCCTTGACACTAATAAAATATATAGAAGACGATACGT
GAGTAAACTCCTACACGGAAGAAAAACCTTTGTACATTGTTTTTTTTGTTTTGTTTTCC
TTTTGTACATTTTCTATATCATAATTTTTGCGCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
CCATTATTTTAGGCAGAAGGGAAAAAAGCCCTTAAATCTCTTCGGAACCTGAAGA
TAGACCTTGATTTAACAGCAGAGGGCGATCTTAACATAATAATGGCTCTGGCTGAGA
AAATTAACCAGGCCTACACTCTTTTATCTTTGGAAGACCTTCTACACTAGTGTGC
AAGAACGAGATGTTCTAATGACTTTTTAAATGTGTAACCTTAATAAGCCTATTCCATC
ACAATCATGATCGCTGGTAAAGTAGCTCAGTGGTGTGGGGAACGTTCCCCTGGATC
ATACTCCAGAATTCTGCTCTCAGCAATTGCAGTTAAGTAAGTTACACTACAGTTCTC
ACAAGAGCCTGTGAGGGGATGTCAGGTGCATCATTACATTGGGTGTCTCTTTTCCTA
GATTTATGCTTTTGGGATACAGACCTATGTTTACAATATAATAAATATTATTGCTATC

TTTTAAAGATATAATAATAGGATGTAACTTGACCACAACACTACTGTTTTTTTTGAAAT
ACATGATTCATGGTTTACATGTGTCAAGGTGAAATCTGAGTTGGCTTTTACAGATAG
TTGACTTTCTATCTTTTGGCATTCTTTGGTGTGTAGAATTACTGTAATACTTCTGCAA
TCAACTGAAAACACTAGAGCCTTTAAATGATTTCAATTCCACAGAAAGAAAGTGAGCTT
GAACATAGGATGAGCTTTAGAAAAGAAAATTGATCAAGCAGATGTTTAATTGGAATT
GATTATTAGATCCTACTTTGTGGATTTAGTCCCTGGGATTCAGTCTGTAGAAATGTCT
AATAGTTCTCTATAGTCCTTGTTCCTGGTGAACCACAGTTAGGGTGTTTTTGTTTTATTT
TATTGTTCTTGCTATTGTTGATATTCTATGTAGTTGAGCTCTGTAAAAGGAAATTGTA
TTTTATGTTTTAGTAATTGTTGCCAACTTTTTAAATTAATTTTCATTATTTTTGAGCCA
AATTGAAATGTGCACCTCCTGTGCCTTTTTTCTCCTTAGAAAATCTAATTACTTGGAA
CAAGTTCAGATTTCACTGGTCAGTCATTTTCATCTTGTTTTTCTTCTTGCTAAGTCTTAC
CATGTACCTGCTTTGGCAATCATTGCAACTCTGAGATTATAAAATGCCTTAGAGAAT
ATACTAACTAATAAGATCTTTTTTTTCAGAAACAGAAAATAGTTCCTTGAGTACTTCC
TTCTTGCAATTTCTGCCTATGTTTTTGAAGTTGTTGCTGTTTGCCTGCAATAGGCTATA
AGGAATAGCAGGAGAAATTTTACTGAAGTGCTGTTTTCTAGGTGCTACTTTGGCAG
AGCTAAGTTATCTTTTGTCTTAAATGCGTTTGGACCATTTTGTGGCTATAAAATA
ACTGATTAATATAATTCTAACACAATGTTGACATTGTAGTTACACAAACACAAATAA
ATATTTTATTTAAAATTCTGGAAGTAATATAAAAGGGAAAATATATTTATAAGAAAG
GGATAAAGGTAATAGAGCCCTTCTGCCCCCACCACCAAATTTACACAACAAAAT
GACATGTTCGAATGTGAAAGGTCATAATAGCTTTCCCATCATGAATCAGAAAGATGT
GGACAGCTTGATGTTTTAGACAACCACTGAACTAGATGACTGTTGTACTGTAGCTCA
GTCATTTAAAAAATATATAAATACTACCTTGTAGTGTCCATACTGTGTTTTTTACAT
GGTAGATTCTTATTTAAGTGCTAACTGGTTATTTTTCTTTGGCTGGTTTATTGTACTGTT
ATACAGAATGTAAGTTGTACAGTGAAATAAGTTATTAAGCATGTGTAAACATTGTT
ATATATCTTTTCTCCTAAATGGAGAATTTTGAATAAAATATATTTGAAATTTTGCCTC
TTTCAGTTGTTCAATCAGAAAAAATACTATGATATTTGAAGACTGATCAGCTTCTG
TTCAGCTGACAGTCATGCTGGATCTAAACTTTTTTTAAAATTAATTTTGTCTTTTCAA
AGAAAAAATATTTAAAGAAGCTTTATAATATAATCTTATGTTAAAAAACTTTCTGC
TTAACTCTCTGGATTTCAATTTTGATTTTTCAAATTATATATTAATATTTCAAATGTAA
AATACTATTTAGATAAATTGTTTTTAAACATTCTTATTATTATAATATTAATATAACC
TAAACTGAAGTTATTCATCCCAGGTATCTAATACATGTATCCAAAGTAAAAATCCAA
GGAATCTGAACACTTTCATCTGCAAAGCTAGGAATAGGTTTGACATTTTCACTCCAA
GAAAAAGTTTTTTTTTGAATAAGTATAGTTGGGATGAGAGGTTTCTTTAAAAGAAG
ACTAACTGATCACATTACTATGATTCTCAAAGAAGAAACCAAACTTCATATAATAC
TATAAAGTAAATATAAAATAGTTCCTTCTATAGTATATTTCTATAATGCTACAGTTTA
AACAGATCACTCTTATATAATACTATTTTGATTTTGATGTAGAATTGCACAAATTGAT
ATTTCTCCTATGATCTGCAGGGTATAGCTTAAAGTAACAAAAACAGTCAACCACCTC
CATTTAACACACAGTAACACTATGGGACTAGTTTTTATTACTTCCATTTTACAAATGA
GGAAACTAAAGCTTAAAGATGTGTAATACACCGCCCAAGGTCACACAGCTGGTAAA
GGTGGATTTTCATCCCAGACAGTTACAGTCATTGCCATGGGCACAGCTCCTAACTTAG

TAACTCCATGTA ACTGGTACTCAGTGTAGCTGAATTGAAAGGAGAGTAAGGAAGCA
GGTTTTACAGGTCTACTTGC ACTATT CAGAGCCCGAGTGTGAATCCCTGCTGTGCTG
CTTGGAGAAGTTACTTAACTATGCAAGGTTCA TTTTG TAAATATTGGAAATGGAGT
GATAATACGTACTTCACCAGAGGATTTAATGAGACCTTATACGATCCTTAGTTCAGT
ACCTGACTAGTGCTTCATAAATGCTTTTTTCATCCAATCTGACAATCTCCAGCTTG TAA
TTGGGGCATT TAGAACATTTAATATGATTATTGGCATGGTAGGTTAAAGCTGTCATC
TTGCTGTTTTCTATTTGTTCTTTTTGTTTTCTCCTTACTTTTGGATTTTTTTATTCTACT
ATGTCTTTTTCTATTGTCTTATTA ACTATACTCTTTGATTTATTTTAGTGGTTGTTTTAG
GGTTATACCTCTTTCTAATTTACCAGTTTATAACCAGTTTATATACTACTTGACATAT
AGCTTAAGAACTTACTGTTGTTGTCTTTTTGCTGTTATGGTCTTAACGTTTTTTATTTT
TACAAACATTATAAACTCCACACTTTATTGTTTTTTAATTTTACTTATACAGTCAATT
ATCTTTTAAAGATATTTAAATATAAACATTCAA AACACCCCAATTA AAAGTCAGAGA
TTGTTAATACCACATGATCTCACTTACACACAGAATTGAAAACTTGGA ACTCATAG
AAGCAGAGAGTAAAAACATGGTTACCAGGTGCTGGGGAGAGGGCGGTGGGCTGGGG
AGATGTTGGTCAAAGTTAGACAGGAGGAATAAGTTCAAGAGATCTATTGTACA ACT
TATTCAGTTAGATAGGAGGAATAAGCTAAAGATCAAGAGATCTATTGTACAATGTG
ACTATAACCAACAACATATATTGTACACTTGAAAATTGCTAACAGTATCTTTTAAGT
GTTCTCTCTACAAATAAATATGTGAGGTAATGTATATATTAATTA ACTGTAGTCATTT
CACAATGTATACTTATTTCAAACATCATATTGTATGCTATAAATATATACA ACTTTT
ATTTTTCAATTTTAGAAATGTCCTTAAAAAATCAGATTTTCAGATCAGATAAAAAAG
CAAGACCCA ACTATATGCTGCCAACAGGAAACACACCTTAAAAATAAAGGACGAAC
AAACAGATTA AAAGTAAAAGGATGGAGAAAAGATACATCATATTGGTAATTAGAAG
AAA ACTGGAGTGACAATATGAAACAAAATAGATTT CAGAGCAAAGAATATTACCAG
GGGTAAAAATGATCATTTTATAATGATAAAAGAGTCAGTTCAGCAA AAGGATATAA
CAGTCCTAAATGTTTTTTT CACCTCATAGCTGTGTCAA AATAGATGAAGCAAAA ACTG
ATAGA ACTGTAAGAAGTAGACAAGTCCACAATTATGTTTGGAGATTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCAGGATCTCAGCTCACTGCAAGCTCCG
CCTCCAGGTT CACGCCATTCTCCTGCTTCAGCCTCCCAGTAGCTGGGACTACAGG
CGGCCACCACCACGCCTGGCTAATTTTTTTTGTATTTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACC
GTGTTAGCCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTCGTGATCTGCCTGCCTCGGCCTCCC
AAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGCACGCAGCCTGGAGATTTTAATATC
CTTTCAATGTTTAGTAGAACAAGAATACACAAAATCAGTAAGGATATAGAAGATTA
GAACAAGACTATCAAACAATTTGACTTAAATGACATTTGTAGAGCACAGCAGTCCC
CAACAACAATAAATCACACATTCTTTCCAAGAGTACATGAAACATGTACCAAGATA
GACCGTATTTTTGAGCCATGAAACAAATCTTGATAAATTTAAAAGGATTC AAGTCATA
GAAAATATGTTCTCTGACCACAATGGAATTA AATTATTAACCAATAACAAATATCTG
GGAAAACCTCAAAA ACTTGACACCAGCGCTTTTAAAAGACTAAATAATTTCTAAA
TTATCTGTGTTGGGGGGAAAAGAGAAATGGATTAGAGAGCAAAAAGGGTATCAGAG
TGCTGTGGTACGATTTTTATGAAGAGTGGAAACAGAATCTGCCTTTGGCGTTTCCCCA
CTACAGCCCATTCTTCACATTGATAACAGCATGATCCTTCTAAAATTAATCTAACG

ATCACTTCTGCTTAATGGCTCTCCAACACTTACAGAATTAGGTCCAAAATTCTAGCA
CAGTTTCTGTTTCATCTTTCTAACCTTTCTTCCCACAGGTCTAGCTAGTACGTATTTCTT
TTATTGCATTTATTACACTATTCCTTTGCTTATCTATCTCCCCACCTAGGCTAAAGAA
CAAGATTCTTGTCTTTTTTCATTTTTGTGTCTCAGTGCCTAGCATGGTGCCAGGCACAC
AGCATGCTTCCAGTAAATGTTAGCTGGATGGATGTAATGAGTATATTAATATTAAT
TTATTTGTTTTTTCCCCAAAAAGAATTATTTCTGCAAATCAAGGAAATTGCTTTCTTT
ATATAATCAAAAACCTTATTTTTCCCAGAAGATTCTTCATTAATAAATAAGCCTATGCA
CAACCTAGCTCTAAAGTTTCAAAGATTTTAGGCAGCAATTTTTCAATCTTTTTGAAGT
AATACATTTGAATCTTTTCAAATTTCTGTTTCTGCATTTGTGCCACACCATCTCATCT
CTTGCTGAAATGTTTTTGTAAATTAATTGCTTGATAAATTGCTAAGTACTTTTCATC
AGACCAATTAGGACAATAGTAAGTATCCATCTGTGGAGCGCGGACATTCAAGAAAT
CTGATCCAGTATTTAGAAAGTCATTCCTGAGCTGAGTTGGCTCAAACCTGGCACCTTC
TGGCATTTGCTTGTGGGTGGGGAATGTGGAATGCTTTGAAAGCTGAATGAGTTTGTG
AAGTTTTAAAATTCCTTATGGCTAAAGGAAAACAACATTCATTGTTTAAAAACACC
ATTGTTTGTTTTTTCTGCTTTTTTGTCTTTGGAGCCTGAATCTGAAAAACACTCAC
ACCCAGCATTTTGCTTCATGTACCACTCCTAAGATGTTTTTAGAGACTTGAATAGTGT
CTCCGCACTACTTTTTATTGTGATTGTTTCTGAGAAATGTTTATAACAATGGTAAAAAGT
CAGTTTTAGTGCTCAAATTGAGTTTTATGGAGAAAGACCATAATTTATGTTTGTGATT
GTAAATTGATAGGAGAATTTTTGGAAGTTTGCCTCCTAGAACCAGATTTCCAAGGCT
CAGATCCTTATTTTCTCACTTCTAGCTGTGTGACCTTAGACAAGGTATTAACCTGT
CTGTGCTGCCTCAGTGTCTCATCTATTCTTTAAGAGTAAGAATAGAACCTACCCGA
TAGAGTCACTTGAAGATTAAGTGGGTTAGTAAATTCAGAATGCTTGGAACAGTAACT
AGCACAGAATAAGTGTCCAATAAAATTGGGTTGCAGCTATTATCAGTATTATTCCTG
TCATAATCATCATCACCATTAAGCAATTAATGTAGAGTTCCAAAATTTGATTATGA
AACTACAGTTATACAGCCATGATTCCCGGTGATACCACGTCAGTAACAAGATTATTT
CCTTAGCTTGAGCCAGTCACTACCTCATTGCATGTGGCAGAGTGTGTTGCCGTAGGC
AAATGTCATTGTAGGGAATGAAAAAAAATTGCCTGTGAGCTGCTCTCCAGAGGCC
TCATCCCATTTTCCATCGTCCACTTTACTCCATCTCCACTGCCACTATTAGGACCTT
ATCATTTCTTGTCTAGATTAATTCAACAGCTTCCTTCCTTCTAGTCTCCATGATTTTAC
CCACTAGCCATCCCCTCCCCTTTGCCCAATTTTCTCCATTTATGGTAGAGTGATCTTT
CTAATAGGAAACTCCTGACTTGCTTAAAAAGCCCTCATTGAGGCCGGACGTGGTGG
CTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCACGAGGTCA
AGAGATTGAGACCATCGTGACTAACACAGTGAAACCCCATCTGTACTAAAAATACA
AGAAATTAGCCAGGCGTGGTGGCGGGTGCCTGTAGTCGCAGCTACTTGGGAGGCTG
AGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGCAGAGCTTGCAGTGAGCCGAGATTGC
GCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGTGAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAGC
CCTCATTGACAACCTTCAACCCACAATCCATGGTGAAGCACAGGAGCCTTGGGGATC
TGCCCCCAGCACACCTCTCCACCCTTGTCTCTCACTGCTCCTGCCTTCATGGAGAGCC
CTGATGAACTATTTGTAGTTTCCCCTGACTCACCTTGCTGTTACTGGGCCTGTGTGCG
TGTTGCTCCCACTACCTGCAATACGCTTACCACTTCACCTGGGTGAACTTTACTTAG

GATTCACCTTAGGTGGGCATCATGTTCTTCCAGGCCCTCCTCTAACTTTTAGTTGAG
AGTATTCCAGACTTAAGGCTCCATGGGATAGGGATCTTGTCTATGCACCAGCTTATT
CCCAACTGCCTGGCACGTAATGCATTTATTAATATATATTGAATTGATTACCCTACT
TGGGGCTCTTGTGGCTTCTACACTTACAGTTCTAGCATAGCACTTAACTCATTATCA
TGCATCATTATTATGGGTTTGTGGTCTCCATTAGACTGTGAGCTCCACAAGGCTG
TGTCTTGTCTTATACATCATTGTATTTCCAGCTTCCAACATAGTGCTTGCCATGACA
CAGGAAGTCAGTAAGCTCTGAATGAATGAATAGTATCTACATACCATTAATCTGAG
GTTTAAAGTTTCCCCAAATTCTGAAGCAAGGGGATTTACGGACTTCCCTGACAATTT
TTGGATGTCATCCCAATGATACCACTAACATTTTAAAGGGACAGCTTGCATATATACA
TTTTTCTGGATGGCAGTTTTTTTTTCCACAGGCTTCATCAGATATTTCTCCATAGCCTT
CCTCAGATTCTCAAAGGGGTCTCTGATTCCCCCAAAGATAAGAACTGTCATAAAA
AATTATTTCTAAATATCAATTGTTAAATAAAATGTTTGCAAAGCAGCCTGATGAATC
ATTTCCAGGCCACTTGACCCCGATGAGTTAGAGAGTTTGTGCTCTGCAATCTGACTGC
TTCCAGCAGTCTCACTGCTGCTGGACTGTGGCACTTCCAATTGGCAGCAGGGCAAGT
TTCTTCTGGATGAATATTCTGTCATAGGGGTCCCCCTTCCACACATACCTGTAGGAG
CAGTTTGAAACTCATATGCATGGTCTTCTGGTTCTAGGCACATGAGTCATTTAAGC
TGCTGGAGCCAGGACCAGCTAGTATGCTAGCCCGGCATTCAGAAAGTTAAAATTTG
GGGTCAAACCTGAGAACCTTCTTTGATCCACCTTGGCCAGACATTTTCTCTGGCTTCC
ATTAATAGCCTCAACATTTTTTTTTTTTTCTGGCCTAGACCCACACAGGCAAGAGACC
AGAGCTTCTCTAAGGAGCTAAGGGAAAGCACATTTTAAAATAACTTGAGCAAATG
AATTCATCTGGCAAAGCAACCCCACTACGTAATAAACCTTTTTTAGTTTCGCAAT
AGCAGTTCCTGAAAATGTAAACAACCTCAGGGTCTACATGCACTGAATCATTGCTG
AACAGAAAGTCCCTGGTCCAAATTCTGCAAGAATAAACACCTTACAAAACCTAGGGG
TCAATGACCTTCATATGGGAACAAGGAGGGTGTGGGGGGCAGCAACCCACCCTGAG
GACAATGAGAAAGTCTTGAGACTTGATATTCAAATGCTGGCTTTCTAAACCAAAA
ACTGGCATGAGTGGAGGGGAGAAGGGGAGGGTGGGCACAGTCTATGCCTCAGGCTCT
TGCTCAGACCCTACCAGGCCCTGCCTTCCCTAGGGAAAGCGAGAGTCTACTCACTG
TCATGAAGCCAGAGGAAGGCCCTGCAGGTTTCACTGTGTGTTCTGTTGACAAGATGA
TGGTTCCATTGAAACTGTAATAACATACTTGGCCAACCTAAGCCATACGATCGTAGT
AACTTTGTACCCAGTCCTAGCTTTTCAAACATAATGATAATATGTTCTTTCTAATGTG
GCCATACTGTTCTAATGAACTTATGCTGAGTTTTTCTGAGTACTAGAATAATATTG
CCATAAATAATAGATATAATTATTCTCATTTAATATTTGCGTAGCTCTTCTTTAAAGC
AGAAAGTATTTTCTCATTCCCTACTAGAACCTTTCTGTGTGAGGAGCACTGAGCTAG
AACCCATATCTTAGAATGGTCAGAATTTGGAGAAATTCAGGGAAAAGGCACTGGAC
TCATTTTTTAAAGACTAGAAAATGCAACCTCCAGAAAAAGATTCAAGAGTTTTTTACT
CCCAGAGATGTAGGAAAGATTGGAGTAAATCTTAATATTATATTTCCAGGTAAACAA
AGGATCACTGTCAAATAGCAGCATTTATTGAGTAATGGCTGTGTGCCAGGTACTTT
ACAGTTTACATTTAACCTCATAATAACCTTGTAAGTGGATATCCCCTCAGTACA
TGATGAGAACACTGAAGCTTAGGTTAAATGATTGTCCAAATCGGACAATCATTTTCA
AAATCTCCCCCTTTTTTTCTCCTTTCTTATCTGCAAGGCAGATTGCCCTTTCCCTTTCA

GTGAAACTTGTGCATGACCACATGACTCTCTTTGGCCAATGAAACATGAACAAGCA
GCGTTTATCACTTTCAGATGGAAGGCTTTGCATGAGCTTTGCCTCCTTTTCACTCTGC
CACAGTGGCCACTAACATTCCAGATAGTGGCGCTCTGCAGGCTAGGTCCTATAGTGG
GAGCTATGGGCAGAGCCCCCTTTCCACCCCATCAAGATGTGCATGCTGCATAAGC
CATGCATTAATCTTTGCAGTTTTAAGCCACTAAGTTTTGGAGTTATATTAATCATTAA
TCATGGTTCTCAAGAGAAACAGAGTGGGGGAGTGGTATTCAATTATGGGAATTGGCTT
ACATGATTATGGAAGCTGAGTAGTCCCCAGTCTGCTGTTTTTGGAGCTGGAGAACTA
GAGGAGCCAGTGGTATAATTCAGCCCAAGCCTGAAGGCCTGAGAAATGGGATGGGG
GAATTGGGAGGGTGGGTGTGCTAGGGTAGGATAAGTCCTGAAGTTCAAAGGCCAGC
CAGAAGGTGGATGTTTCAGCACCAGAAGAGAGAGCAAATTCGCTTTTCTTCTGCCTT
TTTGTCTCTCTGGGCCCTCAATGGATTGGATGATGCCCTCCACATTGGTAAGGGT
GGATCTTCTATACTCAGTCTGCTAATTTCTTCCAGAAACATCTTCACAGACACATCCA
GAAATAATGTTTTACCAGCTATCTCGGTATCCCTTAGCCTAGTCCATATTTAAAAATT
AATGATCACAAGCAGTTGTTTGTTCACAGCAAAACCTGGGTGACAGACCAAGTG
ACCCAGATGACTAGAATTTGACCTTCTTTTGTGCCCACACCATACTCTGAACTAAC
ATGCTGTGCTGCCTTCCAAGTGGAGAATGATGGCTAAGTATCTTCTACCTAATTTGA
GTCACAGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTTATTAAGTGCAGTGACAAGAATTGTGATTCCC
CAGGGGGCAGATCAAGACTGATAGATAAGAGAAGTGAGGAACATCTGGGGAATGT
CCATTGAAAATTTACTCAGAAGAGAAGAATAATTAATAATAATATGATATATTGA
ATTATAATAATAATATTTTGATGTATTTCTTCCAGGCATGTTTAAGTTATAGACTT
TGAGTATATTTTCTCAAAGGGGGTCTATGTAAGAGACTATTTCTTAATATAGTTCCT
AGCTTGGAATTGCTCTTGCTGGTTAAGCTGAGCTTATTTTATTACAGACTTCACAAC
AATAACGTTTTCTTCACTAGTCAGTACACAAGATGGTCTTCATTTCCAGTTTGGAAAT
CCCACACTATCAGAGCCTGAGACAAGGACTAGTATGCAGTTAGTTTGTGGGAGGT
GATTCAGGAAGTGGGAATGAGAGATCAGTCAGCCTGCAACACGAAGGAGGAAAA
GTCAATATAAGGATGAATTTGGCAATTGGCCGTTTCATGCAACTGGGGCTAAATTTT
GCTTGGCTCTCTAAGAAATGTAAAGAATGCCTCCCGTAATTGCTCACCTCAAGTATT
TATTCATTGGCTCTCATGCTCCATTGGTTGTCCATGAGAACTTTAGCCCTCCCTCGCT
GCAGCACAGACACTGTGCTTTCTCCTAGGCTGAGCAAGCTCCTGCATCTGTGGAAC
CGTCCCGGGCAGATAGTGAAATAATGACTGCTGCGTGCTTGAGATCTGGGAAAGA
GGCCACATCATAAGTGCCTGAAATCAGAGATGTGTCAAGAGATGTGACACAGGGC
ATCTGAGGTGTCTACTGCACCAGCTATAACTCCCTAAACGCTAATCTCAGTTCTTAC
AGAGGGGATGGATGCAAGGGAACAGTCATGATTGAGAGCACCGAAGAAGCTCTGT
ATGAACCTTAGGCAAGTTTCTAATCTCCAAAATGAAGGTAATAATACCCACCATCC
AAGATCTTCGGGAGGAATAGATGAACTAATGTATGTGAAAATGTCCAGCACAGGTC
CTAACCCATAGTAGGTGCTCACCAAATGTTAGTTCCCTGCCCTCCACGTTGTGTGTAT
CCGGAGCTGCACTAGATGCTGAGGCCAAATGGTCTCAAATGTACTTTAACACTTAATG
ACTGAGATTTTTTCTGAGCTGCCTACAGGTTATTGACTATATTCATTATTAATAATAA
TATATATGGCCACTTCAGGCAACTGGGGCTAAATTTTGGCTTGGCTCTCTAAGAAATG
TAAAGAATGCCTCCTGTAATTGCTCACCTCAAGTATTTATTCATTGGCTCTCGTGCTT

