

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202393436** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.02.02**

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/105* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.05.27**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ САЙЛЕНСИНГА ЭКСПРЕССИИ КАРБОАНГИДРАЗЫ 2**

---

(31) **63/194,073; 63/289,319**

(32) **2021.05.27; 2021.12.14**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/031337**

(87) **WO 2022/251629 2022.12.01**

(88) **2023.01.12**

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

(72) Изобретатель:

**Зубер Джеффри, Макайнинч  
Джеймс Д., Шлегель Марк К.,  
Касторено Адам (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к композициям на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК), нацеленным на карбоангидразу 2 (CA2), и способам применения таких композиций на основе дцРНК для изменения (например, ингибирования) экспрессии карбоангидразы 2.

**202393436**  
**A1**

**202393436**

**A1**

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-579851EA/022

### **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ САЙЛЕНСИНГА ЭКСПРЕССИИ КАРБОУАНГИДРАЗЫ 2**

#### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/194073, поданной 27 мая 2021 г., и испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/289319, поданной 14 декабря 2021 г. Полное содержание вышеуказанных заявок настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ**

Настоящее изобретение относится к специфическому ингибированию экспрессии карбоангидразы 2.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Глаукома является основной причиной потери зрения. К факторам риска развития глаукомы относятся повышенное внутриглазное давление, возраст, расовая принадлежность и сосудистое заболевание. Повышенное внутриглазное давление может привести к повреждению зрительного нерва и потере нервных волокон. Снижение внутриглазного давления может уменьшить развитие и прогрессирование потери зрения.

Карбоангидраза 2 (CA2) является представителем семейства карбоангидраз (CA) металлоферментов. CA2 катализирует обратимое превращение углекислого газа в бикарбонат. Карбоангидразы экспрессируются в глазу, и CA2, по-видимому, является основной формой CA, присутствующей в ресничном эпителии человека, которая отвечает за образование водянистой влаги. Было показано, что ингибиторы карбоангидраз снижают образование водянистой влаги и тем самым снижают внутриглазное давление в глазу.

Соответственно, существует потребность в средствах, которые могут селективно и эффективно ингибировать экспрессию гена CA2, чтобы можно было эффективно осуществлять лечение субъектов, имеющих CA2-ассоциированное нарушение, такое как глаукома.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящем изобретении описаны способы и композиции на основе иРНК для модулирования экспрессии карбоангидразы 2 (CA2). В отдельных вариантах осуществления экспрессию CA2 снижают или ингибируют с помощью CA2-специфичной иРНК. Такое ингибирование может быть применимо для лечения нарушений, связанных с экспрессией CA2, таких как офтальмологические нарушения (например, глаукома или состояния, ассоциированные с глаукомой).

Соответственно, в настоящем документе описаны композиции и способы, которые осуществляют опосредованное РНК-индуцированным комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов CA2, например, в клетке или в организме субъекта (например, млекопитающего, такого как субъект-человек). Также описаны композиции и

способы лечения нарушения, связанного с экспрессией СА2, такого как глаукома или состояния, ассоциированные с глаукомой.

иРНК (например, дцРНК), включенные в композиции, представленные в настоящем документе, включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, например, область, которая имеет длину 30 нуклеотидов или менее, как правило, имеет длину 19-24 нуклеотида, которая по существу комплементарна по меньшей мере части мРНК-транскрипта СА2 (например, СА2 человека) (также называемую в настоящем документе «СА2-специфичной иРНК»). В некоторых вариантах осуществления мРНК-транскрипт СА2 представляет собой мРНК-транскрипт СА2 человека, например, SEQ ID NO: 1 в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления иРНК (например, дцРНК), описанная в настоящем документе, содержит антисмысловую цепь, имеющую область, которая по существу комплементарна области мРНК СА2 человека. В некоторых вариантах осуществления мРНК СА2 человека имеет последовательность NM\_000067.3 (SEQ ID NO: 1). Последовательность NM\_000067.3 также включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Обратный комплемент SEQ ID NO: 1 представлен в настоящем документе как SEQ ID NO: 2.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии карбоангидразы 2 (СА2), где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, части кодирующей цепи СА2 человека, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части некодирующей цепи СА2 человека, так что смысловая цепь комплементарна указанным по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии СА2, где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна указанным по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложена клетка или ткань человека, имеющая сниженный уровень мРНК СА2 или уровень белка СА2 по сравнению с в остальном аналогичной необработанной клеткой или тканью, где, необязательно, указанная клетка или ткань не является генетически модифицированной (например, где