TATTGGTTGTCCCTGAGGACTTTAGCCCTCTCTCACTGCAGCACAGACACTGTGCTTT
CTCCTAGTTTCTGTGGCAAGTGACAGGAGCCCACCTCAAACCTAAAGCAAAAGGGAC
TTCATTGGCTCTTGTAGCTAGGAATTCCAGGGTTGGCACTGGCTTTGGGCACTACTG
GATGCAGGAATTCAAACAATGTCTTCAACTCTTTCTTTTGGTGTCTCTCAGCTGTG
CTTCTCTTGTGCTTTCTTTTCCCATTTTACAGATAAGTTCATCCGTAACCTGAGAGAG
GTGAAAAGGGGATGGCTGCAGAGAACTCTGGCTTATATCATCCTTGCTTGCTGACCT
CAAGGTCCATGTATAAATTCTCAGAGAAGAAGCCCTCTGGTTGGTGATGCTTGGAAC
ATGCCCTGGAGGGTGGGCCCTTGAAGTGGAGCTTGCTGGAACCATGGGCTGGA
GCAAGGCGCTAGGGCCAGAAGAGAGAGGTAGGCAGGGCTGCTGGCCAGGCACTCTT
CACCAAGACAAGGCAAGAGGAGGGGCATGATTGAGGCAGTGATACAGAAAGCAGA
CAGTAGAGGTCGTGGCAAGTGTGCCGTTACTTGCTACCTGTGGTTGATGGGAGAGTC
ACACCACATTTAGGAGGAGAGAATCCATTTGCCACTTCTGACAATGCCACAAGAAT
CACATATTTTATCCAGAGGTTGAATTTGGCCCATGCTGAGCTTTAAAATACAGAGCT
GTCTTGGAACAATGGCTCAGTACATTCATTTGGTGTCCAACAAAGCCTGCCTCTGTT
GCCTTCCCTCTCTCTGTGTGCCCTTCAAGATCTTCATTGTGCTTTGGGGAGAGAAAGA
GAAAATGTCATATCAGGGTAGCTCACCCCATGTGTCCTGGACTCAGGAAAAGAGTA
TCTTATCACCTTACTCTTTTGTATTATAAAAAATAAAGTTGAACGTCTTCAAATAAA
ATAAGAAGTATAGAAAAAATTTAAATTAACCTGTTATGATTCTACCTAGAGAACC
ATTGTCAACATCTTGGTATATGTACTTCCAGATACTTTCCTATGAATATATACATTGT
AGATTTTTTAATATTAAGGCTATCATGCTGCTTTGTATACAGGCTTTCTTTACTGA
TATGTAATATAATACACAGACAAATATACAAATCCTAAGCCATCAACTCATTGAATT
TTTATTCATTGTTTTTAATACCTGCATTGTGTTCCATTGTTAGGCTATGTCACAACAT
ATTTAATTAAGCCCCTATTGATGAATATTAATTTACTCTATTTGCCAGTTCATTCCAG
TCCAACATTTATTGAGTGTCTACTTACGGGCCAGGCACTCTTGTATTCATCAAGATC
ACCACATTATCTGTATCAGTTATTTATTGCCACAATAAAACTGCATAACAAATCACT
CCAAAATGTAGCACCTTAAACTACA ACTACTTATTATTTCTCAAGAGTCAATGGGT
CAGCTGAGCAGTCTGCCGATAGGGGTCAAGGTCAACACATTTCAACTAGACTACTT
GTAAAAAGAATGAGTGTCTGGGTAGGTGTGTTCTTCTAAAAATAAAACAAGGAAT
GAGGAAATTGCAGGTAGGATAAGAGGGGTGGTTGGCAACCAAACCCACAAAAGG
CAGACAAATTTAAGGAAACATAATGCCAGACTCCTATGTCATCATCCAAGTAGATG
CAGTGAAGTATAACCTGGGGCGTAGTAGGGTAGGAGTGGGGAGAGCAGAGGAGAA
GGAAGGGAGATTGCTTTTCATCACTTTTGGATTCCCTAATAACAGACATGACTGCCA
GTATTAATAATTAACAAAGGATATCTGATCATTAAATTTTCTGTATAAGTCACTGGT
GATCTTCAACATCTCTCCCTCCCTTCCCTCCCTTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCC
TTCTTTCTCTTTTGTCTTTCAACTTCTTTTCTCGTTTCTTTTGTCTTTCTTTCTTCTC
CCTTTTTTCTGTCACTCTGGGCGTATGTAGTAGTGTA AAAAGGTTGACAGAGAAATC
AAATATAACAGGAGCAGGGCCCTGAGAAAAGCACCTGGCATCCTGTAGGCAAACCA
TTGTTTCTAAAAGAAGGGACTGAGAGATTGAGGAGCTCAGGACATTGCCAAATGAA
CAAGGCAAGCACATTTATTCAGTACCAAACAAACGGAAAACGGCCTTTCCAAATAA
CTGACCTATAAAACAGCCTTTTCACAAGAGTACCGTAATTACTGGCCAACAGCAACA

ATGAAAAACAACCTCCCAAACAAAGAAATATTTCTGGATTA AAAAGCCATGAGATCTG
GATTCTAACAAGCTGTGCTCCTCAAAC TACAAGTACAAAATCTGGCTCTAAACTAAC
AAGCTATGAGCCTCAAAC T GATGACTGGCATGTTTGGGTCTCCATCTCCTTCTTGGG
GGTTGGGGTCTTAGAGACCCTTTTCCACGCCCTGATTCTCTTACTAGTGTGTATGCTT
TCCTTTTGACTTCTCATGCTGACCGTCTGAGCAGGAGTGAGAAGCAATTTCAAAGGA
AAACATCGTTTATCATCTGCTGAAAGAAACCAAAAAGAACACAGGAAAACAAAAA
GACAAGGAAAGGGAATGAAAATGTAATTCATTTTATTA AAAAGAAGAATTATTCTT
CTGGGACACTGGATAGAAACCTTAATGAGTTACCTAGCTATCATAAATCCTCTAACA
GAGAAGAGAAGAGAAAGAAACAAAGACGGAAGAGGGCAGGATAAAAGAAAGAAA
AAAGGAAGGGAAAAATGAAGGAAGGAAGTTATCTATTCATTTCTACAGAGACTCTG
CTGAGCAGTAGACAAGAAGACTTGGGAAAAATTTAACTGAAACTTTTCCAAAAATC
TTTTCAGAGG

SEQ ID NO:16

обратнокомплементарная последовательность SEQ ID NO:15

CCTCTGAAAAGATTTTTGGAAAAGTTTCAGTTAAATTTTTCCCAAGTCTTCTTGTCTA
CTGCTCAGCAGAGTCTCTGTAGAAATGAATAGATAACTTCCTTCCTTCATTTTTCCCT
TCCTTTTTTCTTTCTTTTATCCTGCCCTCTTCCGTCTTTGTTTCTTTCTTCTTCTCT
GTTAGAGGATTTATGATAGCTAGGTAAC T CATTAAAGGTTTCTATCCAGTGTCCCAGA
AGAATAATTCTTCTTTTAAATAAAATGAATTACATTTTCATTCCCTTTCCTTGTCTTTT
TGTTTTCTGTGTTCTTTTTGGTTTCTTTCAGCAGATGATAAACGATGTTTTCTTTGA
AATTGCTTCTCACTCCTGCTCAGACGGTCAGCATGAGAAGTCAAAGGAAAGCATA
CACACTAGTAAGAGAATCAGGGCGTGGAAAAGGGTCTCTAAGACCCCAACCCCAA
GAAGGAGATGGAGACCCAAACATGCCAGTCATCAGTTTGAGGCTCATAGCTTGTTA
GTTTAGAGCCAGATTTTGTACTTGTAGTTTGAGGAGCACAGCTTGTTAGAATCCAGA
TCTCATGGCTTTTAAATCCAGAAATATTTCTTTGTTTGGGAGTTGTTTTTCATTGTTGCT
GTTGGCCAGTAATTACGGTACTCTTGTGAAAAGGCTGTTTTATAGGTCAGTTATTTG
GAAAGGCCGTTTTCCGTTTGTGTTGGTACTGAATAAATGTGCTTGCCTTGTTCATTTGG
CAATGTCCTGAGCTCCTCAATCTCTCAGTCCCTTCTTTAGAAACAATGGTTTGCCTA
CAGGATGCCAGGTGCTTTTCTCAGGGCCCTGCTCCTGTTATATTTGATTTCTCTGTCA
ACCTTTTTACTACTACATACGCCAGAGTGACAGAAAAAAGGGAGAAGAGAAAG
AAAGCAAAGGAAACGAGAAAAGGAAGTTGAAAGCAAAGAGGAAAGAAGGAAG
GAAGGGAGGGTGGGAGGAAGGAAGGGAGGAAGGGAGGGAGAGATGTTGAAGATC
ACCAGTGA CTTATACAGGAAAATTAATGATCAGATATCCTTTGTTAAATTTTAATAC
TGGCAGTCATGTCTGTTATTAGGGAATCCAAAAGTGATGAAAAGCAATCTCCCTTCC
TTCTCCTCTGCTCTCCCCACTCCTACCCTACTACGCCCCAGGTTATACTTCACTGCAT
CTACTTGGATGATGACATAGGAGTCTGGCATTATGTTTCCTTAAAATTTGTCTGCCTT
TTGTGGGGTTTGGTTGCCAACCACCCTCTTATCCTACCTGCAATTTCTCATTCCCTT
GTTTTATTTTTAGAAGAACACACCTACCCAGACACTCATTCTTTTTTACAAGTAGTCT
AGTTGAAATGTGTTGACCTTGACCCCTATCGGCAGA ACTGCTCAGCTGACCCATTGA
CTCTTGAGAAATAATAAGTAGTTGTAGTTTTAAGGTGCTACATTTTGGAGTGATTTG

TTATGCAGTTTTATTGTGGCAATAAATAACTGATACAGATAATGTGGTGATCTTGAT
GAATACAAGAGTGCCTGGCCCGTAAGTAGACACTCAATAAATGTTGGACTGGAATG
AACTGGCAAATAGAGTAAATTAATATTCATCAATAGGGGCTTAATTAATATGTTGT
GACATAGCCTAACAAATGGAACACAATGCAGGTATTA AAAACAATGAATAAAAATTC
AATGAGTTGATGGCTTAGGATTTGTATATTTGTCTGTGTATTATATTACATATCAGTA
AAGAAAGCCTGTATACAAAGCAGCATGATAGCCTTTTAATATTA AAAAATCTACAA
TGTATATATTCATAGGAAAGTATCTGGAAGTACATATACCAAGATGTTGACAATGGT
TCTCTAGGTAGAATCATAACAGGTTAATTTAAAATTTTTTCTATACTTCTTTATTTA
TTTGAAGACGTTCAACTTTATTTTTTATAATAACAAAAGAGTAAGGTGATAAGATAC
TCTTTTCTGAGTCCAGGACACATGGGGTGAGCTACCCTGATATGACATTTTCTCTTT
CTCTCCCCAAAGCACAATGAAGATCTTGAAGGGCACACAGAGAGAGGGGAAGGCAA
CAGAGGCAGGCTTTGTTGGACACCAAATGAATGTACTGAGCCATTGTTCCAAGACA
GCTCTGTATTTTAAAGCTCAGCATGGGCCAAATTCAACCTCTGGATGAAATATGTGA
TTCTTGTGGCATTGTCAGAAGTGGCAAATGGATTCTCTCCTCCTAAATGTGGTGTGA
CTCTCCCATCAACCACAGGTAGCAAGTAACGGCACACTTGCCACGACCTCTACTGTC
TGCTTTCTGTATCACTGCCTCAATCATGCCCCCTCCTCTTGCCTTGTCTTGGTGAAGAG
TGCTGGCCAGCAGCCCTGCCTACCTCTCTCTTCTGGCCCTAGCGCCTTGCTCCAGCC
CATGTGGTTCCAGCAAGCTCCACTTCAAGGGGCCACCCTCCAGGGCATGTTCCAAG
CATCACCACCAGAGGGCTTCTTCTCTGAGAATTTATACATGGACCTTGAGGTCAGC
AAGCAAGGATGATATAAGCCAGAGTTCTCTGCAGCCATCCCCTTTTACCTCTCTCA
GTTACGGATGAACTTATCTGTAAAATGGGAAAAAGAAACGACAAGAGAAGCACAG
CTGAGAGAAACACCAAAGAAAGAGTTGAAGACATTGTTTGAATTCCTGCATCCAG
TAGTGCCCAAAGCCAGTGCCAACCCTGGAATTCCTAGCTACAAGAGCCAATGAAGT
CCCTTTTGCTTTAGTTTGAGGTGGGCTCCTGTCACCTTGCCACAGAACTAGGAGAAA
GCACAGTGTCTGTGCTGCAGTGAGAGAGGGCTAAAGTCCTCAGGGACAACCAATAA
AGCACGAGAGCCAATGAATAAATACTTGAGGTGAGCAATTACAGGAGGCATTCTTT
ACATTTCTTAGAGAGCCAAGCAAAATTTAGCCCCAGTTGCCTGAAGTGGCCATATAT
ATTATTATTAATAATGAATATAGTCAATAACCTGTAGGCAGCTCAGAAAAAATCTCA
GTCATTAAGTGTTAAAGTACATTTGAGACCATTTGCCTCAGCATCTAGTGCAGCTCC
GGATACACACAACGTGGAGGGCAGGGAACATAATTTGGTGAGCACCTACTATGGG
TTAGGACCTGTGCTGGACATTTTACATACATTAGTTCATCTATTCTCCCGAAGATC
TTGGATGGTGGGTATTATTACCTTCATTTTGGAGATTAGGAAACTTGCCTAAGGTTC
ATACAGAGCTTCTTCGGTGCTCTCAATCATGACTGTTCCCTTGATCCATCCCCTCTG
TAAGAACTGAGATTAGCGTTTAGGGAGTTATAGCTGGTGCAGTAGACACCTCAGAT
GCCCTGTGTCACATCTCTTGACACATCTCTGATTTCAAGTGCACCTTATGATGTGGCCTC
TTTCCCAGATCTCAAGCACGCAGCAGTCATTATTTCACTATCTGCCCCGGGACGGTT
TCCACAGATGCAGGAGCTTGCTCAGCCTAGGAGAAAGCACAGTGTCTGTGCTGCAG
CGAGGGAGGGCTAAAGTTCTCATGGACAACCAATGGAGCATGAGAGCCAATGAATA
AATACTTGAGGTGAGCAATTACGGGAGGCATTCTTTACATTTCTTAGAGAGCCAAGC
AAAATTTAGCCCCAGTTGCATGAAACGGCCAATTGCCAAATTCATCCTTATATTGAC

TTTTCTCCTTCGTGTTGCAGGCTGACTGATCTCTCATTCCCCTTCTGGAATCACC
TCCCAAACAACTAACTGCATACTAGTCCTTGTCTCAGGCTCTGATAGTGTGGGATT
CCAACTGGAAATGAAGACCATCTTGTGTACTGACTAGTGAAGGAAAACGTTATTG
TTGTGAAGTCTGTAATAAAATAAGCTCAGCTTAAACCAGCAAGAGCAATTCCAAGC
TAGGAACTATATTAAGAAATAGTCTCTTACATAGAACCCCCTTTGAGAAAATATACT
CAAAGTCTATAACTTAAACATGCCTGGAAGGAAATACATCAAAATATTATTTATTAT
AATTCAATATATCATATTATTATATTAATTATTCTTCTCTTCTGAGTAAATTTTCAAT
GGACATTCCCAGATGTTCCCTCACTTCTCTTATCTATCAGTCTTGATCTGCCCCCTGG
GGAATCACAATTCTTGTCACTGCAGTTAATAACCTTTTTTTTTTTTTTCTGTGACTCA
AATTAGGTAGAAGATACTTAGCCATCATTCTCCACTTGGAAGGCAGCACAGCATGTT
AGTTCAGAGTATGGTGTGGGCAACAAAAGAAGGTCAAATTCTAGTCATCTGGGTCA
CTTGGTCTGTCACCCAGGTTTTGCTGTGGAAACAAACAACCTGCTTGTGATCATTAAAT
TTTTAAATATGGACTAGGCTAAGGGATACCGAGATAGCTGGTAAAACATTATTTCTG
GATGTGTCTGTGAAGATGTTTCTGGAAGAAATTAGCAGACTGAGTATAGAAGATCC
ACCCTTACCAATGTGGGAGGGCATCATCCAATCCATTGAGGGCCAGAGAGGACAA
AAAGGCAGAAGAAAAGCGAATTTGCTCTCTCTTCTGGTGCTGAAACATCCACCTTCT
GGCTGGCCTTTGAACTTCAGGACTTATCCTACCCTAGCACACCCACCCTCCCAATTC
CCCCATCCCATTTCTCAGGCCTTCAGGCTTGGGCTGAATTATACCACTGGCTCCTCTA
GTTCTCCAGCTCAAAAACAGCAGACTGGGGGACTACTCAGCTTCCATAATCATGTAA
GCCAATTCCCATAATGAATACCACTCCCCACTCTGTTTCTCTTGAGAACCATGATTA
ATGATTAATATAACTCCAAAACCTTAGTGGCTTAAAACCTGCAAAGATTAATGCATGGC
TTATGCAGCATGCACATCTTGATGGGGGTGGGAAAGGGGGCTCTGCCCATAGCTCCC
ACTATAGGACCTAGCCTGCAGAGCGCCACTATCTGGAATGTTAGTGGCCACTGTGGC
AGAGTGAAAAGGAGGCAAAGCTCATGCAAAGCCTTCCATCTGAAAGTGATAAACGC
TGCTTGTTTCATGTTTCATTGGCCAAAGAGAGTCATGTGGTCATGCACAAGTTTCACT
GAAAGGGAAAGGGCAATCTGCCTTGCAGATAAGAAAGGAGAAAAAAGGGGGAGA
TTTTGAAAATGATTGTCCGATTTGGACAATCATTTAACCTAAGCTTCAGTGTTTCTCAT
CATGTA CTGAGGGGATATCCACTTTACAAGGTTATTATGAGGGTTAAATGTGAACT
GTAAAGTACCTGGCACACAGCCATTACTCAATAAATGCTGCTATTTTGACAGTGATC
CTTTGTTTACCTGAAATATAATATTAAGATTTACTCCAATCTTTCCTACATCTCTGGG
AGTAAAAAACTCTTGAATCTTTTTCTGGAGGTTGCATTTTCTAGTCTTTAAAAAATGAG
TCCAGTGCCTTTTCCCTGAATTTCTCCAAATTCTGACCATTCTAAGATATGGGTTCTA
GCTCAGTGCTCCTCACACAGAAAGGTTCTAGTAAGGAATGAGAAAATACTTTCTGCT
TTAAAGAAGAGCTACGCAAATATTAATGAGAATAATTATATCTATTATTTATGGCG
AATATTATTCTAGTACTCAGAAAACTCAGCATAAGTTCATTAGAACAGTATGGGCC
ACATTAGAAAGAACATATTATCATTATGTTTGAAAAGCTAGGACTGGGTACAAAGTT
ACTACGATCGTATGGGCTTAGTTGGCCAAGTATGTTATTACAGTTTCAATGGAACCA
TCATCTTGTCAACAGAACACACAGTGAAACCTGCAGGGCCTTCTCTGGCTTCATGA
CAGTGAGTAGACTCTCGCTTTCCCTAGGGAAGGCAGGGGCCTGGTAGGGTCTGAGC
AAGAGCCTGAGGCATAGACTGTGCCACCCCTCCCCTTCTCCCTCCACTCATGCCAGT

TTTTGGTTTAGAAAGCCAGCATTGGAATATCAAGTCTCAAGACTTTCTCATTGTCCT
CAGGGTGGGTTGCTGCCCCCACACCCTCCTGTTCCCATATGAAGGTCATTGACCC
CTAGTTTTGTAAAGGTGTTTATTCTTGCAGAATTTGGACCAGGGACTTTCTGTTGAGCA
AATGATTCAGTGCATGTAGACCCTGAGGTTGTTTACATTTTCAGGAACTGCTATTGC
GAAACTAAAAAGGTTTATTTTACGTAGTGGGGTTGCTTTTGCCAGATGAATTCATTT
GCTCAAGTTATTTTTAAAATGTGCTTTCCCTTAGCTCCTTAGAGAAGCTCTGGTCTCT
TGCCTGTGTGGGTCTAGGCCAGAAAAAAAAAAAAATGTTGAGGCTATTAATGGAAGC
CAGAGAAAATGTCTGGCCAAGGTGGATCAAAGAAGGTTCTCAGTTTTGACCCAAA
TTTTAACTTTCTGAATGCCGGGCTAGCATACTAGCTGGTCCTGGCTCCAGCAGCTTA
AATGACTCATGTGCCTAGAACCAGGAAGACCATGCATATGAGTTTCAAACCTGCTCCT
ACAGGTATGTGTGGAAGGGGGACCCCTATGACAGAATATTCATCCAGAAGAACTT
GCCCTGCTGCCAATTGGAAGTGCCACAGTCCAGCAGCAGTGAGACTGCTGGAAGCA
GTCAGATTGCAGAGCACAACTCTCTAACTCATCGGGGTCAAGTGGCCTGAAATGA
TTCATCAGGCTGCTTTGCAAACATTTTATTTAACAATTGATATTTAGAAATAATTTTT
TATGACAGTTTCTTATCTTTTGGGGGAATCAGAGACCCCTTTGAGAATCTGAGGAAG
GCTATGGAGAAATATCTGATGAAGCCTGTGGGAAAAAAAAACTGCCATCCAGAAAAA
TGTATATATGCAAGCTGTCCCTTAAAATGTTAGTGGTATCATTGGGATGACATCCAA
AAATTGTCAGGGAAGTCCGTAAATCCCCTTGCTTCAGAATTTGGGGAACTTTAAAC
CTCAGATTAATGGTATGTAGATACTATTCATTCATTCAGAGCTTACTGACTTCCTGTG
TCATGGCAAGCACTATGTTGGAAGCTGGAAATACAATGATGTATAAGACAAGGACA
CAGCCTTGTGGAGCTCACAGTCTAATGGGAGACAAAACAAACCATAATAATGATG
CATGATAATGAGTTAAGTGCTATGCTAGAACTGTAAGTGTAGAAGCAAACAAGAGC
CCCAAGTAGGGTAATCAATTCAATATATATTTAATAAATGCATTACGTGCCAGGCAG
TTGGGAATAAGCTGGTGCATAGACAAGATCCCTATCCCATGGAGCCTTAAGTCTGGA
ATACTCTCAACTAAAAGTTAGAGGAGGGGCCTGGAAGAACATGATGCCACCTAAG
GTGAATCCTAAGTAAAGTTCACCCAGGTGAAGTGGGTAAGCGTATTGCAGGTAGTG
GGAGCAACACGCACACAGGCCAGTAACAGCAAGGTGAGTCAGGGGAACTACAA
ATAGTTCATCAGGGCTCTCCATGAAGGCAGGAGCAGTGAGAGACAAGGGTGGAGAG
GTGTGCTGGGGGCAGATCCCAAGGCTCCTGTGCTTACCATGGATTGTGGGTTGAA
GGTTGTCAATGAGGGCTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCACTCTGTGCCCAGGCTG
GAGTGCAGTGGCGCAATCTCGGCTCACTGCAAGCTCTGCCTCCCGGGTTCACGCCAT
TCTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGCGACTACAGGCACCCGCCACCACGCCTGG
CTAATTTCTTGATTTTTTAGTACAGATGGGGTTTCACTGTGTTAGTCACGATGGTCTC
AATCTCTTGACCTCGTGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGG
CATGAGCCACCACGTCCGGCCTCAATGAGGGCTTTTTAAGGCAAGTCAGGAGTTTCC
TATTAGAAAGATCACTCTACCATAAATGGAGAAAATTGGGCAAAGGGGAGGGGATG
GCTAGTGGGTGAAATCATGGAGACTAGAAGGAAGGAAGCTGTTGAATTAATCTAGA
CAAGAAATGATAAGGTCCTAATAGTGGCAGTGGAGATGGAGTAAAGTGGACGATGG
GAAAATGGGATGAGGCCTCTGGAGAGCAGCTCACAGGCAATTTTTTTTTTTCATTCCCT
ACAATGACATTTGCCTACGGCAACACACTCTGCCACATGCAATGAGGTAGTGACTG

GCTCAAGCTAAGGAAATAATCTTGTTACTGACGTGGTATCACCGGGAATCATGGCTG
TATAACTGTAGTTTCATAATCAAATTTTGGAAGCTCTACATTTAATTGCTTAATGGTGA
TGATGATTATGACAGGAATAATACTGATAATAGCTGCAACCCAATTTTATTGGACAC
TTATTCTGTGCTAGTTACTGTTCCAAGCATTCTGAATTTACTAACCCACTTAATCTTC
AAGTGAAGTCTATCGGGTAGGTTCTATTCTTACTCTTAAAGAATAGATGAGGACACTG
AGGCAGCACAGACAGGTTTAATAACCTTGTCTAAGGTCACACAGCTAGGAAGTGAGA
AAATAAGGATCTGAGCCTTGGAATCTGGTCTAGGACGCAAACCTTCCAAAAATTCT
CCTATCAATTTACAATGACAAACATAAATTATGGTCTTTCTCCATAAAAATCAATTT
GAGCACTAAAATGACTTTTTTACCATTTGTTATGAACATTCTGAACAATCACAATAA
AAAGTAGTGCGGAGACACTATTCAAGTCTCTAAAAACATCTTAGGAGTGGTACATG
AAGCAAAATGCTGGGTGTGAGTGTTTTTGCAGATTCAGGCTCCAAAGAACAAAAAA
GCAGAAAAACAAACAATGGTGTTTTTTAAACAATGAATGTTGTTTTCTTTAGCCAT
AAGGGAATTTTAAAATGACAAACTCATTGAGCTTTCAAAGCATTCCACATTCCCC
ACCCACAAGCAAATGCCAGAAGGTGCCAGTTTGAGCCAACTCAGCTCAGGAATGAC
TTTCTAAATACTGGATCAGATTTCTTGAATGTCCGCGCTCCACAGATGGATACTTACT
ATTGTCCTAATTGGTCTGATGAAAAGTACTTAGCAATTTATCAAGCAATTAATTTAA
CAAAAACATTTGAGCAAGAGATGAGATGGTGTGGCACAATGCAGAAACAGAAATT
TGAAAAGATTCAAATGTATTACTTCAAAAAGATTGAAAATGCTGCCTAAAATCTT
TGAACTTTAGAGCTAGGTTGTGCATAGGCTTAATTTTAATGAAGAATCTTCTGGG
AAAATAAGTTTTTGATTATATAAAGAAAGCAATTTCCCTTGATTTGCAGGAAATAATT
CTTTTTGGGGAAAAACAAATAAATTAATATTTAATATACTCATTACATCCATCCAGC
TAACATTTACTGGAAGCATGCTGTGTGCCTGGCACCATGCTAGGCACTGAGACACAA
AAATGAAAAAGACAAGAATCTTGTCTTTAGCCTAGGTGGGGAGATAGATAAGCAA
AGGAATAGTGTAATAAATGCAATAAAAGAAATACGTACTAGCTAGACCTGTGGGAA
GAAAGGTTAGAAAGATGAACAGAACTGTGCTAGAATTTTGGACCTAATTCTGTAA
GTGTTGGAGAGCCATTAAGCAGAAGTGATCGTTAGATTTAATTTTAGAAGGATCATG
CTGTTATCAATGTGAAGAATGGGCTGTAGTGGGGAAACGCCAAAGGCAGATTCTGT
TCCACTCTTCATAAAAATCGTACCACAGCACTCTGATACCCTTTTTGCTCTCTAATCC
ATTTCTCTTTTCCCCCAACACAGATAATTTAGAAATTATTTAGTCTTTTTAAAAGCGC
TGGTGTCCAAGTTTTTGGAGTTTTCCAGATATTTGTTATTGGTTAATAATTTAATTC
CATTGTGGTCAGAGAACATATTTTCTATGACTTGAATCCTTTTAAATTTATCAAGATT
TGTTTCATGGCTCAAATACGGTCTATCTTGGTACATGTTTCATGTACTCTTGGAAAG
AATGTGTGATTTATTGTTGTTGGGGACTGCTGTGCTCTACAAATGTCATTTAAGTCAA
ATTGTTTGATAGTCTTGTCTAATCTTCTATATCCTTACTGATTTTGTGTATTCTTGT
CTACTAAACATTGAAAGGATATTAATAATCTCCAGGCTGCGTGCAGTGGCTCATGCC
GTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGCAGATCACGAGGTCAGGAGATCGA
GACCATCCTGGCTAACACGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAAATTA
GCCAGGCGTGGTGGTGGCCGCTGTAGTCCCAGCTACTGGGGAGGCTGAAGCAGGA
GAATGGCGTGAACCTGGGAGGCGGAGCTTGCAGTGAGCTGAGATCCTGCCACTGCA
CTCCAGCCTGGGCGACAAAAAATAAATCTCCAAACATAATTGTGGA

CTTGTCTACTTCTTACAGTTCTATCAGTTTTTGCTTCATCTATTTTGACACAGCTATGA
GGTGAAAAACATTTAGGACTGTTATATCCTTTTGCTGAACTGACTCTTTTATCATT
TAAATGATCATTTTTACCCCTGGTAATATTCTTTGCTCTGAAATCTATTTTGTTTCAT
ATTGTCACTCCAGTTTTCTTCTAATTACCAATATGATGTATCTTTTCTCCATCCTTTTA
CTTTTAATCTGTTTGTTCTGTCCTTTATTTTTAAGGTGTGTTTCCTGTTGGCAGCATATA
GTTGGGTCTTGCTTTTTTATCTGATCTGAAAATCTGATTTTTTAAGGACATTTCTAAA
ATTGAAAAATAAAAGTTGTATATATTTATAGCATACAATATGATGTTTTGAAATAAG
TATACATTGTGAAATGACTACAGTTAATTAATATATACATTACCTCACATATTTATTT
GTAGAGAGAACACTTAAAAGATACTGTTAGCAATTTTCAAGTGTACAATATATGTTG
TTGGTTATAGTCACATTGTACAATAGATCTCTTGATCTTTAGCTTATTCCTCCTATCT
AACTGAATAAGTTGTACAATAGATCTCTTGAACCTTATTCCTCCTGTCTAACTTTGACC
AACATCTCCCCAGCCCACCGCCTCTCCCCAGCACCTGGTAACCATGTTTTTACTCTCT
GCTTCTATGAGTTCCAAGTTTTTCAATTCTGTGTGTAAGTGAGATCATGTGGTATTAA
CAATCTCTGACTTTTAATTGGGGTGTTTTGAATGTTTATATTTAAATATCTTTAAAAG
ATAATTGACTGTATAAGTAAAATTAACAAAACAATAAAGTGTGGAGTTTATAATGTTT
GTAGAAATAAAAACGTTAAGACCATAACAGCAAAAAGACAACAACAGTAAGTTTCT
TAAGCTATATGTCAAGTAGTATATAAACTGGTTATAAACTGGTAAATTAGAAAGAG
GTATAACCCTAAAACAACCACTAAAATAAATCAAAGAGTATAGTTAATAAGACAAT
AGAAAAGACATAGTAGAATAAAAAAATCCAAAAGTAAGGAGAAAACAAAAGAAC
AAATAGAAAACAGCAAGATGACAGCTTTAACCTACCATGCCAATAATCATATTTAA
TGTTCTAAATGCCCAATTACAAGCTGGAGATTGTCAGATTGGATGAAAAAGCATT
ATGAAGCACTAGTCAGGTACTGAACTAAGGATCGTATAAGGTCTCATTAAATCCTCT
GGTGAAGTACGTATTATCACTCCATTTCCAATATTTACAAAATGAACCTTGCATAGG
TTAAGTAACTTCTCCAAGCAGCACAGCAGGGATTACACTCGGGCTCTGAATAGTGC
AAGTAGACCTGTAAAACCTGCTTCCTTACTCTCCTTTCAATTCAGCTACACTGAGTAC
CAGTTACATGGAGTTACTAAGTTAGGAGCTGTGCCCATGGCAATGACTGTAACCTGTC
TGGGATGAAATCCACCTTTACCAGCTGTGTGACCTTGGGCGGTGTATTACACATCTT
TAAGCTTTAGTTTCCTCATTTGTAAAATGGAAGTAATAAACTAGTCCCATAGTGTT
ACTGTGTGTTAAATGGAGGTGGTTGACTGTTTTTGTACTTTAAGCTATACCCTGCAG
ATCATAGGAGAAATATCAATTTGTGCAATTCTACATCAAAATCAAAATAGTATTATA
TAAGAGTGATCTGTTTAACTGTAGCATTATAGAAATATACTATAGAAGGAACTATT
TTATATTTACTTTATAGTATTATATGAAGTTTTGGTTTCTTCTTTGAGAATCATAGTA
ATGTGATCAGTTAGTCTTCTTTTAAAGAAACCTCTCATCCCACTATTCTATTTTCAA
AAAAAACTTTTTCTTGAGTGAAAATGTCAAACCTATTCCTAGCTTTGCAGATGAA
AGTGTTCCAGATTCCTTGGATTTTTACTTTGGATACATGTATTAGATACCTGGGATGAA
TAACTTCAGTTTAGGTTATATTAATATTATAATAATAAGAATGTTTAAAAACAATTT
ATCTAAATAGTATTTTACATTTGAAATATTAATATATAATTTGAAAAATCAAATGA
AATCCAGAGAGTTAAGCAGAAAGTTTTTTAACATAAGATTATATTATAAAGCTTCT
TTAAATATTTTTCTTTGAAAAGACAAAATTAATTTTAAAAAAAGTTTAGATCCAGC
ATGACTGTCAGCTGAACAGAAGCTGATCAGTCTTCAAATATCATAGTATTTTTTTCT

GAATGAACAACCTGAAAGAGGGCAAATTTCAAATATATTTTATTCAAATTTCTCCATT
TAGGAGAAAAGATATATAACAATGTTTACACATGCTTTAATAACTTATTTCACTGTA
CAACTTACATTCTGTATAACAGTACAATAAACCAGCCAAAGAAAATAAACCAGTTAG
CACTTAAATAAGAATCTACCATGTAAAAAACACAGTATGGGACACTACAAGGTAGT
ATTTATATATTTTTTAAATGACTGAGCTACAGTACAACAGTCATCTAGTTCAGTGGTT
GTCTAAAACATCAAGCTGTCCACATCTTTCTGATTCATGATGGGAAAGCTATTATGA
CCTTTACATTCGAACATGTCATTTTGTGTGTAAATTTGGTGGGTGGGGGGCAGAA
GGGCTCTATTACCTTTATCCCTTTCTTATAAATATATTTTCCCTTTTATATTACTTCCA
GAATTTTAAATAAAAATATTTATTTGTGTTTGTGTAACTACAATGTCAACATTGTGTTA
GAATTATATTAATCAGTTATTTTATAGCCAGCAAATGGTCCAAACGCATTAAGAAA
ACAAAAGATAACTTAGCTCTGCCAAAGTAGCACCTAGGAAAACAGCACTTCAGTAA
AATTTCTCCTGCTATTCTTATAGCCTATTGCAGGCAAACAGCAACAACCTTCAAAAA
CATAGGCAGAAATGCAAGAAGGAAGTACTCAAGGAACTATTTTCTGTTTCTGAAAA
AAAGATCTTATTAGTTAGTATATTCTCTAAGGCATTTTATAATCTCAGAGTTGCAATG
ATTGCCAAAGCAGGTACATGGTAAGACTTAGCAAGAAGAAAACAAGATGAAAATG
ACTGACCAGTGAAATCTGAACTTGTCCAAGTAATTAGATTTTCTAAGGAGAAAAAA
GGCACAGGAGGTGCACATTTCAATTTGGCTCAAAAATAATGAAAATTAATTTAAAA
AGTTGGCAACAATTACTAAAACATAAAATACAATTTCCCTTTTACAGAGCTCAACTAC
ATAGAATATCAACAATAGCAAGAACAATAAAATAAACAAAACACCCTAACTGTGGT
TCACCAGGAACAAGGACTATAGAGAACTATTAGACATTTCTACAGACTGAATCCCA
GGGACTAAATCCACAAAGTAGGATCTAATAATCAATTCCAATTAACATCTGCTTGA
TCAATTTTCTTTCTAAAGCTCATCCTATGTTCAAGCTCACTTTCTTTCTGTGGAATTG
AAATCATTTAAAGGCTCTAGTTTTTCAGTTGATTGCAGAAGTATTACAGTAATTCTAC
ACACCAAAGAATGCCAAAAGATAGAAAAGTCAACTATCTGTAAAAGCCAACTCAGAT
TTCACCTTGACACATGTAAACCATGAATCATGTATTTCAAAAAACAGTAGTTGTGG
TCAAGTTTACATCCTATTATTATATCTTTAAAAGATAGCAATAATTTATTATATTG
TAAACATAGGTCTGTATCCCAAAGCATAAATCTAGGAAAAGAGACACCCAATGTA
ATGATGCACCTGACATCCCCTCACAGGCTCTTGTGAGAACTGTAGTGTAACCTACTT
AACTGCAATTGCTGAGAGCAGAATTCTGGAGTATGATCCAGGGGAACGTTTCCCA
CACCCTGAGCTACTTTACCAGCGATCATGATTGTGATGGAATAGGCTTATTAAGTT
ACACATTTAAAAGTCATTAGAACATCTCGTTCTTGCACACTAGTGTAGAAAGGTCT
TCCAAAGATAAAAAGAGTGTAGGCCTGGTTTAAATTTTCTCAGCCAGAGCCATTATTAT
GTAAAGATCGCCCTCTGCTGTAAATCAAGGTCTATCTTCAGGTTCCGAAGAGATTT
AAAGGGCTTTTTTCCCTTCTGCCTAAAAATAATGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAGAAGCGCAAAAATTATGATATAGAAAATGTACAAAGGAAACAAAACAAAA
AAACAATGTACAAAGGTTTTTCTTCCGTGTAGGAGTTTTACTCACGTATCGTCTTCTA
TATATTTTATTAGTGTCAAGGCTTTTCTGTGAAGGACAAGTAGAACTGTGCAAGGA
AAGTACTTCTGAGAGATAAGCCAGGTTTCAGCTGAAAGACCTGCAGGGAGAGGAAC
CATTTCAACACATAATTTGCTCACATTCTACTCGTACAGAAGTTTCTATGACAGTGTT
GACAGTGCTTGGCAGACAATACACACTAAACATCTCCTTAACCATTTCCACTGATGC

CCCCTAACAGGAGTGTGGTATAGAAGCACTAGGTGTAGGAACAATCTGATATTTTTT
TTTTTTTTTGAGACGGAGTCTAGCTCTGTCACCAGGCTAAAGTGCAGTGGCGCGATC
TTGACTCACTGCAACCTACACCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCC
AGGTAGCTGGGATTACAGGCACACGCTGCCACGCCAGCTAATTTTTGTATACTTAG
TAGAGACGGGGTTTCACCATGTTGGCAGGATGGTCTCGATCTCCTGACCTTGTGATC
CACCCACCTCGGACTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCATAAGCCACCAGGCCAG
ACAATCTGACAGTTTTTAGAAGTTTTCTAATTTATCTTTAAAAATGCATTCAAATTTT
GCATTCTACTTCAGAATACATCCATGTTTACTTCACTTTTAAAACTCATAACATAAGTT
ATTTTCGTATTACTTAATTTTTTCTGCCCAAATCTTCAAATAACATTGAAGCTCCTAGA
AGATGAGCCTATGGTTTTGAGACATTCATATACCTGTACTTTTGCAGGGGGTGGAGT
GGGTGGGTAGGAGTAGAATGTGTGCATATGATGAGGTGGAGAGTGGGAGGGATTTT
ATGTCAGCTTGAGAAGCATGAAATTCCAGGCCTACGAATTTTCCTTGAACCTCGCAA
TATGTCACAGACCTCATAGATCTCAATCCAAAATTTCTAGTAAACATAAGGATCTCA
TTATTTCAAAGCTTTATCTATGACACAGTTTCTGGCCTGATCCCCAGAATGTTATTA
TAACAAACTGTAATATATTAAGAAATAAGTTCCATATAATCTACGATTTCTTCAAC
TGTGTAATTAAGTAGATATTTTTTAAAAGAATGAAACAATAAAGATGTTATTTAAAT
AAGTACACTATGTTTCAAATAATTTTTGAGTCATTTCAAGGCAAATAAACAACCTCC
CTTTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAACTTACTTGTTATAGGTTAATGCTTGAATTAATA
GTTTGTGTTTGGACGTATGGAATGCTGCACTCTTAATTGTTAATATACAGGCTCTTCC
CCATTAATAAGTCAAAGGAAAAATCATTAGACACTTTAGAAAGACCAGACACTA
CAAAAAGCACCTAATAAAACAGATTAGGACTCAATTCTTAATTCTATCATTTTATAA
ATGTTAAATATATATAAAAAATATATTACACTCTATCATAGAGTATATGTTATATA
TTTTACATATCATATATAACATATACTCTACATAACATAATAGGGTTTTAAGTTTATA
ACTTTTTTTAATATATAAACATATATATATCCTACAATGCTGGTAATATGTATATAT
GCTCGTACTATATATATACACACACAAACATATATATATACTTGTACTACATATA
TAGTACAAGCATTGCAGGATATATATATGTATATATTATATCTGTAAAAGCTAAGTC
AGATTTCACTTTGATACATGTAAACCAGGAATTCTATGTTTCAAAAACAGTAGTTG
TGGTCAACTTTATATCTTATTATTATATCTTTAAAAGATAGCAATAATTTTATTATA
TTGTAACAAAGGTCTGAATTCCCAGCATAAATCTAGGACAAGAGGCAACCAAT
GTAATGATGCACTTGACATGCCCTCACAGACTCTTCTGAGAAGTGTAGTGTAACATA
CTTAAGTCAATTGCTGAGCAGAAGTCTGGGGCATGATCCAGGGGAATATAAATAT
ATAGAACAGGCATTGTAGGATATATTAAGAAAGAAAACATGTCATATCATTCACTCT
GACAATCTCAAGTTCAACATTTACCTGATCCAGGAAGGCTTTCACTAGAGTGTCTCT
GTGTAAGACATCTTGAAAAATATCCTGAAGAAAAGAAGAAAATGAAGAAAAGAA
AAAAGTTCAAATGTTGAAATGGCCATATAATGCTACCTTCCACAATCCCTCACTTGA
GCCAACATTTTAAGTTCTTATAAATTGATATTACATATAAACACATTTGTAAGAATA
TAGATATATATATTTGGAGACACAAAATATACATTCATTTATTTACTCAAGGATATA
TTTACATTTTACTGGTGTGTTGTCAGGCTAATATGTAATTTTTTCTCTAAAGAATATAA
GCAGTCCCCAGTAAGGGTATGTATGTATCTATCAATCTATTTTACTACTCTCATCTTT
TAAAAAAGTAGAGACCCTTAGGCAATTAATAAATAAAACTACCAATTCTTGCCAT

CTCAAAAAAAAAACAAAAACAAACCAGCAACAAAAATAAGCCACTACCATCAAAA
ACCAAAACAAACCAAAAAATGTGAAGAAAAATTTGAGTGAGATTAGAGAACACAC
TCCGATGATTATCCACTGGGTTTGCCTCAACAAGCCCACCATCTGTAAGTAACATGA
ACCAACTATCCAAGAAAGTACTACCTACCTTGGCAACGACCAGAGTGAGTAGTAGT
AATATAATGGCCACTTAAAATAATGTGTGCCTAACACAGCACCTAGGATATAGCAG
GTGCTAAAGCAAACACACAAACAAACAGGACTACTTATTCCCTTCCCAGGCCCCAC
CTCCCTTTTCATCTTTTTCTCTTCCATTTTCCCTAGGTTCTACTCAGGCCAGAGGGTAA
GAGAACATTTAGTAAGAGGAGGAGTTTTTAACTGAAAGTGGTAGGGATCATCCTAT
ACCTGACCAGAGTGGCAAAAAAAGAGAATGGGTATGTGTAGAAGCAAACAGGAAG
GTAGTTCAAGTTTCCTTATCTTAAGAAACGAGTGTACCACACTACAGAAGAAAGAA
ACCGTAAAGGGGAAAAATATTAGCATTTCGTCATTATTGACTGGGCACTGATAGTGC
CCCTTCTTGGGCTCTGGAAAGAGAATAAGGCTTATATTTAATCGAGTGGACTTATTA
TACCTGTTCCACTGAATGAGTATCTTCATCATAAGTGAATTAGATAAAGCAAGGTGT
TAAAAAAGAACATTTCCATTTGTTTGTGTCATCTCTGATTTCTTTCAGCAGTGTTTTG
TAATTCTCATAGAGATCTTTCACCTCCCTGGTTAGCTGGATTCCTAGGTATTTTATTC
GTTTTGCGGCTATTGTGAATGGGACTGTGTTCTTGATTTTGCTCTCACTTTGGAAGGT
GTTGGAGTATAGAGAATGCCAAAACCTTGCTGAAATTTTTAACAGATTTAGGAGTTT
CTGGGCAGAGACTATGAGATTTTCTAGGTACAGAATTATACTGCCTGCAAACAGAA
ATAGTTTGACTTCTTCTTCTCCTATCTGAATGTCTTTCTTTCTTTCTTTCTCCTGATTGC
TCTGGCTAGGACTTCCAGAACTATGCTGAAAAGGAGTGGTGAGAGTGGACATCCTT
GTCTTGTTACGGTTCTCAAGGAGAATACTTCCAGCTTTTGCCATTTGGTAAGATATT
GGCTATGGGTCTGTCATAGATGGTTCTTATTTTTTTGAGGCATGTTCTTCAATGCCT
AGTTTGTTTAGGATTGTTTGTGATTTTTCTTTTTTGTAGACAGGGTCTCACTCCGTTGC
CCAGGCTGGAGTGCGGTGGCATGATCTCAGCTCGCTGCCAACCTCTGCCTCCCGGGC
TCAAACAATCCTCCCACCTCAACCTCCTGAATAGCTGGGACTATAGGTGCATGTCAC
CATACCAAGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGAGATGGGGTTTCACCATGCTG
CCTAGGCTCGTCTTGAACCTCTGGGCTTAAGAGATATGCCCGCCTTGGCCTCCCAA
GTGCTGGGATTACAGGTGTGAGTCACTACACCTGACCTACTGAAGGTTTTTAAACATG
GAGGATGTTAAATTTTATTGACAACCTTTTCTCTACCTATTGAGATAATCTTGTGGTT
TTTGTTTTTAGCTCTGTTTATGTGATGAATCACACTTATTGATTTGTGTATGTTGAAC
CAACCTTGCATCCCAGGGATAAAGCCTACTTGATCAAAGTAGATCAGCTTTTTTGATG
TGCTGCTGGATTTGGTTTGTAGTATTTTGTGAGGATTTTGCATCTATATTCATCA
AGGATATTGGCCTGAAGTTTTCTTTTTTCTGTTGTGTCTCTGCCAGGTTTTGGTATCA
GAATGATGCTGGCCTCATTAGGGAAGAGTTCCTCCTCCTCAATTTTTTGGAACAGAT
TGAGTAGGAATAATAACCAGCTTTTCTTTATACATCAGGTATAAAGAGATGACACAAA
CACATGGAAAAACATTCCATATTCATAGATAGGAAGAATTAATATTGTTAAAATGG
CCATACTGCCAAAGCAATCTACAGATTCAATGCTATTCCTATAAACTACCAATGAT
ATCCTTCACAAAACCAGAAAAAACTGTTTTAAAATTAATATGGACCCAAAAAGGAG
CCCAAATAGCCAAAGCAATCCTAAGCAAAAAGAACAAAGCTGGAGGCATCACATTA
GCCGATTTTATACTAAAAGGCTATAGGAACCTGAACAGCAGGGTACTGTTATAAAA