указанная клетка или ткань содержит одну или более встречающихся в природе мутаций, например, СА2), где, необязательно, указанный уровень снижен на по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. В некоторых вариантах осуществления указанная клетка или ткань человека представляет собой клетку ресничного эпителия, клетку зрительного нерва, клетку трабекулярной сети, клетку канала Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку), клетку юкстаканаликулярной ткани, клетку ресничной мышцы, клетку сетчатки, астроцит, перицит, клетку Мюллера, ганглиозную клетку (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальную клетку, фоторецепторную клетку, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральные вены или ткань сосудистой оболочки, например, сосуд сосудистой оболочки.

В некоторых аспектах настоящего изобретения также предложена клетка, содержащая агент на основе дцРНК, описанный в настоящем документе.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена клетка глаза человека, например, (клетка ресничного эпителия, клетка зрительного нерва, клетка трабекулярной сети, клетка канала Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку), клетка юкстаканаликулярной ткани, клетка ресничной мышцы, клетка сетчатки, астроцит, перицит, клетка Мюллера, ганглиозная клетка (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальная клетка, фоторецепторная клетка, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральные вены или ткань сосудистой оболочки, например, сосуд сосудистой оболочки), имеющая сниженный уровень мРНК СА2 или уровень белка СА2 по сравнению с в остальном аналогичной необработанной клеткой. В некоторых вариантах осуществления уровень снижен на по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

В некоторых аспектах настоящего изобретения также предложена фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего СА2, содержащая агент на основе дцРНК, описанный в настоящем документе.

В некоторых аспектах настоящего изобретения также предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, включающий:

(а) приведение указанной клетки в контакт с агентом на основе дцРНК, описанным в настоящем документе, или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе; и

(b) выдерживание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для обеспечения деградации мРНК-транскрипта СА2, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии СА2 в клетке.

В некоторых аспектах настоящего изобретения также предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, включающий:

(а) приведение указанной клетки в контакт с агентом на основе дцРНК, описанным

в настоящем документе, или фармацевтической композицией, описанной в настоящем документе; и

(b) выдерживание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК СА2, белка СА2 или как мРНК, так и белка СА2, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии СА2 в клетке.

В некоторых аспектах настоящего изобретения также предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке или ткани глаза, включающий:

(a) приведение указанной клетки или ткани в контакт с агентом на основе дцРНК, который связывает СА2; и

(b) выдерживание клетки или ткани, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК СА2, белка СА2 или как мРНК, так и белка СА2, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии СА2 в клетке или ткани.

В некоторых аспектах настоящего изобретения также предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента на основе дцРНК, описанного в настоящем документе, или фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, с осуществлением, таким образом, лечения указанного нарушения.

В любом из аспектов в настоящем документе, например, в описанных выше композициях и способах, можно применять любой из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе (например, описанных ниже).

В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь СА2 человека имеет последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления не кодирующая цепь СА2 человека имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов с 0, или 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна указанным по меньшей мере 17 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов с 0, или 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или

3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна указанным по меньшей мере 19 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 смежный нуклеотид, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна указанному по меньшей мере 21 смежному нуклеотиду в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 смежный нуклеотид с 0, или 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления указанная часть смысловой цепи представляет собой часть в смысловой цепи из любой из таблиц 3-10.