CTGGCACATCATAACTCCCTGTAACCTCAAACCTCCTGGGCTCAAAAGATCCTCCTGC
CTCAGCTTTCGGAATAGCTAGGATTACAGGCACACAGAAACACATTCCAATAATTCT
TTTTTATTTTTTGTAGAGATGGGGTTTCACTATGTTGCCAGGCTGGTCTGGAACTCC
TGGCCTCAAGTGATCCGCCTGCCTTGCCTCCCAAAGCTCTGTTCTTACAGGCATGA
GCTACTGTGCCTTTTTTCAACTGATAAAAGAGAAACACAAAAGTATACTATAAATTCT
TTTCCTGATTTT CAGAACATCTTTTAAGTGTTTACTTAGGGTTTTAGGATTATAGATTT
ATCATCATCATTTTTTTTTTCAAGTTGGGTCCATGCTCAACAATTAATTATCATTACT
TTTCCTTTTGAATTTACTGTT CAGGCTTTTTTTTTTAAAAAAAATAAGAAGTGAATA
ACAATATAAAATGCAAAGTAAAAAATGTTCCATTAATATATTTTTAACAGTTTTGCT
GTATTTTATATTCATATGTCAAGAAAAAAGACTTAGAATTACTTCTTTGGTTTTGT
TAATAAGTCCATTCAATAACTGTTACATAATAGACTATACACAATGTAGGGGCTGGG
GCTGGGGCTGTCTGGTTGGCCACTATTAAGCCCGGTACCTAGAACAGTGCCTAGGAG
CTCAATATATATTTATTAACAAATAGTTAAATATTTACTTTAAGGGTTAATCTTACC
TATTTTAGGGTAAACACAATTGTATGGAAAAAGAAGAACATTTAAGAAAAAATGC
TTGATTAATGTTTTCTTCAAGCATAATTCTGCTGGTAATATTTCTTTCTTTTAAATGC
AACTTCTGTTTTGTTTTTATTCGTAAAAGACACAATTTTCATATTGCTTGACTACAGTA
CCAGCAGGCAGAGCATTACGTACAAATCAGGAGTAAAGCTTTCGTCAGTGTAGATG
ATCGTATCCTGAGCCATGTCTTCTTCTGAAGTGGCTCTCCAGAAGGCTGTCAGCTCG
GATCTCATGTATCTACGCTGATTATAAATATGTTTCATGACAGGGTGGCATCTGCTTC
ACAGTATTGACATCCACATCTATGTGTGTGGTGGGATATGGAGCATAACATGACTTGC
CGGAAAGGCAGCACAAAGCTTCCAGTTGAATCCTGTCAAATAAAAAGGAAAATTTA
CTGTCTTACATGCCAAACGATATGAATAATTGTTTTTAAATTTAAAAAATGGTCTCT
GATTTAGCAAATCCATCTCTAAAAATTTATCCTAAGAAGCTATTCATGAGTGTGTGC
AAAGTTTTAGTGACAGAAGTGTT CAGTATAGCATTGGTTTTCAATAGCAAACATCAG
AATGACCTAAGCATCCAAAGGAAGTGGTTAAGTAAATAAAAATGAATTTATTATTT
GGCATCTATAGATGAAGTTGTTGAAGTTTGTGTTGATATTCAAAGAGGCTTAGAATC
TGCTGTGAAAAAAGCAGATTAGAACATGCAGAGATGATCCAGTGGGGGTGGGAGTC
TTAAAGAAAATACATGCAAAGGGAAAAAAGACTAGAAAGAGATATAACCAAATA
TTAACAGTGGGTATTCCTGGATTCAAATTACAAGTGTCTTTTAAATTTCTTAATTAT
TCTATGCACCTCAATGAGTATGTATTTTTATAAAACAAATTTACTTCTTTCTAATCA
GTTGGGGTAGCCAGTTACCATGTAATAATAACCTACTGCGTATGAGGCACTGTGCTA
TGAACAGAACAGAAGAAAGAGGCTATTTCCATTTTTTTACTATTATAATGCTGTGAT
AATCATCTTTGTATAATGTCAAAGGTATTTTCTGGAAAACCTATATGATTTGTATTTGC
ATGGAGAACTATTAATATTTTTTTCATTAGATCATAGTTTTGAAATTTCTCTAGGCA
TCTGGTATAGGTCCCTTTCAGAACTAAAATTATATAATTAATGAGAGGGGTGCTGAG
GAAACAAAAGTATTAAGCACTTTATTATGCCTTTAACAGGAGAAGTTCTAATTTACA
GATATGTATAACTCAAATAGAACTACGTTTCCTTTAACTAGTTTCTATATTTAAATA
CTATCATTCTGAGTTCATAGCAGCACATTATTGAAAATGCACAAAAGCCTAATATAA
CTTGATTTTGAACAATTTTTAAATTTTTTTATTTTCATTTTGCCGTGGCTACATCCTCA
AGAAAGTAGTCACTATGAGACAATCACATAACCATTAGGAAAGCTATTTCTTCACGT

CTTGGGACTATAATTGAAATAACAATAATAGATTCAACAAGGTGAACAACCTTTCTTC
CCTTTAAGTATTATAAATAATTGCTAATTTACATTTCTCTGTTTTGCTCCTTGACAGT
AGACTCAAATAAAAAGAAAAATACAATTTTTTTCTAATATATATTATATATAGAAATA
TATATATTTTAGTACACATACATAGGAATTGCTTAAATCCTATAAGCTTCTTAAAGA
TGTTTTAAAATTTTTTTTCAATAAAATTCAAATCTATTTAGTTAAAAAGAAATGATCTT
ATTTTTGATGTGCAACCTGATTTAAGCATGTGTTAAAAAAAAAAAAAGTCCTGAGGCT
AGACATGTAGGAACAGGGACCCACCTGGAACACAAAGGGTATTCTATGGTGTTCAC
CTGATGATACTAACTATAAATCCATAAGACATATAGTCTATGTGCAGAACTGTGTAA
AGGAAGTCAGTCTCTGGGCATGTCAATATGAGATACATTAATGCTAATATTTAAGA
TTTGTCTATAAAGAGTCTCAAAAATGATTTTAGAAAAGTGGTTTCACTTGTGATAAC
TAGAACTATACCTTTAGCAGGCCTTGACAAAGAGCCCTGACTCATATTTAAATGA
TGATTCTGCTTCACATAACCTGGAGCATTTTTCTCTCTGCTGGAGTCAGAAAAAGGCA
TAATGTTCTGACTATCTATAAAAGAAAATATTTTAGCATTAAAACATGAAGTAAAAA
GACCACTGATTTGCTTATGAAAGATATCTGAAATTTTAATTGTTATTATCAATAAAA
CATATCCTAAGAAATAAGTATTCTTTAGTCACCTGGAATCCATGGGATGTAACAGTT
GTTGCTTAAATAGGGATTCTGTGGTCAAATAAATTTAGAAAATGCTTGGTAAATTT
ACTGTATGGCATCTCAAAACCTTTAACATTTGGCTACATACTGTGACTCTTCAGGTG
AATTATATCATCTGCAGACTTTCTCAGACTTATTTGACCATGCAACTTTTATAGCTTC
TGTTTAGTGGGTCTACACATGAAATTCGTTGTAAGAAATATCAAAGAATGTCCAGAT
CCTCCAAAAAGAAGAGAATTAATTATTGAATTTGATTTAAAATAAGCAGGTCATTGG
GTGGGATTTAGAAATCTGATTCTAATAATATTTGACCTACAGCTCTATTAGGAAAAA
TAAAAAGGCATGTAACCTATCTTGAAATTCAAACCATATCCACAGTTATTATGTTAAA
GGAGTGGTTTTCAACCTAGAGTGGTGGCAACTTCTTTCTCAAATTAACAAGATAA
AAGGTAAGCTATTCTCCCTCAAGAGGATGGAGGATGGGAAAAATGTTTTAAAAAAA
AAAAAAAACACTCCAACCTATGGAGCCTTTCTCCCTTCATAAAGCAGCTCGGCAGTC
ACTCTGTGCAACCTAAGGCTTTGGAGATCACAGATGGAAAGCCACCTGTTTGAGGTA
ACAGAAGGAATAAGGTCAGTTCGTAGATGCAATATAATGACACAGGTATACTA
AGCTCTCATAAATGGTTATATGAGAAATATAAATTAAGGCTCATGTAAATATACAAA
GTAGCTGATTACAAAAAAAATTATGAATATCTTTGTAAAGTATCATTTCCAACATA
TTTCTATGTAAAACCTTTTTTTAAAAAATTAGGTTTGCTGAAATTGAAAGATACACA
TACTTATCTCTGAACTCTTTCTAACTAATGGTCAGTGAAGAAAAGTGCAAAATCCTT
TAGTTTATTAGCTAATGCTTGGAAATGTAACCTGTTTATTAAATCCTTAATTAACCTCAAG
TAGCACTGAAGGAAAGGGTCAGAAACATTACTGAATAAAGTATAATAATCAATGAC
CACTTAATCCCAATAGCTCCCTAGAAGGGACAGATTTAGAAGGAAAGCGAAGACAA
TGAAATCAAGATGAATAAACAATAACATTTCTTTGGAACCTACTACCAAAGTACA
TGACTATCTTCAGATTTGTAAAGATAACATTGGGAAATAGAAGAGTAATTTTTTTT
ATATATCTGATTTTAATATATTCTCAAACCATTTATACACTACTGACACTGGTATTT
CCGAGCTATCAAATAAACTGATAAATGATTCTTACTCAGTTTATTTCAAACCTCACT
GTTGCCACAAGGTGTCTTAGCAATTTGATGAGATTACATTGCCTCCTTATACTACTA
GATCATTTTAATTGCAACCTACCATTTAAATGACAATCCATGATATATCATCAGTCTT

AAAGAGTCAAATCATTGCTAGATTATAAAAATAAACTACCTTATTTACTTTCTCTGC
ACTGCTACCTACTACAACGGAACAGCCACAGGTTTGCAAGTGTGAGCTGATGGCAC
TGTAAGTTAAAGAAAACAGATTA AAAACATTGCCTATAAAACAATTTAACAACTA
AAAACAAAAAAGTAGGTGAGCTCTTCAAATAACTCAGAATAGCTTTATATGATA
AACACCGAAGCTATAAGCACAAATGTTATCTTTTATTTGTATAGGAACCTACATTTTCT
AGAGACCTTTCACAGAAATTTTCTTATTGAGCCTTAAAACAGCCCAATTAGTCAGTA
TAATATCATTAAATTAATGTATTTATTTATTGAAATACCATCATTTTATAGCTGAAGA
AATTGACATGTAGAGAGATTAAGTGACTTACTTAAAGTCAAATGGGATTTAAAATG
ATGTATGAAAGGCTGACACTGAACAGATACAGGACTAAAGTGCTTCTGATTCAAGC
CATTAAAGGCTCTTAGGTTAAACACACTCATGCCTCTGATACTCCATCATGAGCCTAA
AGGAAAAGACTGTGAACATAAAAAGTGAATACTTTATACTTTTACTTCTCTTTTATTA
AAAGTAAAATTTTCATGAAAATCTGTAAGTGTGAAGAACTTTAAAACAGAATATAA
GATAATACATGTAAAGCAACTAGTAAAGGAACTAACATGTAGGCACTCAACAAATA
CTGGCTATTTCTAGAAGAAATGTAAATAGGAAATGTTAGCTATGAGCTATTATTAAG
TGTTTTTATGTTCCAGGCACTGTTCTAAGTGCTTTATATTATTTATCTTACTCAATGCT
TATAACAACCCTACACATTAGGTACTATTACTATTATTGCCATTTTACAGATGAGGA
AATAGGTGTATAGAGAATTCAGGCACCTTGCCACGGGTACACAGCATTAAATCCAG
GGAGTCTGGTTTAAGGGCACAACTCTTAAGTACTAACTCCACTGCTGGATGGAA
AAAGATCAGTATAAATATGAATAATTTTGTCTACGCCTAAATAACTTAAGTTCATC
TACAGTACAACCTAATATGAAAGGATTCTGTTAGCTTTAATGAGAAGTAAAACAAG
AAACCAGAATCAAGCAAGGGGCCATGATTTCTTGTCTGGGATGGAACTCGGTTTCT
TTAAATAGCAAATGGAATAACACCAAATATATATAGAAATATAATGAGTGAAAAAT
AACACAAATTTAAGCAACAGTTCAAATACGTAATGTCCCTAGAACAATCTAAGTAG
ACAGTCTGTTATTTTCTTTCTTCCAAATCTTGTCATAGGTGAGCATAAGATGGTATCT
GCTTCATCCAGCTTTTATGAAAAGAAAAATTCTTACTTGAGAAGAAAGCCTTCATGA
CAGCTGTCACCAATATCATCATCATTGAGTACTGTATCAGCTATCTAAAATGCATCA
AAAAATAAAAAAATTAGTCTGGCTGTAACATAGTGTTGAAATAACACTTTTAATATA
CAAGTTTTTCGGAAGTCTGGATTCAATATAACACACTGCCTTCATTTCCGAGAATCAA
GACTCCCCAAAAACAATCTCTGTGCACTACCATAAACTTCAGAAGAACAATGTG
AAAGCTGGTCAAGCAGGTAAACAATTTTACAAGAACAACCTCCTCTTCTGAGCTG
TCAGAATCAGGAGACTAACCTAAATGACAAAATCAGAAAACAACAAGAATAGTTTC
CTAAAGGTATCTCTTAACACTCATAGTGTGTGATTCAAACGTCCTCAACAAATGAT
TAAGGAACTAAATTTGTGACTACAAGTAAACTTCCATTAATGGTACTACTTTGGC
ACACAGTTTTGTTTCAAAGACACTACATTAATATTAATTGCTCCTATAAGAGCTG
GGATCCTCCACTTTTAGGAATTATAAAAGTAATGAAATAAACAATAATGAATTTAAT
TTTGTATCACTGATCAAAAATGCCTCTGTTTTGCCATAAAAATCCAGGATTTTGTGTG
TGCTTATTTGCTAAAGTGGCTAATACTGTATGTGAATAGTATGTATGACAAAGTCCT
TACTATTAATAATTAGAATATTAATAATATACATAATAACTATAACCCCAAAAAAC
TCATAAAGTGTATAATTGCTCTCATTTAACTTACATCTATTTCTTCAGGAACACTGT
GTGATTTCATAGATGAAAGCAGTTCATTACAGGAATCACTTCTCCAGTAAGCATTG

GAATAATACTCTGACCCTGCACAATAAAGTGACATGAAGTGAAGAAAATCACGTAA
TATGAGAGAAGCTGGGCAATAAAAAATAAAAAATAACATCAAACAATAACATTCTTT
GATGAAAATACTTCGTAATTTGTTCAAACACAGTATCAAACAAGTCTACTACATGTC
TAAAGGATTTATATGCAATCCAAAGCTCACTTTTATTCTTTCTTTTCTTTTTTTTTTT
TGAGATGGAGTTTTGCTTTCATTGCTCAGGCTGGAGTGAATGGCGTGATCTCAGCT
CACTGCAACCTCTCCTCCCAGGTTCAAGTGACTCTCCTGTCTCATCCTCCCAAGTAGC
TGGGACTATAGGTGCCGCCACCATGCCCGGCTGATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACG
GGGTTTCGCCATGTTGGCCAGGTTGGTGTCAAATTTCTGACCATGCCCGGCCCTAAA
GCTCACTTTTATTCTTTAGAGAGTATGGAATCATTGGTTTATCGTTTACTGTTACATG
CAATGATTAAGTCATCATGCCTCTTTTAGAAAAGATCTCCTTTAAAATTTGAGATAA
AAAAAATTTGTTAAAGGTCATCAATATATTTTCATATTTAAAATGAGGAAAACCAA
GCACAAAAGACTTTGAAATCCTTACCAAATAGGTAAGGAAAACCTTGAATCAATAC
CTAACCTCCATACTCATAAAAAGTATAATCTACCCAAATGCAAATCAAATCAGCACA
TATATTTTAAGAATCAATAAAACAGAAAAATTCCCTTTAGAGCTATTTCAAGATATT
ACTACTTATTACATCTTGAAATTGTAATTTTGAATTTGTAGTCTATAGAATCAAAT
GAAAATTCAGTATAACACATCACAAATGTAAAGTGTCTCAAATATGGATGGTCCCTC
ATTTATTCACTACCACCACCAGTCTCATCAGTTTTGTGACCAACTGGTTAAGTAAAT
TTTTTGAGATATAAATGAAATTGTCAAATGACTATGCATTTTTAGCTAAACATATTTT
TTAAATCATAATTATTTAAGATGAATTTAATACTAGTTGTTTTTCTCACTTATTTT
ATGAAATGATTTTACTCAAAGTCTTCATAAGCATCTTTAAGTTAGAATCTTTGTCAG
ACCCAGGGCCATTTTTGGAGTAACCTTAACCAGTTTTTTCAGAGCCCCATATTATTA
GTTGCTTGAGAATTTAAATGTGATGCTACTTCTGGAAGTTTTATCCTAAGCCATATGC
CCATTTGCATAATGCTGAAAGTTTTATTTAAAAAAAACCATCCTTTAGTAACCTCC
ACAACCTAATCACTGTTTTTAGTTTTTAAAGTAATAATTATCATGCCTGTTTACA
ATTACAATTCACACATTCAATCTAACAAGAATAATGACTAGATCCGTGTTAAATTTT
CTTCCCTGTGAAGCAATTTTATCAGATGACAGCTACAACCTGAAGTTGTTTCAAAC
ATGCATCATCCCCAACAGTATTGTTCAAATAAAGTCGTTGTGAGATTTGCAAGAA
CTCAATCAAAGGCAACTCCTCCTTTTCGGGAAGAATAATTTTGGGAAAATATTTCC
TCTTAGGTTTAAAGCATAATAGTATTTTATTACAGTATCTCAGACATTATCAGTATA
AGTGAATGAATAGCCTCACTGAAGCTCAACAACACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAATCCTACAGGGCTAAATACAGAAGAGGCTCTAAAAGAAAATCTCTTAAGTTTC
TATTCCTCCTTGTACTTCCCAAACCTTGAACCTCTCAGCAGTAAGATAACATTTTTAAG
AAGAGCACTTAAAAGAGAGACCAAAATTCATTAATAGTAGTCAACTTAAGTAAAGG
TTTCTGGTTTGAAAAACAAAATCCCAGTAAAAGCAGAATTTTAGTTGGTTCTAAGT
TTCCTCAACTTGCATAAGTTTACTTAATTAGTCTACTAATAACTAGTGGGTTAGAG
GGTGCTGAAAGTTACCCATTCTGGGGACCCTGCTTATTGACCAGCAAATAAGGAC
TGGGATTTCTTTGGGTAAAGGGAAATCTTTTCTTGTTAAGTCAGACCTTTACACAGAA
TAACTGTCTCTGAATTGGAAAGCTATCTACAAAAGTACAAACATAACAATTTGGTAA
AGGAGATCATTGTATTGGGTTCTGTATTATGGCCATGTATTTTCACAAGTTTTTTTTT
TTAATTACTTTTTTAAAGTATCATCTGTCTCATTTCATGCTAAAAAGAAGCAAAGAAA

GGCAAAACAGCCATGTTTAAAATATTGGAGTTTTACAAGGAGCATTGAGGGTCACC
CACAAGAGGAAATGGAAGTAAAAGTGAAGA ACTCTTTCTTCACTGGAGATTCTCCTT
CAAAGA ACTTCTCTGCTTTACAGTGA AATAGTCTGTACTTAGTTTTCCGCAGGGGAA
GCCACACCCTTGTAACCATGCTTCTCAA ACTCTTAGTGTCTGTTCTGAGGGGCATTC
AAAGCCAAGGGATAAACATGGCACATTTTCCTAGAGGAGAGGGTAAGAAATATCAC
TGACAAATTTTAATACTAAAATAGTTATGGAATAAAATGTAAATTGCATGAGTCTTA
ACGATACAACATAAGACTTAGAAGAAATATTGTGTGGACCTGGGCCTACACCCCAG
ACAGATACCTCAGGGGTACATATGCTCTCCTTCTGTTACAGCTACTTCTAGGGAAAG
GTTTCGAGAAGTAGTACCTTAAAGA ACATATCAGAGACAATTTTTTTTTACTAT
GAACAAGTTATCCAAAATTTATTCTGGGCAAACAGAAAAAAAAAAGGGAGCAAATAT
TAATTTGTAGATGCAATTACTATTTTCCTTTGTTTACTGATTTAACTCTTTGGGTTTAA
GATATGGAAATCTTCCTCCAGTTTATTCTGTACACCTCCATAAAAGCTCCATTAAAG
GCTTATTCGTATGTCTCCAAGGCCTTGACAAATGTAGCCATCAACCTTATACAGATA
CATGCTGTGAGAAAAACATTTGACAGTATGCAATTTGCATATACCTGATCTTCCATT
CTCTCTGTGCCTTCTAAGATAATCTTCTGGACATTTTCTTGTCTTTCCTGAGCAAGAG
AAAATTTATTTAAAAAACAACCCACAACATTTTGATACTTGCTTATTTTTCAATAG
ACATGTTCTTGTGTAGTAATTTAGTTCACAAGAAAAATACTTTCTACTTTAGGGAAA
AAATGGGGGCAGGGGTAGGAAATTAACCCAACAAATGCATGTTCTCATAAACAATA
CAAATAAAATCAAACAACCTTTATTCTGCAGTGAAAAAAGATAACTTCACAGA
AAACAGTCAATGTAACATCTGCATAGTTTCAAAAAGGAAAAGAATGACTTGCACTT
TTCAAATTAACATTATGATGTTGTTTAAAAGATTCTCCTGATTTTAAGAGTTTCATA
ATGTGAGAAAAAAGGAAGTAAGCCTGCAAACATAGTAAAAAATTATTCTTTTAAAA
GATATTATTTTTCCTTACTATTGGGCAAAGCCTTTTAAA ACTGGTAATGCTTAATGG
ACTTTCAGGTTAGTATCAA ACTGGAACACAGGAAGGAGAATTCAATGTGTTCTTTAG
ATACATCAA ACTATACTGAAATGTAAATAGCATTATATATTCAACTACAGGATTTA
GGAAAACAATAATTTCTGTAAGATTA AAAAGGAATTCTCTTGGGAACCATTCCATTCA
ACCTCCTCATTTTATGAACCTGGGA ACTTGGCAAAGAGGGTTAAAGAGACCAAAGGC
TACATGACCAACAGCTTATGAA ACTATTACTTTGAACTGTTATACTTACACATAGTA
GTAAGCAAAGACAGAATTGTGCAATGAAAGGGAAACAAAAGGTATTAGAGTCAA
AGGCTCCCAAGAAGAATCCAGGGTCTAAAAGTTTCTTTATTTGTCTAAGCTTTAGCT
TTTCATCTATAATGTGGAGCTACCATTTTCGTACCTTCCACAGTTAATATGAAGATGA
CAGGTATCAGACCAGATGTATTTGTATCTAATAGGGTAAATGCAAAATAAATAACA
TTTATTGTTTGATGTTCACTGCATATAATTA AAAAAATAAGATTTATATGTACCAGA
AAATAAGCTTTCAACAGATAGGTTAACATGATTAATAAGCTGAAAAATCACTTACCT
TATGCATCCATATTCTTCCTTTCGGATTATATGTGTTAATCTATCAACACACACTCT
ATGAAGTGGGAGGTAGAACTAAGTTCTGTCTGTGGAAGTATAATTGATAGTCCAT
ATGTGCTGCGATCCCCATTCCAGTTTCCATCAAAGATTAATGAAACAATAATCACTC
CCTTTTCAGACAAGACAAAAA ACTTTACATCTATAGCACC ACTCTCTGCATTTCGAA
GGATTTCTCCATTTAGAGTGTGGTTGGCAAAGAAAAGTTATTTCTCCATCACTGAGAA
GTACCTGTTCTGTCTTTGGAGCCCAAATGTGCCTTACTCTAGGACCAAGAATATTGT