В некоторых вариантах осуществления указанная часть антисмысловой цепи представляет собой часть в антисмысловой цепи из любой из таблиц 3-10.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую

по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 смежный нуклеотид, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 смежный нуклеотид, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе дцРНК имеет длину по меньшей мере 23 нуклеотида, например, длину 23-30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из смысловой цепи и антисмысловой цепи конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или более положениями в двухцепочечной области агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован посредством линкера или носителя. В некоторых вариантах осуществления липофильность липофильного фрагмента, измеренная с помощью  $\log K_{ow}$ , превышает 0. В некоторых вариантах осуществления

В некоторых вариантах осуществления гидрофобность двухцепочечного агента на основе РНКи, измеренная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы крови двухцепочечного агента на основе РНКи, превышает 0,2. В некоторых вариантах осуществления анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи являются немодифицированными нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситимидинового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, незамкнутого (разомкнутого) нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного

нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогексит-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи включают модификации, отличные от 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, незамкнутых нуклеиновых кислот (UNA) или глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит ненуклеотидный спейсер (где необязательно ненуклеотидный спейсер содержит С3-С6 алкил) между двумя из смежных нуклеотидов смысловой цепи или между двумя из смежных нуклеотидов антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет длину не более 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец из 2 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 15-30 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 17-23 пары нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 17-25 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 23-27 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 19-21 пару нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 21-23 пары нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет 19-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет 19-23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет 21-23 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления агент содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи. В некоторых вариантах осуществления указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь. В некоторых вариантах осуществления указанная цепь представляет собой смысловую цепь.

В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи. В некоторых вариантах

осуществления указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь. В некоторых вариантах осуществления указанная цепь представляет собой смысловую цепь.

В некоторых вариантах осуществления каждый из 5'- и 3'-конца одной цепи содержит фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления указанная цепь представляет собой антисмысловую цепь.

В некоторых вариантах осуществления пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь имеет в общей сложности 23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи. В некоторых вариантах осуществления один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи посредством линкера или носителя.

В некоторых вариантах осуществления конъюгация липофильного фрагмента с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи агента на основе двухцепочечной иРНК обеспечивает неожиданно хорошие результаты для интравитреальной доставки *in vivo* двухцепочечных иРНК, что приводит к эффективному проникновению в ткани глаза. Примеры и синтез липофильных фрагментов перечислены в заявке РСТ под номером РСТ/US2019/031170, которая настоящим включена посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения исключают область сайта расщепления смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 9-12, считая с 5'-конца смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13, считая с 3'-конца смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения исключают область сайта расщепления антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 12-14, считая с 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13 на смысловой цепи, считая с 3'-конца, и положений 12-14 на антисмысловой цепи, считая с 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления 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 с 5'-конца каждой цепи. В некоторых вариантах осуществления 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 с 5'-конца каждой цепи.

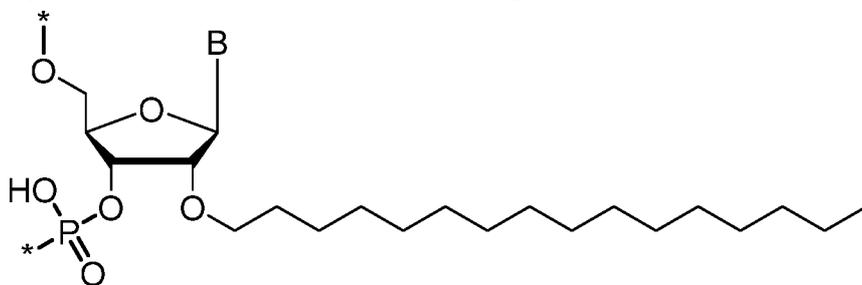
В некоторых вариантах осуществления положения в двухцепочечной области исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 20 или положением 15 смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 16 антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 6, считая с 5'-конца смысловой цепи. В одном из вариантов осуществления насыщенная или ненасыщенная C16 углеводородная цепь конъюгирована с положением 6, считая с 5'-конца цепи.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, 1-пиренмасляной 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)холеновой кислоты, диметокситритила или феноксазина. Подходящие липофильные фрагменты также включают фрагменты, содержащие насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь (например, C4-C30 алкил или алкенил) и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина. Функциональные группы применимы для присоединения липофильного фрагмента к агенту на основе иРНК. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь (например, линейный C6-C18 алкил или алкенил). В одном из вариантов осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь (например, линейный C16 алкил или алкенил).

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой С6-С30 кислоту (например, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту, ундекановую кислоту, додекановую кислоту, тридекановую кислоту, тетрадекановую кислоту, пентадекановую кислоту, гексадекановую кислоту, гептадекановую кислоту, октадекановую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, арахидоновую кислоту, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту, витамин А, витамин Е, холестерин и т. д.) или С6-С30 спирт (например, гексанол, гептанол, октанол, нонанол, деканол, ундеканол, додеканол, тридеканол, тетрадеканол, пентадеканол, гексадеканол, гептадеканол, октадеканол, олеиловый спирт, линолеиловый спирт, арахидоновый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексанол, ретинол, витамин Е, холестерин и т. д.).

В одном из вариантов осуществления лиганд конъюгирован в 2'-положении нуклеотида или модифицированного нуклеотида в смысловой или антисмысловой цепи. Например, лиганд С16 может быть конъюгирован, как показано в следующей структуре:



где \* обозначает связь со смежным нуклеотидом, и В представляет собой азотистое основание или аналог азотистого основания, необязательно где В представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении (положениях) двухцепочечной области. В некоторых вариантах осуществления 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 сериоловой основной цепи или диэтаноламиновой основной цепи.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с агентом на основе двухцепочечной иРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-простой тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с азотистым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

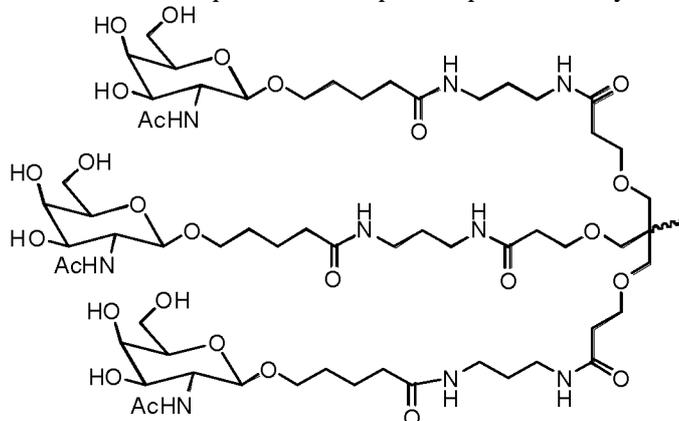
В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент или нацеливающий лиганд конъюгирован посредством биорасщепляемого линкера, выбранного из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи защищен посредством концевой кэпа, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, где 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.

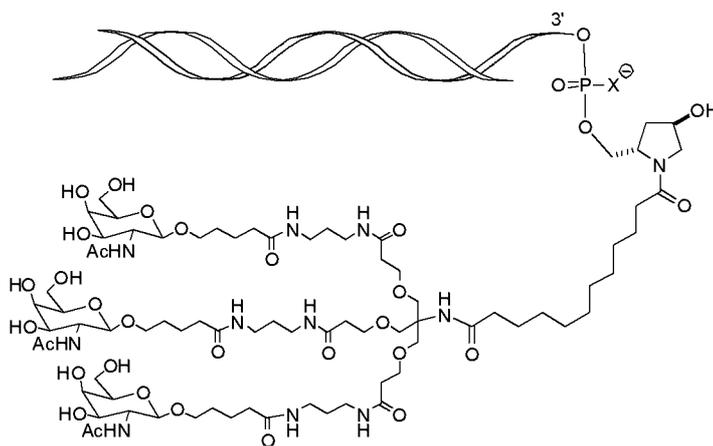
В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит нацеливающий лиганд, например, лиганд, который нацелен на ткань глаза. В некоторых вариантах осуществления ткань глаза представляет собой ресничный эпителий, зрительный нерв, трабекулярную сеть, юкстаканаликулярную ткань, ганглий (например, включая ганглий сетчатки), эписклеральные вены или канал Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку).