CCCAGTAAGCAAAAGTAGCTGCTAATAAAGGTGATTTGCCACTTAAAGCAATCTCTG
TCTTGGCAACAGCTGGAGATGGCGGTGGGCAAAGAGTCGACATCACTGCATTCCAA
CTGTACATTATCCAAATGCTCCGGAGATATCTAAACAATGACATATGAAACCAATG
ATTAGGTTTCAAGCAATTTAAAGATATCCATCAAAACCCCAAATGATTTAGACATATTT
GGTTTGTCTCTTAAGTCAAAGATGTGGAATCCTGTTATCTCCTATCAGGATAAAGA
CATTCAACTAGCACAGTAGGTGCACATTAAATGTTTGTGATATGATCATTTTACAA
GACATGGTAACTTGTACTTATATTCAGGGCATACATTTAGAAATTCAAAGAAATAA
CTTAAAAAAGGGCTTCTTTACACTGATATTAATGTTACATACTAAAGCTCATAGAA
TAGACCCGCAGTATTCCCAAATATCCAGTCCATGTGCAATTCTAGTATGACTGGAGA
TTTGGCCCCTAACCCATAGCAACTAAAAAGGAGAAAAACAGGAAGGGAAAGGCTC
AGCTAGAGACTGACACTTGTGGGTTGAATTGTGTCCCCCAAAGATATGTTCAATT
CCTAACCCCTTGGTGTACGTGAATGTGACCTTATCTAGAAATAAGTGTAATCATGTTA
AAATGGGGTCATACTGGATTAGAGTGGGGCCTAATCCAATAACTGCTGTGTTTATAA
GGAGAGAGATTTGGAGACACAGAGACAAATGGTAGACAGCCATGTGAAGACAAAA
GGCAGATACTGGATTGTTGAAACTACAAGGCAAGAAAGGAACACTCAGGATTGCTG
GTAACCACCAGAAGCCAGGAAGAGGCAAGGAAAGAGTCTTCTCTCTTGAAGATCAT
GCCCCTGTCAACACTTTGATTTTCGGACTTCTAGCTTCTAGAATTGTGAGAGAATAAA
TTGCTGTTGTTTAAAGCCACTCAGTTTGTGGTGCTTTGTTAAGTAATCTTAGAAAAGT
AATACAACACCTAACACAGAAATACTTTAAAGCCGCTAAAAGGTCAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAGACATGGAAATACCACAAGTCTGGAGCCATAACAAAAAATGGGC
AAACAGTCCTGTATCCTCAGTGAACCTCTCTGGTTATGAGAATACTGAAGCCCGATCC
TGATGTTTAAAACGACATTGAAGTATCAAGACAAAGATAAAAAATATTTAATATGCT
AGCCAAGAAACCAATACAGCATTTCATCACTGCAAAGAGAGTTCTACACTAAATGG
CTAGAATTTAAAAGCTTTAGTTATTTAGAACACGTAGAAAACAGAAGGGCTAAATA
GGGCCCGTTCAAGCCTTTGAATTTAATGAGAAAACAGACATGAGGAGAAGAACATA
AACGCTCACATCCAAGACAGAACCCAGGGCTCTTGGTCCCCTTGCTCAACTTGTACA
TCTTAATCCACATAAACATAACACTCTAAAAAGGTACATCCTATGTGATATTAATGT
AAAACAAATCATTCTTGCAAATACAGTTATGTGCCATGTAACGTTTCAGTCAATGGT
AGACTGCATATATGATGGTAGTCCCATTAGATTACAATGGACCTGAAAATATGCTAT
TGCCTTAGTGACACTGTAACCATCATAAGGTCTTAGTACTATTTTGCAAGTTATTTAA
AGTATAGCACATAACAATTATTACAGTGTACAACACTTGATAATAAACTACTACATTG
CTGGTTTATGTATTCATACTATACTATGCCTTTTATTGTTATTTTAGAGTGCCTCCTTCT
ACTTTTTTTTTTTTTAAGTTAAATGTAAAACAGCCTCAGGCAAGTCCTTCAGGAGGTA
TTCAACAGAAAGCACTGTTATCATAGGTGACAGCTACATGTGTGTTATTGCCCCTAA
AAACCTTCAGTGGGACAAGATGTGGAGGTGGAAGGCAGTGAGGTGGAAGGGAGT
GATACTGATGATCCTAATCCTGTCTATGCCTAGGTGAAAGTGTGTGTGTTTTAGTTTT
TAACAAAAACGACTAACAAAGTAAAAAAAAAAAAATTTAAATAGAAAATAGAAAAA
GCTTCTAGAATAAGGATACAAAGAAAAAATATTTTTGTATAGCTATACAATGTATTT
GTGTTTCAAGCTAAGTATTTTAAAAGTTAAAAAATTA AAAAGTTTACAAAGTTAAAA
AGTTATAATTTTTTATTGAAGAAAACTGTAAAGATAAATTTGGTGTAGCTTCAGCG

TACTGTGTTTATAGTCTACAGTGGTGTACAGTGTCTAGGCCTTCACATTAATTCACC
ACTCACTCACTGACTCACCCAGAGCAACTTCTAGTCCTGCAAGCTCCATTCGTGGTA
AGTGGCCTACACAGGTATACCATTATCTTTTATACCATACTTTTACTGTACCTTTTCT
CTGTTTGCATATATTTAGATAAATATTTACCACTGTGTTACAACCTGTCTATAGTATTC
AGTACAGTAACAGTTGTACAGGTTTGTGGCCTAGGAGCAACAGACTATAACCATACG
GCCTAGGTACATAAAGGCTATACTATCTAGGTTTGTGTAAGTACACTCTATGATGTT
TGCATAATGACAAAATCGCCTAATGATGCATTCCTAAGCAATGTGTGATTGTACTAT
AATTGAAGACTTGTTATCTAAGACTGAAAGTAAAAAGAATTGCAATTCACCTAAGC
AAGTCTAAAACCTGTGAAGTCTATTTATAATAATAGCAATACAAAGCAGCTAATAGG
CAAACCTATGATATACCTATCTTTGCCATATGATTGCTTTGGGAGCTAACATTTGATCT
GTAAATGTATGACAAAAGTAAACAATTTTACTTAAAGAATTCATCCACATCTTGTC
AGAGAGTTCAGTCTGATGGAAAGCACTGACTTCTATTTACAGAGCATTAGATGAGTG
CTTTTATCATATTATGAGTAGGCATACAGAGCCTGGCAAAACAGTTAACTCTAAGTA
TGTACAGAAATGGTTGAACACAACGACAGTTTTAACACGTGTATTTGTAATTTCAA
AATTCATTTAGGTAATATTTACTTTTTAAATATGTTGTATCAATTTAATAGTCTTAAGA
GACAGCACTAGATATAAGCCGTACAGCTTCTTTAAAATATCCACTGTTTTTAATACA
ATGTAAGCAGTCAGTTTACAATGATCAAATATAGGAATGTAATCTGAATTGAAATG
GTAATGACACTACTGCTGTCATAACTAACAACAGCAAACCTGGAGGCCAACATAATG
AATTAAGTTAACATACAACCATAAAATTATATTGCAAACATATTTTTCTTTTATTCTT
TTAGGTTAAAAAGGTGGATAATCATAAAGGCAATATTACAACCTCTAATATTTTCATCA
TTAAACTGAAAATAAAAAGTATTTCTAAAACAGAACTGAACCCTGGAGCAAATCT
GATTGAATTATAGGGAAACTTTTACCACGTTGTGAAAATTGAACTATTATACTGCTA
GTTACACTCTCACTCCTAACAGAATAAGAAAAAATAATGGGCCGGGCATGGTGGG
TCACACCTGTTATCCCAGCTCTTTGGTAGGCCGAGGCAGGTGGATCACCTGAGGTCA
GGAGCTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCACCTCTACTAAAAATACA
AAAAATTAGCCGGGTGTGGTGGTGGACACCTGTAATCCCAGCTACTCGGGAGGCTG
AGGCAGGAGAATCTCTTGAACCCGGAGGTGGCAGAGGTTGCAATGAGCTGAGATGG
CGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGAGAGACTCTGCCTCAAGAAAAAACA
AACAAACAAACAAACAAAAAGAATAAGAAAGAAAATGAAGGACAAAGATCATACT
GAATTGCTTAGTTTTAAATCCTACCAAAGAAATAGCCTGGGAAATGAAATGTCAC
AGAGAAGTATAATCAGGAGAGCTGTACAATTATTTTACTAATACTTGAAGTCATCGT
CTTTGGTGAGAAAAATCCATACATGCAAATGCAGCTGAAAAAATCAGCTCAAAC
CAATAGTTGTTTATGTACCTATCTTACGTACATGTAGTGCTGTCTACTCCAGAGAGTT
ACCAAACATTAGCCAGTCTTTTGGAGGGAAGCCAAGATTCAAATTGAGTGAGACGGT
GGCTTGCTCACAGGGTTCATGAGAGGTTTCCAATACACTTTCTGGAAATAATCCCA
TACATGCAGACATGATTACATTAATTAACATCTGCTAAAACCTGTTAGTAGAGTGCTA
AGTTTGAGGTTTTGCTTTTTCTTTAAACGTCTGTTAAAAAATCAACCATCTCTTCCCT
GATTGGTATTTAGAAAGGTGGTTGGTCCACTGCTATTGTAGTGAAAATTCTACAATC
ATAAAGCCCTCACTTCTTGTTTTTTAGAGACAGGGTCTCGTTTTGTCATCCAGGCTGG
AATGCACTGGCAGGATCATAGCTCTCGGTAACCTCAAACCTTGGGCTCAAATGACC

CTCCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTAGGACTACAGGTGCACATCACCACGCCCGGC
TAAGTTTTTAATTTTTGTAGAGACAGGGTCTACGTTGCCCAGGTTGAGCTTGAACTC
CTGGCTTCAAGTGATCCTCTTGCCTCCGCCTCCCAAGCTCTGGCATTACAGGTGTA
AGCCACCTTCTCCAACCTGGCTCTCAATACTTGTAACCATGCTGTTTATTTCTCCCA
GCCCAAAGAGAAGCAGGATCCTAAACCGTCCACTTTCCACAACAGGAGCTGCCCAG
GACCACTTCAAGGACAGTGAAGTGTACAGTACCAGAAAGTTCACAACACTTTCTC
AATCTTCAACATCAGGGAAGACTGGAAGGTGAAGTTCATATCACTATCTGGCCATTT
CTCACAGTTCCAAGTTTCTCAGACAATAGGTAGGCTAACCTAGTCCTCCTGGGAACT
ATCTAATTAACGTAGAATAGAACCCGAGGGCAGACTTGAAAAACAGAAGTCCTCCT
TGGTTTACTTTGTTTCTCTGAAAGCAAATTGTGGAGTGCCAACATAGCCAAACAAAA
TATTTTATCAACTTCATAAGGTGCTTGTAATTTTTTCTGGAGCAGGTAAATGCTGGC
TTAGTGAACAATCTGGAATGTGGTAATTACTCTCGTTCTTGTTCAGATGTACTATCA
GCATGTAGCAGTTTCCAACCTGATTCAGGGTTTTCTAAAGTGGCAGGCCTTGGCAGA
GGTGGTGACAACAATGCCCGTGTCAAATGACACCGTATTTCAAGTATTCTGACTCCA
GGTTATTAATATCCCCTATATGATAGTCTTGTCTGTGATATTACAGATTATGTTA
AAAGTTTCCCAAAGTCTGAGAAAAATCATATCTTAACAGTATCTTTTTTTTTTTGAT
CCTTTGTACAAAAGTAGAAGTAATGCCAGACAGATTACGTACCCTTGTTGTGAACAA
CTGGTGCATGGCAACTGTTTGAATAGAAATTTACCAACTGCCACAACCAGGCAACTA
CTCTCCCAGAGCCTAACAATCTCGATTGCATCTGAAAGGGCCACCCTCCTGGGAAA
GTGCAGGACCTCCCTCCTGTTTCTGAATACAAAGCCTGGTGGTGTTC AACGCGGCCA
GATAGACCCAATGAGCACACGGACATGTAATCTGTGCACTTCTTTAGACA ACTGATT
ACCATCAGTCAAGTGATGCCAAGTCACAATAGTCACTTCCTTTAAGCAAGTCTGTG
TCATCTCGGAGCTGTGAAGCAACCAGGT CATGTCCACAGAATGGGGAGCACACCG
ACTTGCATTGCTGCCCTCATATGCAAGTCATCACC ACTCTCTAGAAGCTTGGGCTGA
AATTGTGCAGGCGTCTCCACACCCCCATCTCATCCC GCATGATCTCCTCGCCGGCAG
GGACCGTCTCGGGTTCCTAGCGAACCCCGACTTGGTCCGCAGAAGCCGCGCGCCGC
CCACCCTCCGGCCTTCCCCAGGCGAGGCCTCTCAGTACCCGAGGCTCCCTTTTCTC
GAGCCCGCAGCGGCAGCGCTCCCAGCGGGTCCCCGGGAAGGAGACAGCTCGGGTAC
TGAGGGCGGGAAAGCAAGGAAGAGGCCAGATCCCCATCCCTTGTCCTGCGCCGCC
GCCGCCGCCGCCGCCGGGAAGCCCGGGGCCCGGATGCAGGCAATTCACCAGT
CGCTAGAGGCGAAAGCCCGACACCCAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGAAAGT
AAAAATGCGTCGAGCTCTGAGGAGAGCCCCGCTTCTACCCGCGCCTCTTCCCGGCA
GCCGAACCCCAAACAGCCACCCGCCAGGATGCCGCCTCCTCACTACCCACTCGCCA
CCGCCTGCGCCTCCGCCGCCGCGGGCGCAGGCACCGCAACCGCAGCCCCGCCCGG
GCCCCGCCCCGGGCCCGCCCCGACCACGCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCCCCTAGCGC
GCGACTCCTGAGTTCAGAGCTTGCTACAGGCTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCT
TCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCAACCCTCAGCGAGTACTGTGAGAGCA
AGTAGTGGGGAGAGAGGGTGGGAAAAACAAAAACACACACCTCCTAAACCCACAC
CTGCTCTTGCTAGACCCCGCCCCAAAAGAGAAGCAACCGGGCAGCAGGGACGGCT
GACACACCAAGCGTCATCTTTTACGTGGGCGGAACTTGTCGCTGTTTGACGCACCTC

TCTTTCCTAGCGGGACACCGTAGGTTACGTCTGTCTGTTTTCTATGTGCGATGACGTT
TTCTCACGAGGCTAGCGAAATGGGGCGGGGCAACTTGCCTGTTCTTTTATCTTAAG
ACCCGCTCTGGAGGAGCGTTGGCGCAATAGCGTGTGCGAACCTTAATAGGGGAGGC
TGCTGGATCTGGAGAAAGTGAAGACGATTTTCGTGGTTTTGAATGGTTTTGTTTGTGC
TTGGTAGGCAGTGGGCGCTCAACACATAATTGGTGGATGAAATTTTGTTTTTACCGT
AAGACACTGTAAAGTGCATTCAAACTCCACTGCAAACCCTGGTAGGGGACAGCTC
CGGCACTGCGGGCGGGAATCCCACGGTCCCCTGCAAAGTCATCGCAATTTTGCCTTT
ACATGTAAGAATTCTCTCAAGCATGATTTTCACACTGGGGAATGTCATTTTTGCTAG
TTGCAATATGTGGATGAGTTGTTTTTTTTTAACTTTTGAAAAACGTACCATTCTGTTT
GATGTGTAACAAAACACAAAGATTTTTGAAACCTTGCCTTTTTGGTCTGCAGGTGTA
TAGATTCCACTTACTACAGATGAGTAGCATTACACCACTCAGATGTGTAACAAAAC
AAAGTTTTTTTTAACTGTGTGCCTTTTGATCTGCAAGTGTGAGATGGCACTTACTAC
AGTGAGTAGCATTTAATCTTTTTTCATCACTAAAAATCACACAGAACGTTTTAATCAT
TCACCGAGGAAGAAAGGGAGGAATAAATACACAAAATGGCTCTCAACGTCTACACC
TTCTGCAGAAACAGACCCTTTTCTACTGTTCTATGCTTTTGTGAAAGTTGATCATA
AATTGGGTCATTCTTTTTATACCAACTAAAATAGTGGGGGTAGGGGGTAGAAAAG
CACTTAGGACAAATGACACTGCTCCACAGTGTAATTCTCTCCAAGTCCAGCTGCTG
CAACTGCCCGTTGTGACCTGAGACCAGTTTTATCTAATAGTTGCTAAAATGACCTGC
TGCAGCTCTAATTTTATCTACCACCATCACTCACCAGTTGAAACTCACCAGCTCCTCA
GATCCTTAATAGTGCCAATGAATTTTCTCAAAGAGCACTATGTAACATTTCTCTTTTT
TAACAAAACCTCCCCCTTTTCTTTGTTGTGTGGATATACCGAAGACCATCTGATCTAC
ATGTATGCCCTAATTGCAATTCTTTCTTCCCAAATAAATCACTTAATTTAGAGATTCA
TCTCTGTATTTTTATTTGACTGACAGCTTATAACAAGTAGCTAGCATTACCAAGTT
TCTACACTGAGTTGTACTTCACTTATACGTGGAATTAACAAAACAACTGAATTTATAG
AAACAGAGTAGACCCTTGGTTGGGGGGCTTGGGGGGAAAGAAAATTGTAGGGTAGG
GTACAAAGTTGCAGTTACGTCTAATACATCTAGAGATTTAATGTACAACATGAGGAC
TAGCGTTAATAATTGTGTTAGTCCATTCTTACACTGCTATAAAGAAATAACTGAAAC
TGGGTAATTTATAAAGAAAAGTTAATGGCTCACAGTTCTGCAGGCTGTACAAGAA
GCATGGCTGGATCAGCTTCTGGGCAGGCCATAGGGAACTTAAAATCATGATGGAAG
GCATAGGGAGACCCAGACTTACATGGCAGGAACTGGGGGAAGAGAGAAATGGG
AGGTGCTACATACGTTTAAACAACACTAGATCTTGTGCAAGTCACTATATAGTACCAA
GAGGGGACTGTACAAAACCATTAGAAGCCACCCATAATCCACTCACCTCCCACCA
GGCCCAACCTCCAACACTGGGGATTACAGTTGAACATGAGATTTGGGTGGGGACAG
AGATCCAAACCATGTTATTCCAACCTCTGGCCCCTCCCAAATCTAATGTCCTTCTCATA
TTGCAAAATACTGTCGTGCCTTACCAACAGTTCCCAAAGTCTTAACTCGATCCAGC
ATTCATTCAAAGTCCAAAGTCCCAAGTCTCACCTGAGACGAAGCTAGTCCCTTCTA
CCTATGAACCTGTAAAATCAAAAACAAGGTAATTGCTTCAAAGATACAATGGGGGT
ATAGGCATTGGGCAGATACTGCCATTCCGAAAGGGAGAAATCTGCCAAAAGAAAGA
GGCTATAGGGCCCCATTGCAAGTCTGAAAGCCAGCCGGGCAGTCATTAATGTTAA
AGCTCTGAAATAATCTCCTTTGACTCACACCAGGGAACACTGATGCAATGAGTGGG

CTCCCAAACCTTGGGCAGAACCACCCCTGTGGTTTTCCAGGGTTCATCTCCCACAG
CTGCTCTCATGGGCTAGCATTGAGTGCTTGCAGCTTTTCCAGGCTGCAGGGTGCAAG
TTGTTGGTGGATCTACCATTCTGGGGTCTGGAGGACGGTGGCTGTCTTGTTCATAGCT
CTGCTAGGCAGTGCCCCAGGGGACTCTCTGTGGGGGCTGCAACCCACATTTCTTCT
CCTTGCTTCCCTAGTAGATGTTCTCCATGAGGATTCCACCCAGTAACAGGCTTCTGT
CTGGACATCCAGGCTTTTTCATACATCCTCTAAAATCTAGGCAGAGCTTCTTAAGCC
TCAACTCTTGCATTATGTGCGCCCGCGGCTTACAGCTTATGGAAGCCACCAAGGC
TTATGCCTGGCACCCCTGTGAAGCAGCAGCCTGAACTGTATTCTTACTGGTGAAAGTT
ATCTGAGTTACCAGCTGCAAATCCATGTGGGTCTGCAGCAACCTCAATTCTTGCCTC
CTCAGAAGAAAGAATTTGACCAAGAGGCATAAAGGCAGAAAAAGAGACTGCGACAA
GTTTCAGAGCAGGAGTAAAAGTTTATTA AAAAGCTTTAGAACAGGAATGAAAGGAA
AGTACATTTGGAAGAGGCCCAAGTGGGCACCTTGGAGGTCAAGTGCCCTGTTTGAC
CTTGAACCTAGGATCTTATACACTGGCCTACTTCTGACATCTTGTGCCCTTTCCCTT
GGTCCTTCCCTAAGGGTGAGCTTGCCGCATGCATGGTGCCCTGCTTGC ACTTGGAAAG
GTGAGCGTGTGCAGTGTGTTTACTGGAGTTGTATACATGCTTACCTGAGGCTTTCTTC
CCTTTTCCGGTGGAATGCCCCAAAGGTCATACTTACCATTTTGCCTCTTAATGTGC
ATGTTAAGCCCCTCTCTCAGTTCCTGAGATCTTATTGGAAGCGCCAGTTACCAAT
TTCAGGTGTTTCTATCTATTGAGAAGTTGCCTCTCCCTGGTGCTGGCTGCAACCAATT
ACTATTTTAGAGAGGCAGTATGACA ACTGCCTGACCATCATCTGATGGTTGCCTGAC
ATTCTGGTGGGTGGTGGGGACTTCTCTTTACCCCACTCATGCCTGATTAGCTACCT
ACTGTAACAGTACCTGGGCCCTTTGAGCAGCTGGGATTCAGGGAGCAGAGTCCCA
AGGCTGTAAGAGGGAGCAGGGGCCCTAGGCCTGGCCCAGGAAATGATTCAGTCCTC
CTAGGCCTCGGGGCTGTGATGAGAGGGACCACCATGAAAGCCTAAAATGCCTATT
AGGAACACTTTTACACTGTTGGTGGGACTGTAAACTAGTTCAACCATTGTGGAAGTC
AGTGTGGCGATTCTCAGGGATCTAGA ACTAGAAATACCATTTGACCCAGCCATCCC
ATCACTGGGTATATACCCAAAGGACTATAAATCCTGCTGCTATAAAGACACATGCAC
ACTATGTTTATTGTGGCACTATTCACAATAGCAAAGACTTGGAACCAACCCAAATGT
CCAACAGTGATAGACTGGATTAAGAAAATGTGGCACATATACACCATGGAATACTA
TGCAGCCATAAAAAATGATGAGTTCATGTCCTTTGTAGGGACATGGATGAAATTGG
AAATCGTCATTCTCAGTAAACTATTGCAAGGTCAAAAAACCAAACACCACATGTTCT
CACTCATAGGTGGGAATTGAACAATGAGAACACATGGACACAGGAAGGGGAACAT
CACACTCTGGGGACTGTTGTGGGGTGGGGGAGGGGGGAGGGATAGCATTAGGAGAT
ATACCTAATGCTAAATGACGAGTTAATGGGTGCAGCACACCAGCATGGCACATGTA
TACATATGCAACTAACCTGCACATTGTGCACATGTACCCTAAA ACTTAAAGTATAAT
ATAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATGCCTGTTAGTCCTATGAGTCTTTCT
CCCCATTGTTTTGGTTATCAGCCCTTGCCCTTCTTTTAGTTATGCAAATTTATGCAGC
CTGCTTGACTTCCTCTCCTGAGAACGAGCTTTTCTTTACTACCACATGGCCAGGCTGC
AAAATTTACAACTTTTATGCTCTGCTTCCCTTTTAAGTGTAAGTTCCAATTT CAGGT
CATTTCTGTGCTCATGCCTATGAGCATAGGCTATTAGAAGCAGCTAGGTTACTTCTT
GAACACTCTGCTGCTTAGAAATTTCTTCTGCCAGATACCCTAAATCATCATTCTTAAG

TCTAAGATTTACAGATCCCTAGAACAGAGGAACAATGCAGCTAAGCTCTTTGCTAA
AGCATAGCAAACCTGACCTTTACTCATTCCCAATAAATTTCTCATTTCATCTGAGAC
CTCCTCAGCCTGGACTTCACTGTCTATATCACTATCAGTATTTTGGTTACAACCACTC
AACAAGTTCCTAGCGAGTTCCAAACTTTCTCTCATCTTTCTGTCTTCTTCTGAGCCCT
CTAAAATGTTTCAACTTCTGCCTGTTAGCCGGTTCCAAAGTCACTTCTACATTTTCAG
GTATCTTTATAGCAATGCCCTTCTTCTCAGTAACAATTTTCTGTATTAGTCCATTCTT
GCATTGCTATAAAGAAATACTTGAGACTGGGTAATTTACAAAGAAAAGAGGTTTAA
TTGACTCATGGTTCTGCAGGCTGTATAGGAAGCATGGCAGCATCAGCTTCTGGGGAT
GCCTCAGAGAACTTACAA

>SEQ ID NO: 17 нуклеотиды 3127-5607 из NG_031977.2

GAGTTGGAATAACATGGTTTGGATCTCTGTCCCCACCCAAATCTCATGTTCAACTGT
AATCCCCAGTGTGGAGGTTGGGCCTGGTGGGAGGTGAGTGGATTATGGGGTGGCT
TCTAATGGTTTTGTACAGTCCCCTCTGGTACTATATAGTGAGTTCTGACAAGATCTA
GTTGTTTAAACGTATGTAGCACCTCCCATTTCTCTCTTCCCCCAGTTCCTGCCATGTG
AAGTCTGGGGTCTCCCTATGCCTTCCATCATGATTTTAAGTTCCCTATGGCCTGCCCA
GAAGCTGATCCAGCCATGCTTCTTGTACAGCCTGCAGAACTGTGAGCCATTAACCTT
TTCTTTATAAATTACCCAGTTTCAGTTATTTCTTTATAGCAGTGTAAGAATGGACTAA
CACAATTATTAACGCTAGTCCTCATGTTGTACATTAATCTCTAGATGTATTAGACGT
AACTGCAACTTTGTACCCTACCCTACAATTTTCTTTCCCCCAAGCCCCCAACCAAG
GGTCTACTCTGTTTCTATAAATTCAGTTGTTTTTTAATTCCACGTATAAGTGAAGTAC
AACTCAGTGTAGAACTTGGTAAATGCTAGCTACTTGTATAAGCTGTCAGTCAAAA
TAAAAATACAGAGATGAATCTCTAAATTAAGTGATTTATTTGGGAAGAAAGAATTG
CAATTAGGGCATAACATGTAGATCAGATGGTCTTTCGGTATATCCACACAACAAAGAA
AAGGGGGAGGTTTTGTTAAAAAAGAGAAATGTTACATAGTGCTCTTTGAGAAAATT
CATTGGCACTATTAAGGATCTGAGGAGCTGGTGAGTTTCAACTGGTGAGTGATGGTG
GTAGATAAAATTAGAGCTGCAGCAGGTCATTTTAGCAACTATTAGATAAAACTGGTC
TCAGGTCACAACGGGCAGTTGCAGCAGCTGGACTTGGAGAGAATTACACTGTGGGA
GCAGTGTCATTTGTCCTAAGTGCTTTTCTACCCCCTACCCCCTACTATTTTAGTTGGGT
ATAAAAAGAATGACCCAATTTGTATGATCAACTTTCACAAAGCATAGAACAGTAGG
AAAAGGGTCTGTTTCTGCAGAAGGTGTAGACGTTGAGAGCCATTTTGTGTATTTATT
CCTCCCTTTCTTCCCTCGGTGAATGATTAACCGTTCTGTGTGATTTTATAGTGATGAAA
AAGATTAAATGCTACTCACTGTAGTAAGTGCCATCTCACACTTGCAGATCAAAAAGGC
ACACAGTTTAAAAAACCTTTGTTTTTTTACACATCTGAGTGGTGAAATGCTACTCAT
CTGTAGTAAGTGGAATCTATACACCTGCAGACCAAAAAGACGCAAGGTTTCAAAAAT
CTTTGTGTTTTTTTACACATCAAACAGAATGGTACGTTTTTTCAAAGTTAAAAA
CAACTCATCCACATATTGCAACTAGCAAAAATGACATTCCCCAGTGTGAAAATCATG
CTTGAGAGAATTCTTACATGTAAAGGCAAAATTGCGATGACTTTGCAGGGGACCGT
GGGATTCCCGCCCGCAGTGCCGGAGCTGTCCCCTACCAGGGTTTGCAGTGGAGTTTT
GAATGCACTTAACAGTGTCTTACGGTAAAAACAAAATTTTCATCCACCAATTATGTGT
TGAGCGCCCACTGCCTACCAAGCACAAACAAAACCATTCAAACCCACGAAATCGTC

TTCAC TTTCTCCAGATCCAGCAGCCTCCCCTATTAAGGTTTCGCACACGCTATTGCGCC
AACGCTCCTCCAGAGCGGGTCTTAAGATAAAAGAACAGGACAAGTTGCCCCGCCCC
ATTTTCGCTAGCCTCGTGAGAAAACGTCATCGCACATAGAAAACAGACAGACGTAAC
CTACGGTGTCCCGCTAGGAAAGAGAGGTGCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGCCCAC
GTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTCAGCCGTCCTGCTGCCCGGTTGCTTCTCTTTTGG
GGGCGGGGTCTAGCAAGAGCAGGTGTGGGTTTAGGAGGTGTGTGTTTTTGT TTTTCC
CACCTCTCTCCCCACTACTTGTCTCACAGTACTCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAG
ACCTGATAAAGATTAACCAGAAGAAAACAAGGAGGGAAACAACCGCAGCCTGTAG
CAAGCTCTGGA ACTCAGGAGTCGCGCGCTAGGGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGCGTG
GTCGGGGCGGGCCCGGGGGCGGGCCCGGGGCGGGGCTGCGGTTGCGGTGCCTGCGC
CCGCGGCGGGCAGGCGCAGGCGGTGGCGAGTGGGTGAGTGAGGAGGCGGCATCC
TGGCGGGTGGCTGTTTGGGGTTCGGCTGCCGGGAAGAGGCGCGGGTAGAAGCGGGG
GCTCTCCTCAGAGCTCGACGCATTTTTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGACCGAAGCTG
GGTGTGCGGGCTTTCGCCTCTAGCGACTGGTGG AATT

>SEQ ID NO: 18 обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO: 17
(hg38_ДНК диапазон=chr9:27573260-27575740)

AATTCAC CAGTCGCTAGAGGGCGAAAGCCCGACACCCAGCTTCGGTCAGAGAAATG
AGAGGGAAAGTAAAAATGCGTCGAGCTCTGAGGAGAGCCCCGCTTCTACCCGCGC
CTCTTCCC GGCAGCCGAACCCCAAACAGCCACCCGCCAGGATGCCGCCTCCTCACTC
ACCCACTCGCCACCGCCTGCGCCTCCGCCGCCGCGGGCGCAGGCACCGCAACCGCA
GCCCCGCCCGGGCCCGCCCCGGGCCCCGCCCGACCACGCCCGGCCCGGCCCGCCCC
GGCCCCTAGCGCGCGACTCCTGAGTTCAGAGCTTGCTACAGGCTGCGGTTGTTTCC
CTCCTTGT TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTACCCCTCAGCGAGT
ACTGTGAGAGCAAGTAGTGGGGAGAGAGGGTGGGAAAAACAAAACACACACCTC
CTAAACCCACACCTGCTCTTGCTAGACCCCGCCCCAAAAGAGAAGCAACCGGGCA
GCAGGGACGGCTGACACACCAAGCGTCATCTTTTACGTGGGCGGAACTTGTGCTGT
TTGACGCACCTCTTTTCTAGCGGGACACCGTAGGTTACGTCTGTCTGTTTTCTATG
TGCGATGACGTTTTCTCACGAGGCTAGCGAAATGGGGCGGGGCAACTTGTCTGTTC
TTTTATCTTAAGACCCGCTCTGGAGGAGCGTTGGCGCAATAGCGTGTGCGAACCTTA
ATAGGGGAGGCTGCTGGATCTGGAGAAAGTGAAGACGATTTTCGTGGTTTTGAATGG
TTTTGTTTGTGCTTGGTAGGCAGTGGGCGCTCAACACATAATTGGTGGATGAAATTT
TGTTTTTACCGTAAGACACTGTTAAGTGCATTCAAACTCCACTGCAAACCTGGTA
GGGGACAGCTCCGGCACTGCGGGCGGGAATCCCACGGTCCCCTGCAAAGTCATCGC
AATTTTGCCTTTACATGTAAGAATTCTCTCAAGCATGATTTTCACACTGGGGAATGTC
ATTTTTGCTAGTTGCAATATGTGGATGAGTTGTTTTTTTTTA ACTTTTTGAAAAACGTA
CCATTCTGTTTGATGTGTAAAAAACACAAAGATTTTTGAAACCTTGCCTTTTTGGTC
TGCAGGTGTATAGATTCACCTTACTACAGATGAGTAGCATTTACACCACTCAGATGT
GTAAAAAACAAAGGTTTTTTAACTGTGTGCCTTTTGATCTGCAAGTGTGAGATGG
CACTTACTACAGTGAGTAGCATTTAATCTTTTTTCATCACTAAAAATCACACAGAACG
TTTTAATCATTCACCGAGGAAGAAAGGGAGGAATAAATACACAAAATGGCTCTCAA

CGTCTACACCTTCTGCAGAAACAGACCCTTTTCTACTGTTCTATGCTTTGTGAAAGT
 TGATCATACAAATTGGGTCATTCTTTTTATACCCAACTAAAATAGTGGGGGTAGGGG
 GTAGAAAAGCACTTAGGACAAATGACACTGCTCCCACAGTGTAATTCTCTCCAAGTC
 CAGCTGCTGCAACTGCCCGTTGTGACCTGAGACCAGTTTTATCTAATAGTTGCTAAA
 ATGACCTGCTGCAGCTCTAATTTTATCTACCACCATCACTCACCAGTTGAAACTCAC
 CAGCTCCTCAGATCCTTAATAGTGCCAATGAATTTTCTCAAAGAGCACTATGTAACA
 TTTCTCTTTTTTAACAAAACCTCCCCCTTTTCTTTGTTGTGTGGATATACCGAAGACC
 ATCTGATCTACATGTATGCCCTAATTGCAATTCTTTCTTCCCAAATAAATCACTTAAT
 TTAGAGATTCATCTCTGTATTTTTATTTTACTGACAGCTTATAACAAGTAGCTAGCA
 TTTACCAAGTTTCTACACTGAGTTGTACTTCACTTATACGTGGAATTAATAACAAC
 TGAATTTATAGAAACAGAGTAGACCCTTGGTTGGGGGGCTTGGGGGGAAAGAAAAT
 TGTAGGGTAGGGTACAAAGTTGCAGTTACGTCTAATACATCTAGAGATTTAATGTAC
 AACATGAGGACTAGCGTTAATAATTGTGTTAGTCCATTCTTACACTGCTATAAAGAA
 ATAACTGAAACTGGGTAATTTATAAAGAAAAGTTTAATGGCTCACAGTTCTGCAGGC
 TGTACAAGAAGCATGGCTGGATCAGCTTCTGGGCAGGCCATAGGGAACTTAAAATC
 ATGATGGAAGGCATAGGGAGACCCCAGACTTCACATGGCAGGAACTGGGGGAAGA
 GAGAAATGGGAGGTGCTACATACGTTTAAACAACACTAGATCTTGTGCAAGCACTAT
 ATAGTACCAAGAGGGGACTGTACAAAACCATTAGAAGCCACCCCATATCCACTCA
 CCTCCACCAGGCCCAACCTCCAACACTGGGGATTACAGTTGAACATGAGATTTGGG
 TGGGGACAGAGATCCAAACCATGTTATTCCAACCTC

>SEQ ID NO: 19 нуклеотиды 5127-5607 из NG_031977.2

GGGTCTAGCAAGAGCAGGTGTGGGTTTAGGAGGTGTGTGTTTTTGTTTTTCCACCC
 TCTCTCCCCACTACTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAGACCTG
 ATAAAGATTAACCAGAAGAAAACAAGGAGGGAAACAACCGCAGCCTGTAGCAAGC
 TCTGGAACCTCAGGAGTCGCGCGCTAGGGGCCGGGGCCGGGGCCGGGGCGTGGTCGG
 GGCGGGCCCGGGGGCGGGCCCGGGGCGGGGCTGCGGTTGCGGTGCCTGCGCCCGCG
 GCGGCGGAGGCGCAGGCGGTGGCGAGTGGGTGAGTGAGGAGGCGGCATCCTGGCG
 GGTGGCTGTTTGGGGTTCGGCTGCCGGGAAGAGGCGCGGGTAGAAGCGGGGGCTCT
 CCTCAGAGCTCGACGATTTTTACTTTCCCTCTCATTTCTCTGACCGAAGCTGGGTGT
 CGGGCTTTCGCCTCTAGCGACTGGTGGAAAT

>SEQ ID NO: 20 обратнoкомплементарная последовательность SEQ ID NO: 19
 (hg38_ДНК диапазон=chr9:27573260-27573740)

AATTCACCAGTCGCTAGAGGGCGAAAGCCCGACACCCAGCTTCGGTCAGAGAAATG
 AGAGGGAAAGTAAAAATGCGTCGAGCTCTGAGGAGAGCCCCGCTTCTACCCGCGC
 CTCTTCCCGGCAGCCGAACCCCAAACAGCCACCCGCCAGGATGCCGCCTCCTCACTC
 ACCCACTCGCCACCGCCTGCGCCTCCGCCGCCGCGGGCGCAGGCACCGCAACCGCA
 GCCCCGCCCGGGCCCGCCCCGGGGCCCGCCCCGACCACGCCCCGGCCCCGGCCCC
 GGCCCCTAGCGCGCGACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAGGCTGCGGTTGTTTCC
 CTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTACCCCTCAGCGAGT

ACTGTGAGAGCAAGTAGTGGGGAGAGAGGGGTGGGAAAAACAAAAACACACACCTC
CTAAACCCACACCTGCTCTTGCTAGACCC

SEQ ID NO. 21

CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGGAAAGTAAAAATGCGTCGAGCTCT

SEQ ID NO. 22

CGCGACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAGGC

SEQ ID NO. 23

AGGCTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT

SEQ ID NO. 24

GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCCACC
CTCAGCGAGTACTGTGAGAG

SEQ ID NO. 25

CTCAGCGAGTACTGTGAGAGCAAG

SEQ ID NO. 26

ACCTCCTAAACCCACACCTGCTCTTGCTAGACC

SEQ ID NO.27

CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGGAAAGTAAAAATGCGTCGAGCTC

SEQ ID NO. 28

CGCGACTCCTGAGTTCCAGAGCTT

SEQ ID NO. 29

GACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAGGC

SEQ ID NO. 30

GGCTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT

SEQ ID NO. 31

GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCCACC
CTCAGCGAGTACTGTGAGAG

SEQ ID NO. 32

CAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGGAAAGTAAAAATGCGTCGAGC

SEQ ID NO. 33

ACTCCTGAGTTCCAGAGCTTGCTACAG

SEQ ID NO. 34

CTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTT

SEQ ID NO. 35

GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT

SEQ ID NO. 36

TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCCACCCTCAGCGAG

SEQ ID NO. 37

GAGAGGGGAAAGTAAAAATGCGTCG

SEQ ID NO. 38

GGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT

SEQ ID NO. 39

TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCCACCCTCAGCG

SEQ ID NO. 40

GTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT

SEQ ID NO. 41

TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCCACCCTCAGC

SEQ ID NO. 42

GTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTT

SEQ ID NO. 43

CTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT

SEQ ID NO. 44

TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCCACC

SEQ ID NO. 45

TCCTTGTTTTCTTCTGGTTAATCTTT

SEQ ID NO. 46

TTTCTTCTGGTTAATCTTTATCAGGTCTTTTCTT

SEQ ID NO. 47

ATCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTCCACC

SEQ ID NO. 51

TGCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC

SEQ ID NO. 52

GCCCACGTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTC

SEQ ID NO. 53

CTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGG

SEQ ID NO. 54

TCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAGAAGAAAACAAGG
AGG

SEQ ID NO. 55

TTACTTTCCCTCTCATTCTCTGACCG

SEQ ID NO. 56

TCCCTCTCATTCTCTGACCGAAGCT

SEQ ID NO. 57

GGAGACGCCTGCACAATTCAGCCCAAGCTTCTAGAGAGT

SEQ ID NO. 58

CAGCCCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATGACTTGC

SEQ ID NO. 59

TAGAGAGTGGTGATGACTTGCATATGAGG

SEQ ID NO. 60

CTGTGGGACATGACCTGGTTGCTT

SEQ ID NO. 61

GGACATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC

SEQ ID NO. 62

CCTGGTTGCTTCACAGCTCCGAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGAAGTGA

SEQ ID NO. 63

TGCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC

SEQ ID NO. 64

CCCACGTAAAAGATGACGCTTGGTGT

SEQ ID NO. 65

GTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTC

SEQ ID NO. 66

CTTGCTCTCACAGTACTCGCTGAGGG

SEQ ID NO. 67

TCGCTGAGGGTGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAGAAGAAAACAAGG
AGG

SEQ ID NO. 68

TTACTTTCCCTCTCATTCTCTGACCG

SEQ ID NO. 69

TCCCTCTCATTCTCTGACCGAAGC

SEQ ID NO. 70

CGCCTGCACAATTTAGCCCAAGCTTCTAGAGAGT

SEQ ID NO. 71

CCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATGA

SEQ ID NO. 72

TAGAGAGTGGTGATGACTTGCATATG

SEQ ID NO. 73

GGACATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC

SEQ ID NO. 74

CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT

SEQ ID NO. 75

GAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGAA

SEQ ID NO. 76

GCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC

SEQ ID NO. 77

GTAAAAGATGACGCTTGGTGTGTC

SEQ ID NO. 78

TGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAGAAGAAAACAAGGAGG

SEQ ID NO. 79

TTACTTTCCCTCTCATTCTCTGAC

SEQ ID NO. 80

CCAAGCTTCTAGAGAGTGGTGATG

SEQ ID NO. 81

ATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC

SEQ ID NO. 82

CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT

SEQ ID NO. 83

GAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGA

SEQ ID NO. 84

GCGTCAAACAGCGACAAGTTCCGC

SEQ ID NO. 85

TGAACAAGAAAAGACCTGATAAAGATTAACCAGAAGAAAACAAGGAGG

SEQ ID NO. 86

TTACTTTCCCTCTCATTCTCTGA

SEQ ID NO. 87

ATGACCTGGTTGCTTCACAGCTCC

SEQ ID NO. 88

CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT

SEQ ID NO. 89

GAGATGACACAGACTTGCTTAAAGGA

SEQ ID NO. 90

AGAAAAGACCTGATAAAGATTAAC

SEQ ID NO. 91

AAGACCTGATAAAGATTAACCAGA

SEQ ID NO. 92

TTACTTTCCCTCTCATTCTCTGA

SEQ ID NO. 93

CTCCGAGATGACACAGACTTGCTT

SEQ ID NO: 94

>hg38_ДHK

gtttaaacTCCCCCAGGCGAGGCTCTCAGTACCCGAGGCTCCCTTTTCTCGAGCCCGCA
 GCGGCAGCGCTCCCAGCGGGTCCCCGGGAAGGAGACAGCTCGGGTACTGAGGGCGG
 GAAAGCAAGGAAGAGGCCAGATCCCATCCCTTGTCCTGCGCCGCCGCCGCCGCC
 GCCGCCGCCGGGAAGCCCGGGGCCCGGATGCAGGCAATTCCACCAGTCGCTAGAGG
 CGAAAGCCCACACCCAGCTTCGGTCAGAGAAATGAGAGGGAAAGTAAAAATGCG
 TCGAGCTCTGAGGAGAGCCCCGCTTCTACCCGCGCCTCTTCCCGGCAGCCGAACCC
 CAAACAGCCACCCGCCAGGATGCCGCCTCCTCACTCACCCACTCGCCACCCGCTGCG
 CCTCCGCCGCCGCGGGCGCAGGCACCGCAACCGCAGCCCCGCCCGGGCCCCGCC
 CGGGCCCCGCCCGACCACGCCCGGGCCCCGGCCCCGCCCCCTAGCGCGCGACTCCT
 GAGTTCCAGAGCTTGCTACAGGCTGCGGTTGTTTCCCTCCTTGTTTTCTTCTGGTTAA
 TCTTTATCAGGTCTTTTCTTGTTACCCCTCAGCGAGTACTGTGAGAGCAAGTAGTGG

GGAGAGAGGGTGGGAAAAACAAAAACACACACCTCCTAAACCCACACCTGCTCTTG
CTAGACCCGCGGCCGC

SEQ ID NO: 100

GGGGCC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для снижения уровня антисмыслового РНК-транскрипта *C9orf72*, причем указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:17, и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:18; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь, или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

2. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для снижения уровня антисмыслового РНК-транскрипта *C9orf72*, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:19, и указанная антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:20; и при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь, или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

3. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для снижения уровня антисмыслового РНК-транскрипта *C9orf72*,

отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из группы, состоящей из любой из смысловых цепей и антисмысловых цепей в любой из Таблиц 2, 3, 10А, 10С, 11 и 12; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

4. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для снижения уровня антисмыслового РНК-транскрипта *C9orf72*, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь, содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336; 27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; или 27573717-27573739 SEQ ID NO: 13; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

5. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1; AD-1446217.1; AD-1446222.1; AD-1446234.1; AD-1446243.1; AD-1446246.1; AD-1446252.1; AD-1446259.1; AD-1446265.1; AD-1446268.1; AD-1446271.1; AD-1446279.1; AD-1446289.1; и AD-1446294.1.

6. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь представляет собой смысловую цепь или антисмысловую цепь, выбранную из смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1, AD-1446246.1; и AD-1446268.1.

7. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для снижения уровня смыслового РНК-транскрипта *C9orf72*,

отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная антисмысловая цепь, содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 5, 6, 10B и 10D; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

8. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для снижения уровня РНК *c9orf72*,

отличающаяся тем, что указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь, содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; 59-81; 62-84 или 62-91 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь, содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

9. Агент на основе дцРНК по п. 7 или п. 8, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446073.1; AD-1446075.1; AD-1285246.2; AD-1446084.1; AD-1446087.1; AD-1446090.1; и AD1446095.1.

10. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для снижения уровня смыслового РНК-транскрипта *c9orf72*,

отличающаяся тем, что указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5197-5219; 5213-5235; 5223-5245, 5226-5248; 5227-5249, 5228-5250, 5229-5251, 5230-5252, 5231-5253, 5233-5255; 5235-5256, 5241-5263; 5245-5267; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; или 6048-6070 SEQ ID NO: 15, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:16; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

11. Агент на основе дцРНК по п. 7 или п. 10, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285231.1, AD-1285232.1, AD-1285233.1, AD-1285235.1, AD-1285237.1, AD-1285239.1, AD-1285240.1, AD-1285242.1, AD-1285244.1; AD-1285238.1; AD-1285243.1; AD-1285234.1; AD-1285241.1; AD-1285236.1; AD-1446111.1; AD-1446117.1; AD-1446147.1; AD-1446157.1; AD-1446168.1; AD-1446180.1; AD-1446189.1; AD-1446196.1; AD-1446202.1; AD-1446205.1.

12. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 7, 10 и 11, отличающийся тем, что указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285238.1 и AD-1285234.1.

13. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для снижения уровня смыслового РНК-транскрипта *c9orf72*,

отличающаяся тем, что указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO: 15, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

14. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для снижения уровня смыслового РНК-транскрипта *c9orf72*,

отличающаяся тем, что указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь, содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

15. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для снижения уровня антисмыслового РНК-транскрипта *c9orf72*,

отличающаяся тем, что указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-

27573740 SEQ ID NO: 13, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:14; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

16. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для снижения уровня смыслового РНК-транскрипта *C9orf72*,

отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 8 и 9; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

17. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

18. Агент на основе дцРНК по любому из пп 1-17, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с одним или более внутренними положениями в двухцепочечной области указанного агента на основе дцРНК.

19. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован посредством линкера или носителя.

20. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что липофильность указанного липофильного фрагмента, измеренная по $\log K_{ow}$, превышает 0.

21. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что гидрофобность указанного двухцепочечного агента РНКи, измеренная по несвязанной фракции указанного двухцепочечного агента РНКи в анализе связывания с белками плазмы крови, превышает 0,2.

22. Агент на основе дцРНК по п. 21, отличающийся тем, что указанный анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

23. Агент на основе дцРНК по п. 1, отличающийся тем, что не более пяти нуклеотидов указанной смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов указанной антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

24. Агент на основе дцРНК по п. 1, отличающийся тем, что все нуклеотиды указанной смысловой цепи и все нуклеотиды указанной антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

25. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1, 23 и 24, отличающийся тем, что по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового нуклеотида (dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, 2'-О-гексадецилнуклеотида, 2'-фосфатнуклеотида, 2'-5'-связанного рибонуклеотида (3'-РНК), блокированного нуклеотида, неблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, ограниченного этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, инвертированного остатка без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2',3'-секо-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфонат, нуклеотида, содержащего гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер гликолевой нуклеиновой кислоты (S-GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, и концевого нуклеотида, связанного с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты; и их комбинаций.

26. Агент на основе дцРНК по п. 25, отличающийся тем, что указанный модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых дезокситиминового нуклеотида (dT), блокированного нуклеотида, 2'-О-гексадецилнуклеотида, 2'-фосфатнуклеотида, гликолевого нуклеотида, винилфосфонатного нуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

27. Агент на основе дцРНК по п. 25, отличающийся тем, что указанный модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситиминового нуклеотида (dT).

28. Агент на основе дцРНК по п. 25, отличающийся тем, что указанные модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метил-модифицированные

нуклеотиды, GNA-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-гексадецил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фосфат-модифицированные нуклеотиды, винилфосфонат-модифицированные нуклеотиды и 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды.

29. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-28, содержащий по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

30. Агент на основе дцРНК по п. 29, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

31. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что каждая цепь имеет длину не более 30 нуклеотидов.

32. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида.

33. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-31, отличающийся тем, что по меньшей мере одна цепь содержит 3'-липкий конец по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

34. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-33, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область имеет длину по меньшей мере 15-30 нуклеотидов.

35. Агент на основе дцРНК по п. 34, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область имеет длину 17-23 пары нуклеотидов.

36. Агент на основе дцРНК по п. 34, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область имеет длину 17-25 пар нуклеотидов.

37. Агент на основе дцРНК по п. 34, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область имеет длину 23-27 пар нуклеотидов.

38. Агент на основе дцРНК по п. 34, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область имеет длину 19-21 пару нуклеотидов.

39. Агент на основе дцРНК по п. 34, отличающийся тем, что указанная двухцепочечная область имеет длину 21-23 пары нуклеотидов.

40. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-39, отличающийся тем, что каждая цепь имеет длину 19-30 нуклеотидов.

41. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-39, отличающийся тем, что каждая цепь имеет длину 19-23 нуклеотида.

42. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-40, отличающийся тем, что каждая цепь имеет длину 21-23 нуклеотида.

43. Агент на основе дцРНК по п. 18, отличающийся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи посредством линкера или носителя.

44. Агент на основе дцРНК по п. 43, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают любые положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца указанной по меньшей мере одной цепи.

45. Агент на основе дцРНК по п. 43, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают любые положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца указанной по меньшей мере одной цепи.

46. Агент на основе дцРНК по п. 43, отличающийся тем, что указанные внутренние положения исключают область сайта расщепления указанной смысловой цепи.

47. Агент на основе дцРНК по п. 46, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают любые положения, за исключением положений 9-12, считая от 5'-конца указанной смысловой цепи.

48. Агент на основе дцРНК по п. 46, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают любые положения, за исключением положений 11-13, считая от 3'-конца указанной смысловой цепи.

49. Агент на основе дцРНК по п. 43, отличающийся тем, что указанные внутренние положения исключают область сайта расщепления указанной антисмысловой цепи.

50. Агент на основе дцРНК по п. 49, отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают любые положения, за исключением положений 12-14, считая от 5'-конца указанной антисмысловой цепи.

51. Агент на основе дцРНК по п. 49 отличающийся тем, что указанные внутренние положения включают любые положения, за исключением положений 11-13 на указанной смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положений 12-14 на указанной антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

52. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 18-51, отличающийся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более указанными внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 на указанной смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 на указанной антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

53. Агент на основе дцРНК по п. 52, отличающийся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более указанными внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 на указанной смысловой цепи и положений 15 и 17 на указанной антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

54. Агент на основе дцРНК по п. 18, отличающийся тем, что указанные внутренние положения в двухцепочечной области исключают область сайта расщепления указанной смысловой цепи.

55. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 18-54, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, указанная антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, и указанный липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 указанной смысловой цепи или положением 16 указанной антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

56. Агент на основе дцРНК по п. 55, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 указанной смысловой цепи, считая от 5'-конца.

57. Агент на основе дцРНК по п. 55, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20 или положением 15 указанной смысловой цепи, считая от 5'-конца.

58. Агент на основе дцРНК по п. 55, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с положением 20 или положением 15 указанной смысловой цепи, считая от 5'-конца.

59. Агент на основе дцРНК по п. 55, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с положением 16 указанной антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

60. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 18-59, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

61. Агент на основе дцРНК по п. 60, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, пирен-1-масляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилксигексианола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О3-(олеоил)литохолевой кислоты, О3-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

62. Агент на основе дцРНК по п. 60, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С4-С30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азиды и алкина.

63. Агент на основе дцРНК по п. 62, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С6-С18 углеводородную цепь.

64. Агент на основе дцРНК по п. 62, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С16 углеводородную цепь.

65. Агент на основе дцРНК по п. 64, отличающийся тем, что указанная насыщенная или ненасыщенная С16 углеводородная цепь конъюгирована в положении 6, считая от 5'-конца цепи.

66. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 18-65, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении(положениях) или двухцепочечной области.

67. Агент на основе дцРНК по п. 66, отличающийся тем, что указанный носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила,

пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент, основанный на серинольном остове или диэтаноламиновом остове.

68. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 18-65, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с указанным двухцепочечным агентом иРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодизэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

69. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 18-68, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

70. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 18-69, отличающийся тем, что указанный липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

71. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 18-70, отличающийся тем, что указанный 3'-конец смысловой цепи защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, причем указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

72. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-16, дополнительно содержащий нацеливающий лиганд, который нацелен на нейрональную клетку, клетку в нейрональной ткани, клетку в ткани центральной нервной системы или ткань печени.

73. Агент на основе дцРНК по п. 72, отличающийся тем, что указанный нацеливающий лиганд представляет собой конъюгат GalNAc.

74. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-73, дополнительно содержащий одно или более из: концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

75. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-73, дополнительно содержащий одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

76. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-73, дополнительно содержащий одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой, второй или третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

77. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-73, дополнительно содержащий одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

78. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-73, дополнительно содержащий одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

79. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-78, дополнительно содержащий фосфат или миметик фосфата на 5'-конце указанной антисмысловой цепи.

80. Агент на основе дцРНК по п. 79, отличающийся тем, что указанный миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

81. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-80, отличающийся тем, что указанная пара оснований в положении 1 5'-конца указанной антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

82. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-81, отличающийся тем, что указанная смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид и указанная антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида.

83. Клетка, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-82.

84. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии C9orf72, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-82.

85. Фармацевтическая композиция, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 и липидный состав.

86. Фармацевтическая композиция по п. 84 или 85, отличающаяся тем, что указанный агент на основе дцРНК находится в незабуференном растворе.

87. Фармацевтическая композиция по п. 86, отличающаяся тем, что указанный незабуференный раствор представляет собой солевой раствор или воду.

88. Фармацевтическая композиция по п. 84 или 85, отличающаяся тем, что указанный агент на основе дцРНК находится в буферном растворе.

89. Фармацевтическая композиция по п. 88, отличающаяся тем, что указанный буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

90. Фармацевтическая композиция по п. 88, отличающаяся тем, что указанный буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ).

91. Композиция, содержащая два или более агентов на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии C9orf72,

отличающаяся тем, что каждый агент на основе дцРНК независимо содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

причем первый агент на основе дцРНК, нацеленный на антисмысловую цепь C9orf72, выбран из группы, состоящей из

а) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:17, и антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:18,

б) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:19, и антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:20,

с) агента на основе дцРНК, содержащего антисмысловую последовательность, содержащую нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловых цепей в любой из Таблиц 2, 3, 10A, 10C, 11 и 12;

д) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от нуклеотидов 27573296-27573318; 27573314-27573336; 27573319-27573341; 27573562-27573584; 27573585-27573607; 27573592-27573614; 27573599-27573621; 27573608-27573630; 27573616-27573638; 27573619-27573641; 27573622-27573644; 27573633-27573655; 27573690-27573712; или 27573717-27573739 SEQ ID NO: 13; и

е) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 27573296-27573584; 27573296-27573575; 27573301-27573338; 27573318-27573342; 27573555-27573583; 27573581-27573607; 27573584-27573607; 27573588-27573671; 27573588-27573666; 27573588-27573624; 27573592-27573624; 27573592-27573617; 27573598-27573624; 27573599-27573623; 27573606-27573655; 27573606-27573652; 27573606-27573647; 27573654-27573712; или 27573707-27573740 SEQ ID NO: 13, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 14; и

причем второй агент на основе дцРНК, нацеленный на смысловую цепь C9orf72, выбран из группы, состоящей из

а) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных

нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5,

b) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:15, и антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:16,

c) агента на основе дцРНК, содержащего антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 5, 6, 10B и 10D;

d) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 1-23; 15-37; 33-55; 37-59; 59-81; 62-84 или 69-91 SEQ ID NO: 1, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5;

e) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5197-5219; 5213-5235; 5223-5245; 5226-5248; 5227-5249; 5228-5250, 5229-5251, 5230-5252, 5231-5253, 5233-5255; 5235-5256, 5241-5263; 5245-5267; 5233-5255; 5248-5270; 5539-5561; 5547-5569; 5917-5939; 5936-5958; 5954-5976; 6008-6030; 6021-6043; 6036-6058; 6043-6065; или 6048-6070 SEQ ID NO: 15, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

f) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 5015-5052; 5017-5040; 5032-5059; 5032-5055; 5033-5055; 5035-5059; 5036-5059; 5058-5087; 5059-5087; 5059-5084; 5064-5087; 5197-5222; 5213-5267; 5223-5252; 5229-5252; 5233-5263; 5516-5570; 5539-5565; 5539-5562; 5545-5570; 5545-5569; 5593-5616; 5883-5950; 5917-5950; 5919-5950; 5923-5950; 5934-5977; 5934-5957; 5938-5977; 5938-5965; 5938-5961; 5947-5977; 5947-5973; 5972-6001; 5973-5997; 6006-6029; 6011-6070; 6011-6039; 6011-6038; 6015-6038; 6019-6045; 6019-6042; 6033-6070; 6035-6065; 6035-6059; или 6040-6063 SEQ ID NO: 15, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 16;

g) агента на основе дцРНК, содержащего смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой нуклеотидной последовательности из нуклеотидов 15-52; 17-40; 32-59; 32-55; 35-

59; 36-59; 58-87; 59-87; 59-84; или 64-87 SEQ ID NO: 1, и антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 5; и

h) агента на основе дцРНК, содержащего антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей в любой из Таблиц 8 и 9; и

при этом указанная смысловая цепь, указанная антисмысловая цепь или как указанная смысловая цепь, так и указанная антисмысловая цепь указанной первой дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

92. Композиция по п. 91, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1; AD-1446217.1; AD-1446222.1; AD-1446234.1; AD-1446243.1; AD-1446246.1; AD-1446252.1; AD-1446259.1; AD-1446265.1; AD-1446268.1; AD-1446271.1; AD-1446279.1; AD-1446289.1; и AD-1446294.1.

93. Композиция по п. 91 или 92, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1; AD-1446246.1; и AD-1446268.1.

94. Композиция по любому из пп. 91-93, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446073.1; AD-1446075.1; AD-1285246.2; AD-1446084.1; AD-1446087.1; AD-1446090.1; и AD-1446095.1.

95. Композиция по любому из пп. 91-94, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285238.1 и AD-1285234.1.

96. Композиция по любому из пп. 91-95, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь или указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи или антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285231.1, AD-1285232.1, AD-1285233.1, AD-

1285235.1, AD-1285237.1, AD-1285239.1, AD-1285240.1, AD-1285242.1, AD-1285244.1; AD-1285243.1; AD-1285241.1; AD-1285236.1; AD-1446111.1; AD-1446117.1; AD-1446147.1; AD-1446157.1; AD-1446168.1; AD-1446180.1; AD-1446189.1; AD-1446196.1; AD-1446202.1; AD-1446205.1.

97. Композиция по п. 91, отличающаяся тем, что указанная антисмысловая цепь первого агента на основе дцРНК содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1446213.1, AD-1446246.1 и AD-1446268.1; и указанная антисмысловая цепь второго агента на основе дцРНК содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем тремя нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1285238.1 и AD-1285234.1.

98. Композиция по п. 91, отличающаяся тем, что

а) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446213; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285238;

б) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446213; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285234;

с) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446246; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285238;

д) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446246; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность,

содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285234;

е) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446268; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285238;

ф) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1446268; и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь, содержащую нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности AD-1285234.

99. Композиция по п. 98, отличающаяся тем, что

а) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1446213, и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1285238;

б) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1446213, и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1285234;

с) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1446246, и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1285238;

д) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1446246, и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1285234;

е) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1446268, и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1285238; или

ф) указанный первый агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1446268, и указанный второй агент на основе дцРНК содержит антисмысловую цепь и/или смысловую цепь AD-1285234.

100. Композиция по любому из пп. 91-99, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК конъюгирован с одним или более липофильными фрагментами.

101. Композиция по любому из пп. 91-100, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с одним или более внутренними положениями в двухцепочечной области указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК.

102. Композиция по любому из пп. 91-101, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК посредством линкера или носителя.

103. Композиция по любому из пп. 91-102, отличающаяся тем, что липофильность указанного липофильного фрагмента, измеренная по $\log K_{ow}$, конъюгированного с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК, превышает 0.

104. Композиция по любому из пп. 91-103, отличающаяся тем, что гидрофобность указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК, измеренная по несвязанной фракции указанного агента на основе дцРНК в анализе связывания с белками плазмы крови, превышает 0,2.

105. Композиция по п. 104, отличающаяся тем, что указанный анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

106. Композиция по п. 91, отличающаяся тем, что не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

107. Композиция по п. 91, отличающаяся тем, что все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК представляют собой модифицированные нуклеотиды.

108. Композиция по любому из пп. 91, 106 и 107, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминового нуклеотида (dT), 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, 2'-O-гексадецилнуклеотида, 2'-фосфатнуклеотида, блокированного нуклеотида, неблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, ограниченного этилнуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, инвертированного остатка без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-O-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-C-алкил-

модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, 2',3'-секо-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфонат, нуклеотида, содержащего аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (S-GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, и конечного нуклеотида, связанного с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты; и их комбинаций.

109. Композиция по п. 108, отличающаяся тем, что указанный модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксидецил-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксидецил-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT), блокированного нуклеотида, 2'-О-гексадецилнуклеотида, 2'-фосфатнуклеотида, гликолевого нуклеотида, винилфосфонатного нуклеотида, нуклеотида без азотистого основания, 2'-амин-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

110. Композиция по п. 108, отличающаяся тем, что указанный модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность из 3'-концевых дезокситиминовых нуклеотидов (dT).

111. Композиция по п. 108, отличающаяся тем, что указанные модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, GNA-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-гексадецил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фосфат-модифицированные нуклеотиды, винилфосфонат-модифицированные нуклеотиды и 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды.

112. Композиция по любому из пп. 91-111, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК содержат по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

113. Композиция по п. 112, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

114. Композиция по любому из пп. 91-113, отличающаяся тем, что каждая цепь указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК

или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК имеет длину 19-25 нуклеотидов.

125. Композиция по любому из пп. 91-122, отличающаяся тем, что каждая цепь указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК имеет длину 19-23 нуклеотида.

126. Композиция по любому из пп. 91-122, отличающаяся тем, что каждая цепь указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК имеет длину 21-23 нуклеотида.

127. Композиция по п. 101, отличающаяся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями по меньшей мере на одной цепи указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК посредством линкера или носителя.

128. Композиция по п. 127, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК включают все положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца указанной по меньшей мере одной цепи.

129. Композиция по п. 127, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК включают все положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца указанной по меньшей мере одной цепи.

130. Композиция по п. 127, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агентов на основе дцРНК исключают область сайта расщепления указанной смысловой цепи.

131. Композиция по п. 130, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК включают все положения, за исключением положений 9-12, считая от 5'-конца указанной смысловой цепи.

132. Композиция по п. 130, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК включают все положения, за исключением положений 11-13, считая от 3'-конца указанной смысловой цепи.

133. Композиция по п. 127, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агентов на основе дцРНК исключают область сайта расщепления указанной антисмысловой цепи.

134. Композиция по п. 133, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК включают все положения, за исключением положений 12-14, считая от 5'-конца указанной антисмысловой цепи.

135. Композиция по п. 133, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК включают все положения, за исключением положений 11-13 на указанной смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положений 12-14 на указанной антисмысловой цепи, считая от 5'-конца.

136. Композиция по любому из пп. 101-135, отличающаяся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более указанными внутренними положениями указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 на указанной смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 на указанной антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

137. Композиция по п. 136, отличающаяся тем, что указанный один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более указанными внутренними положениями указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 на указанной смысловой цепи и положений 15 и 17 на указанной антисмысловой цепи, считая от 5'-конца каждой цепи.

138. Композиция по п. 101, отличающаяся тем, что указанные внутренние положения в двухцепочечной области указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агентов на основе дцРНК исключают область сайта расщепления указанной смысловой цепи.

139. Композиция по любому из пп. 101-138, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, указанная антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, и указанный липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 указанной смысловой цепи или положением 16 указанной антисмысловой цепи.

140. Композиция по п. 139, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК в положении 21, положении 20, положении 15, положении 1 или положении 7 указанной смысловой цепи.

141. Композиция по п. 139, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК в положении 21, положении 20 или положении 15 указанной смысловой цепи.

142. Композиция по п. 139, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК в положении 20 или положении 15 указанной смысловой цепи.

143. Композиция по п. 139, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК в положении 16 указанной антисмысловой цепи.

144. Композиция по любому из пп. 101-143, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент, конъюгированный с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК, представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

145. Композиция по п. 144, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, пирен-1-масляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексианола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О3-(олеоил)литохолевой кислоты, О3-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

146. Композиция по п. 144, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С4-С30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

147. Композиция по п. 144, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С6-С18 углеводородную цепь.

148. Композиция по п. 144, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С16 углеводородную цепь.

149. Композиция по п. 148, отличающаяся тем, что указанная насыщенная или ненасыщенная C16 углеводородная цепь конъюгирована в положении 6, считая от 5'-конца цепи.

150. Композиция по любому из пп. 101-149, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении(ях) или двухцепочечной области.

151. Композиция по п. 150, отличающаяся тем, что указанный носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклический фрагмент, основанный на серинольном остове или диэтаноламиновом остове.

152. Композиция по любому из пп. 101-149, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с двухцепочечным агентом иРНК указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агентов на основе дцРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-тиоэфир, дисульфид, фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

153. Композиция по любому из пп. 101-152, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент конъюгирован с нуклеиновым основанием, фрагментом сахара или межнуклеозидной связью указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК.

154. Композиция по любому из пп. 101-153, отличающаяся тем, что указанный липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован с указанным первым агентом на основе дцРНК, указанным вторым агентом на основе дцРНК или как указанным первым, так и указанным вторым агентом на основе дцРНК посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

155. Композиция по любому из пп. 101-154, отличающаяся тем, что 3'-конец смысловой цепи указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, причем указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила,

пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

156. Композиция по любому из пп. 91-99, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на нейрональную клетку, клетку в нейрональной ткани или клетку в ткани центральной нервной системы, или ткань печени.

157. Композиция по п. 156, отличающаяся тем, что указанный нацеливающий лиганд представляет собой конъюгат GalNAc.

158. Композиция по любому из пп. 91-157, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

159. Композиция по любому из пп. 91-157, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

160. Композиция по любому из пп. 91-157, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой, второй или третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

161. Композиция по любому из пп. 91-157, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

162. Композиция по любому из пп. 91-157, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит одно или более из:

концевой хиральной модификации, находящейся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевой хиральной модификации, находящейся в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце указанной антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевой хиральной модификации, находящейся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце указанной смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

163. Композиция по любому из пп. 91-162, отличающаяся тем, что указанный первый агент на основе дцРНК, указанный второй агент на основе дцРНК или как

указанный первый, так и указанный второй агент на основе дцРНК дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце указанной антисмысловой цепи.

164. Композиция по п. 163, отличающаяся тем, что указанный миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

165. Композиция по любому из пп. 91-164, отличающаяся тем, что указанная пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса указанного первого агента на основе дцРНК, указанного второго агента на основе дцРНК или как указанного первого, так и указанного второго агента на основе дцРНК представляет собой пару оснований AU.

166. Композиция по любому из пп. 1-82, отличающаяся тем, что указанная смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид и указанная антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида.

167. Клетка, содержащая композицию по любому из пп. 91-165.

168. Композиция по любому из пп. 91-165, которая представляет собой фармацевтическую композицию для ингибирования экспрессии C9orf72.

169. Композиция по любому из пп. 91-165, которая представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую липидный состав.

170. Способ снижения уровня одного или более РНК-транскриптов C9orf72 в клетке, отличающийся тем, что указанный способ включает приведение указанной клетки в контакт с любым одним или более агентами на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 или композицией по любому из пп. 91-165, или фармацевтической композицией по любому из пп. 84-90, 168 и 169, что ингибирует экспрессию C9orf72 в указанной клетке.

171. Способ по п. 170, отличающийся тем, что указанная клетка находится в организме субъекта.

172. Способ по п. 171, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

173. Способ по п. 171 или п. 172, отличающийся тем, что указанный субъект имеет C9orf72-ассоциированное нарушение.

174. Способ по п. 173, отличающийся тем, что указанное C9orf72-ассоциированное нарушение выбрано из группы, состоящей из C9orf72-ассоциированного бокового амиотрофического склероза, лобно-височной деменции, синдрома, подобного болезни Хантингтона, обусловленного экспансиями C9orf72, паркинсонизма, оливопонтномозжечковой дегенерации, кортикобазального синдрома и болезни Альцгеймера.

175. Способ по любому из пп. 170-174, отличающийся тем, что приведение указанной клетки в контакт с указанным агентом на основе дцРНК снижает уровень смысловых и/или антисмысловых РНК-транскриптов C9orf72, содержащей гексануклеотидные повторы, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

176. Способ по любому из пп. 170-175, отличающийся тем, что указанное снижение уровня смысловых и/или антисмысловых РНК-транскриптов C9orf72, содержащей

гексануклеотидные повторы, обеспечивает уменьшение уровня одного или более белков с дипептидными повторами (DPR), выбранных из группы, состоящей из поли(глицин-аланин), поли(глицин-аргинин), поли(глицин-пролин), поли(пролин-аланин) и поли(пролин-аргинин), по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

177. Способ по любому из пп. 170-176, отличающийся тем, что приведение указанной клетки в контакт с указанным агентом на основе дцРНК ингибирует экспрессию мРНК C9orf72 не более чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5%.

178. Способ по любому из пп. 170-177, отличающийся тем, что ингибирование экспрессии C9orf72 обеспечивает уменьшение уровня белка C9orf72 в сыворотке крови субъекта не более чем на 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5%.

179. Способ снижения зависимого от длины повтора образования очагов РНК C9orf72 в клетке, отличающийся тем, что указанный способ включает приведение указанной клетки в контакт с любым одним или более агентами на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 или композицией по любому из пп. 91-165, или фармацевтической композицией по любому из пп. 84-90, 168 и 169, что снижает зависимое от длины повтора образование очагов РНК C9orf72 в указанной клетке.

180. Способ снижения накопления или агрегации пептидов поли(глицин-аланин), пептидов поли(глицин-пролин), пептидов поли(глицин-аргинин), пептидов поли(аланин-пролин) или пептидов поли(пролин-аргинин) в клетке, отличающийся тем, что указанный способ включает приведение указанной клетки в контакт с любым одним или более агентами на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 или композицией по любому из пп. 91-165, или фармацевтической композицией по любому из пп. 84-90, 168, и 169, что снижает накопление или агрегацию пептидов поли(глицин-аланин), пептидов поли(глицин-пролин), пептидов поли(глицин-аргинин), пептидов поли(аланин-пролин) или пептидов поли(пролин-аргинин) в указанной клетке.

181. Способ лечения субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от снижения экспрессии C9orf72, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества любого одного или более агентов на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 или композиции по любому из пп. 91-165, или фармацевтической композиции по любому из пп. 84-90, 168 и 169, что обеспечивает лечение указанного субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от снижения экспрессии C9orf72.

182. Способ предотвращения по меньшей мере одного симптома у субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от снижения экспрессии C9orf72, включающий введение указанному субъекту профилактически эффективного количества любого одного или более агентов на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 или композиции по любому из пп. 91-165, или фармацевтической композиции по любому из пп. 84-90, 168 и 169, что обеспечивает предотвращение по меньшей мере одного симптома у указанного субъекта, имеющего нарушение, который может получить пользу от снижения экспрессии C9orf72.

183. Способ по п. 181 или п. 182, отличающийся тем, что указанное нарушение представляет собой C9orf72-ассоциированное нарушение.

184. Способ по п. 183, отличающийся тем, что указанное C9orf72-ассоциированное нарушение выбрано из группы, состоящей из C9orf72-ассоциированного бокового амиотрофического склероза, лобно-височной деменции, синдрома, подобного болезни Хантингтона, обусловленного экспансиями C9orf72, паркинсонизма, оливопонтномозжечковой дегенерации, кортикобазального синдрома и болезни Альцгеймера.

185. Способ по п. 181 или п. 182, отличающийся тем, что указанный субъект представляет собой человека.

186. Способ по любому из пп. 181-185, отличающийся тем, что введение указанного агента указанному субъекту вызывает уменьшение зависимого от длины повтора образования очагов РНК, секвестрации специфичных РНК-связывающих белков или накопления или агрегации пептидов поли(глицин-аланин), пептидов поли(глицин-пролин), пептидов поли(глицин-аргинин), пептидов поли(аланин-пролин) или пептидов поли(пролин-аргинин).

187. Способ по п. 186, отличающийся тем, что указанное зависимое от длины повтора образование очагов РНК, секвестрация специфичных РНК-связывающих белков, или накопление или агрегация пептидов поли(глицин-аланин), пептидов поли(глицин-пролин), пептидов поли(глицин-аргинин), пептидов поли(аланин-пролин) или пептидов поли(пролин-аргинин) уменьшается более чем на 50%, и экспрессия зрелой РНК C9orf72 ингибируется менее чем на 50%.

188. Способ по любому из пп. 181-187, отличающийся тем, что введение указанного агента указанному субъекту вызывает уменьшение уровня одного или более белков с дипептидными повторами (DPR), выбранных из группы, состоящей из поли(глицин-аланин), поли(глицин-аргинин), поли(глицин-пролин), поли(пролин-аланин) и поли(пролин-аргинин).

189. Способ по п. 188, отличающийся тем, что указанный уровень одного или более аберранных белков с дипептидными повторами (DPR) уменьшается более чем на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

190. Способ по п. 189, отличающийся тем, что указанный уровень поли(глицин-аланин) и/или поли(глицин-пролин) уменьшается более чем на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

191. Способ по любому из пп. 181-190, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК вводят указанному субъекту в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

192. Способ по любому из пп. 181-191, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК вводят субъекту подкожно.

193. Способ по любому из пп. 181-191, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК вводят субъекту интратекально.

194. Способ по любому из пп. 181-191, отличающийся тем, что указанный агент на основе дцРНК вводят субъекту интрацеребровентрикулярно.

195. Способ по любому из пп. 181-194, дополнительно включающий определение уровня C9orf72 в образце(ах) от субъекта.

196. Способ по п. 195, отличающийся тем, что указанный уровень C9orf72 в образце(ах) от субъекта представляет собой уровень белка C9orf72 в образце(ах) крови, сыворотки крови или спинномозговой жидкости.

197. Способ по любому из пп. 181-196, также включающий введение указанному субъекту дополнительного терапевтического агента.

198. Набор, содержащий любой один или более агентов на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 или композицию по любому из пп. 91-165, или фармацевтическую композицию по любому из пп. 84-90, 168 и 169.

199. Флакон, содержащий любой один или более агентов на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 или композицию по любому из пп. 91-165, или фармацевтическую композицию по любому из пп. 84-90, 168 и 169.

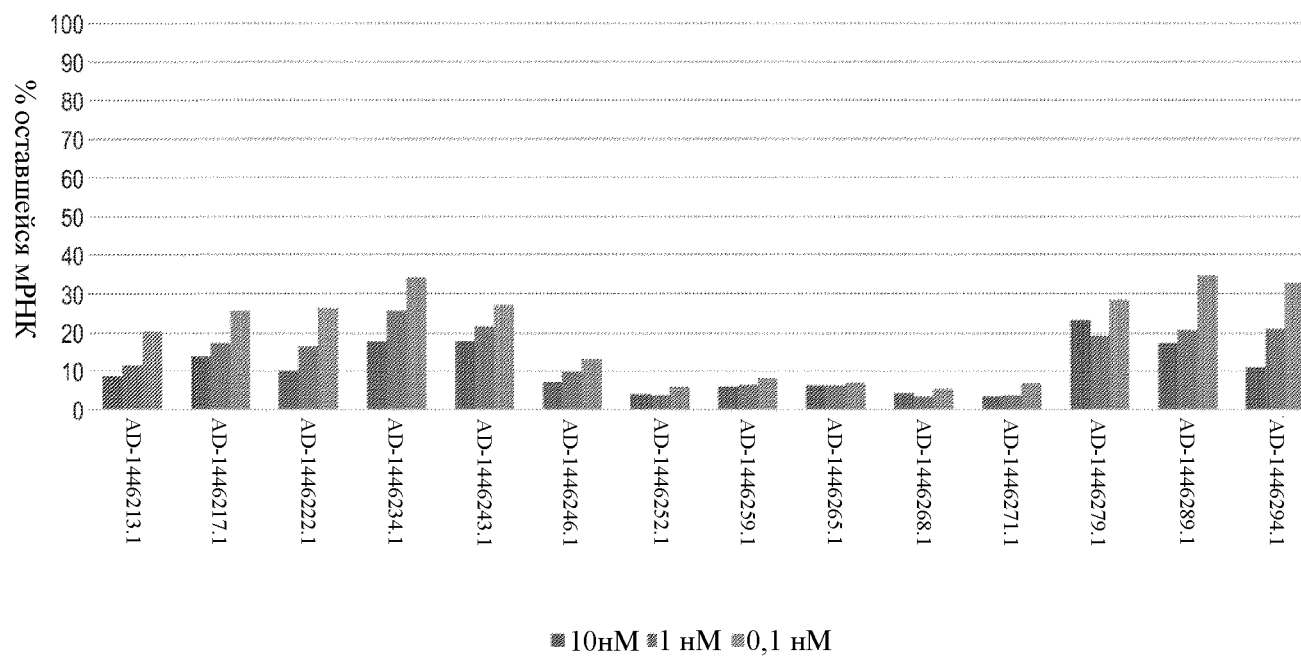
200. Шприц, содержащий любой один или более агентов на основе дцРНК по любому из пп. 1-82 или композицию по любому из пп. 91-165, или фармацевтическую композицию по любому из пп. 84-90, 168 и 169.

По доверенности



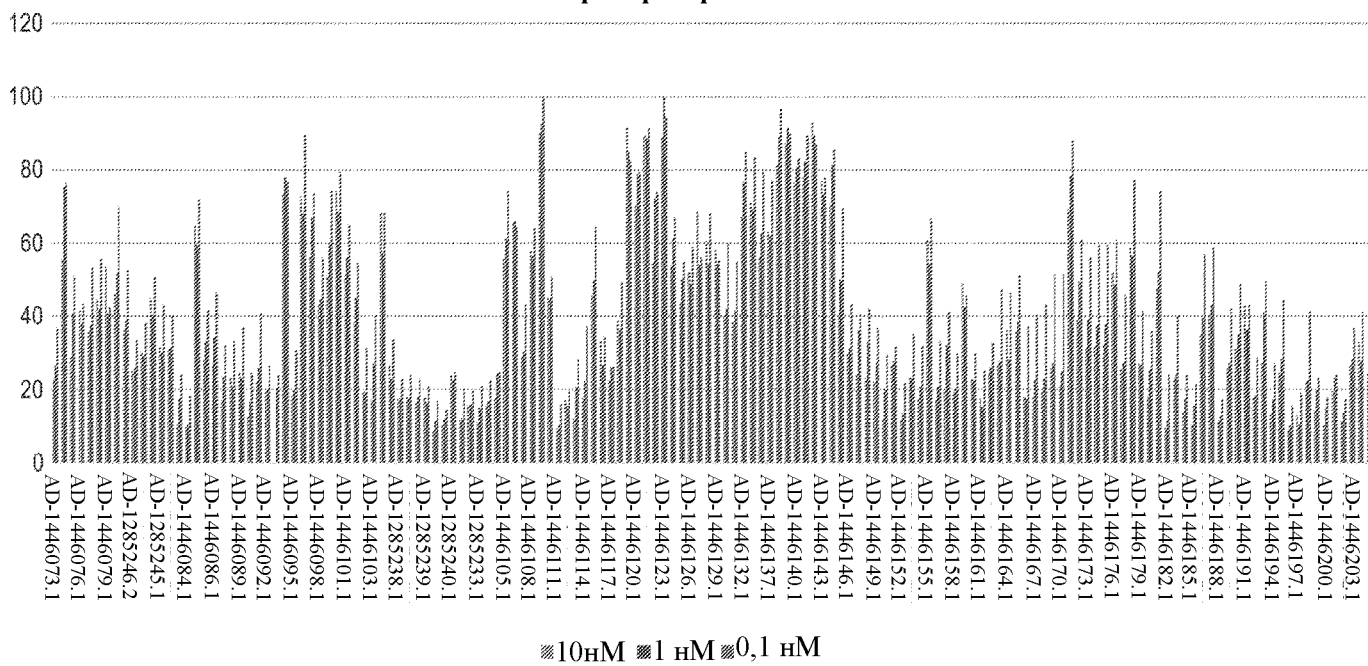
Фиг. 1

Предложенные дуплексы, нацеленные на антисмысловую цепь
C9orf72



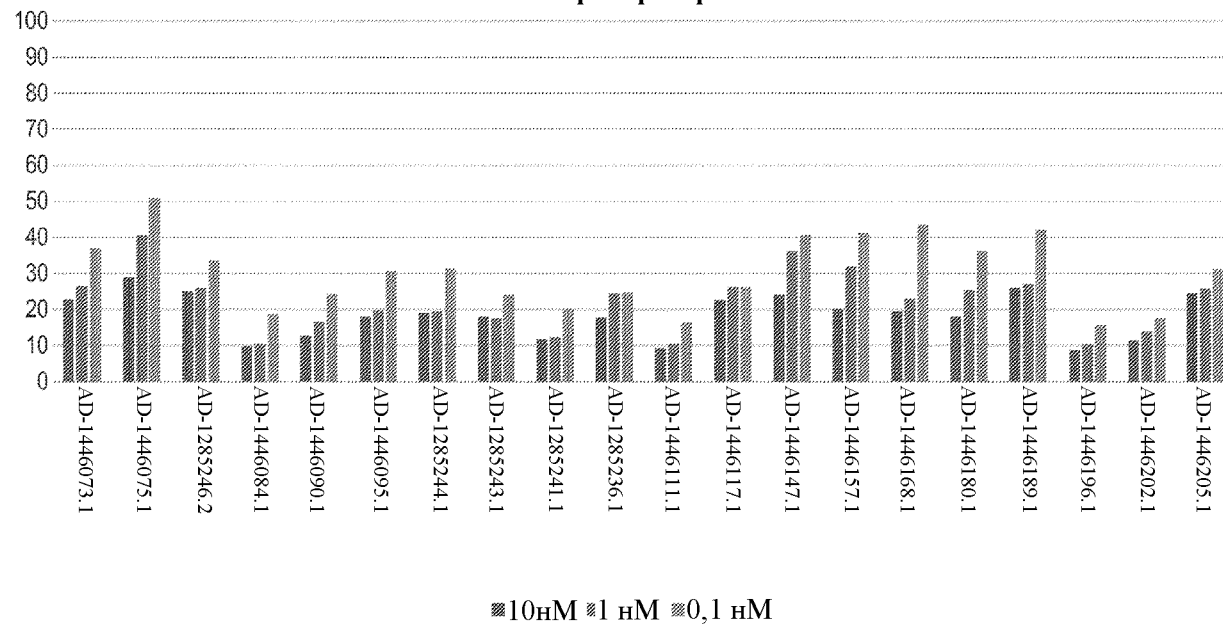
Фиг. 2

Скрининг in vitro смысловой цепи C9orf72 с распространением



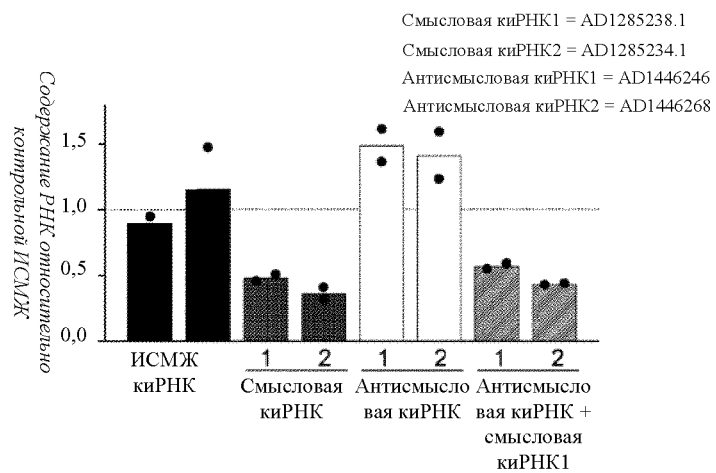
Фиг. 3

Предложенные дуплексы, нацеленные на смысловую цепь
C9orf72 с распространением



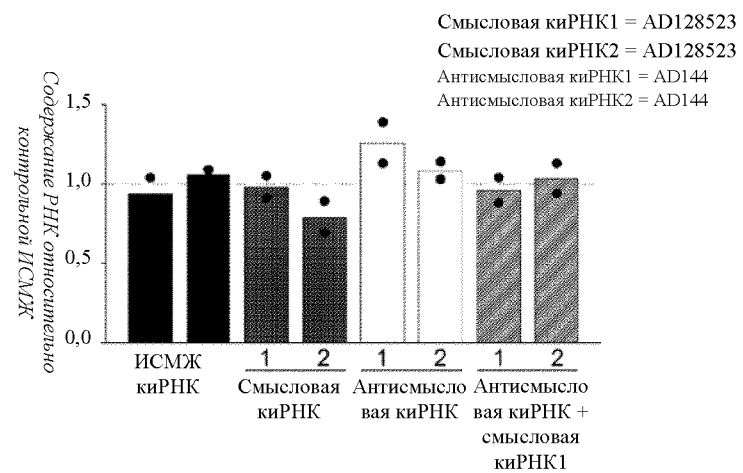
Фиг. 4

Анализ РНК, содержащей интрон, с помощью ОТ-кПЦР— последовательность интрона возле экзона 1А



Фиг. 5А

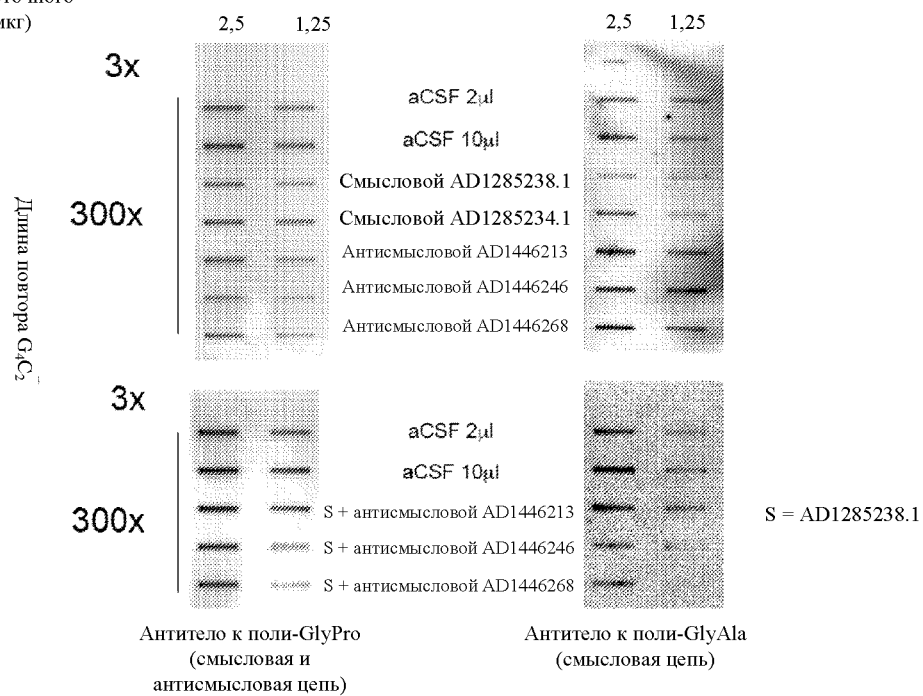
Анализ мРНК с помощью ОТ-кПЦР – экзон 2-3 (сплайсированная мРНК)



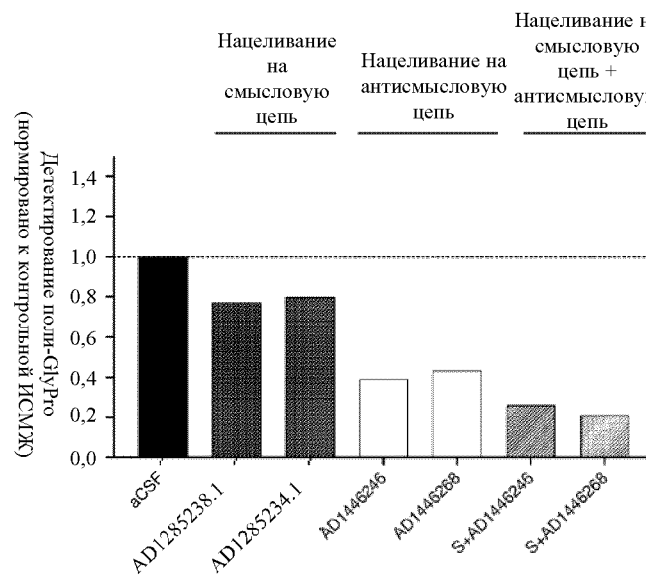
Фиг. 5В

Вестерн-слот-блот (ES-клетки, 1 мкМ кнРНК, 48 ч)

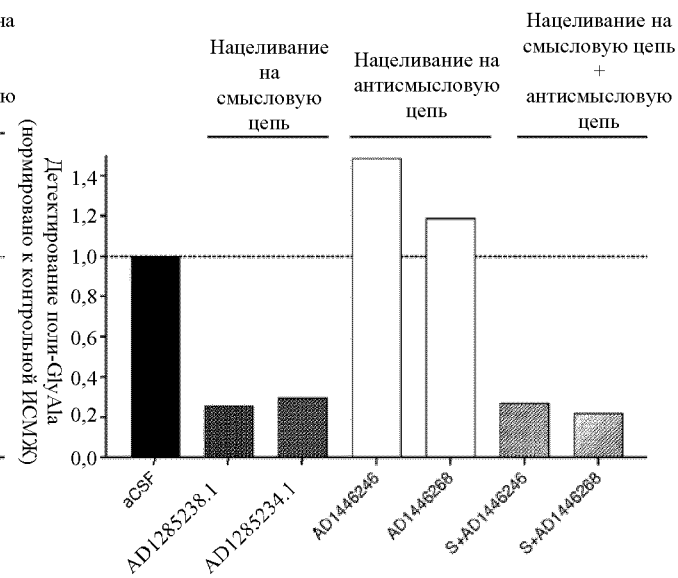
Белок цельноклеточного
экстракта (мкг)



Фиг. 6А

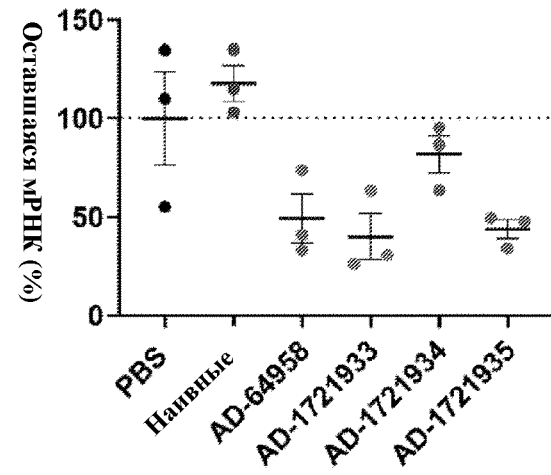


Фиг. 6B

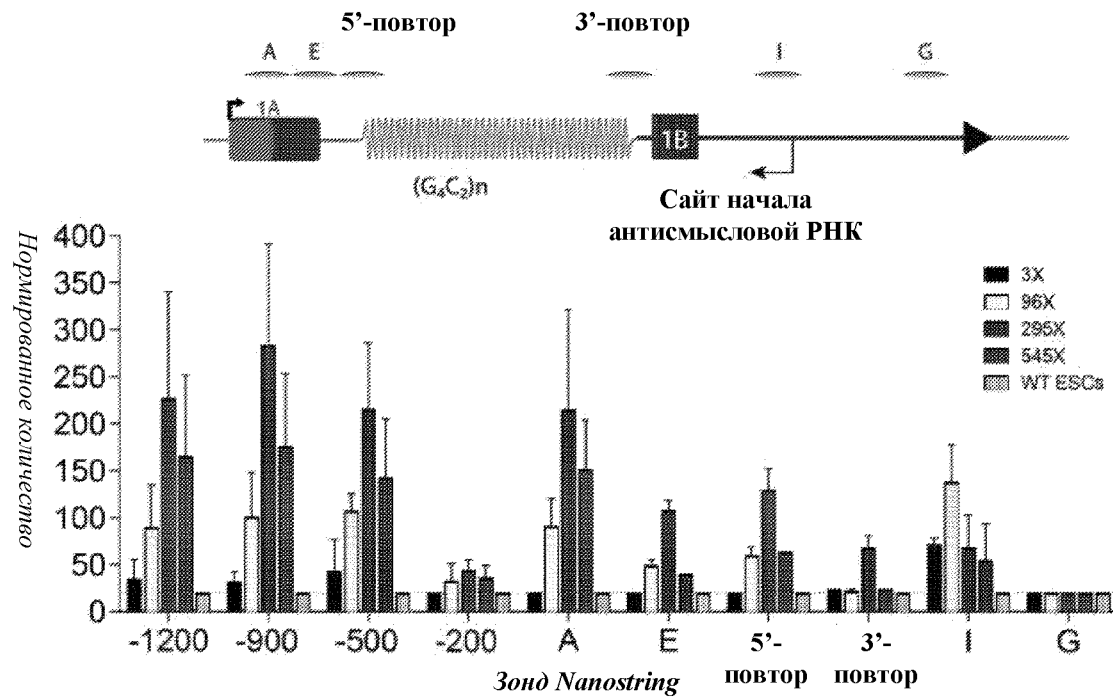


Фиг. 6C

Скрининг ААВ, нацеленного на
антисмысловую цепь C9orf72 (3 мг/кг)



Фиг. 7



Фиг. 8