В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован со смысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом или 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит один или более конъюгатов GalNAc или одно или более производных GalNAc. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой один или более конъюгатов GalNAc или одно или более производных GalNAc, которые присоединены посредством одновалентного линкера или двухвалентного, трехвалентного или четырехвалентного разветвленного линкера. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой



В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующем схематическом изображении



где X представляет собой O или S. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой O.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rp-, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой, второй и третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rp-, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно

содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, присутствующую при третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rp-, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rp-, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

В различных вариантах осуществления вышеупомянутых агентов на основе дцРНК агент на основе дцРНК нацелен на область «горячей точки» мРНК, кодирующей СА2.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен агент на основе дцРНК, который нацелен на область «горячей точки» мРНК карбоангидразы 2 (СА2).

В некоторых вариантах осуществления клетка, описанная в настоящем документе, например, клетка человека, была получена с помощью способа, включающего приведение клетки человека в контакт с агентом на основе дцРНК, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, содержит агент на основе дцРНК и липидный состав.

В некоторых вариантах осуществления (например, вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе) клетка находится в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления уровень мРНК СА2 ингибируется на по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления уровень белка СА2 ингибируется на по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления экспрессия СА2 ингибируется на по меньшей мере 50%. В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии СА2 снижает уровень белка СА2 в биологическом образце (например, образце зрительного нерва), полученном от субъекта, на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена CA2 снижает уровень мРНК CA2 в биологическом образце (например, образце зрительного нерва), полученном от субъекта, на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта было диагностировано CA2-ассоциированное нарушение. В некоторых вариантах осуществления субъект соответствует по меньшей мере одному диагностическому критерию CA2-ассоциированного нарушения. В некоторых вариантах осуществления CA2-ассоциированное нарушение представляет собой глаукому или состояния, ассоциированные с глаукомой.

В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань глаза представляет собой клетку ресничного эпителия, клетку зрительного нерва, клетку трабекулярной сети, клетку канала Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку), клетку юкстаканаликулярной ткани, клетку ресничной мышцы, клетку сетчатки, астроцит, перицит, клетку Мюллера, ганглиозную клетку (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальную клетку, фоторецепторную клетку, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральные вены или ткань сосудистой оболочки, например, сосуд сосудистой оболочки.

В некоторых вариантах осуществления CA2-ассоциированное нарушение представляет собой глаукому и/или состояния, ассоциированные с глаукомой.

В некоторых вариантах осуществления лечение включает облегчение по меньшей мере одного признака или симптома нарушения. В некоторых вариантах осуществления указанный по меньшей мере один признак или симптом включает показатель одного или более из внутриглазного давления, потери зрения, повреждения зрительного нерва, воспаления глаза, остроты зрения или наличия, уровня или активности CA2 (например, гена CA2, мРНК CA2 или белка CA2).

В некоторых вариантах осуществления уровень CA2, превышающий референсный уровень, свидетельствует о том, что субъект имеет глаукому или состояние, ассоциированное с глаукомой. В некоторых вариантах осуществления лечение включает предупреждение прогрессирования нарушения. В некоторых вариантах осуществления лечение включает одно или более из (a) подавления или снижения внутриглазного давления; (b) ингибирования или снижения экспрессии или активности CA2; (c) снижения количества водянистой влаги; (d) подавления или снижения повреждения зрительного нерва; или (e) подавления или снижения гибели ганглиозных клеток сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к среднему снижению относительно исходного уровня мРНК CA2 в клетке или ткани на по меньшей мере 30%. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к среднему снижению относительно исходного уровня мРНК CA2 в клетке или ткани на по меньшей мере 60%. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к среднему снижению относительно исходного уровня мРНК CA2 в клетке или ткани на по меньшей мере 90%.

В некоторых вариантах осуществления после лечения у субъекта наблюдается по

меньшей мере 8-недельная продолжительность нокдауна после однократной дозы дцРНК, оцениваемая по белку СА2, например, в ресничном эпителии. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к по меньшей мере 12-недельной продолжительности нокдауна после однократной дозы дцРНК, оцениваемой по белку СА2, например, в ресничном эпителии. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к по меньшей мере 16-недельной продолжительности нокдауна после однократной дозы дцРНК, оцениваемой по белку СА2, например, в ресничном эпителии.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК вводят субъекту внутриглазным способом. В некоторых вариантах осуществления внутриглазное введение включает интравитреальное введение, например, интравитреальную инъекцию; транссклеральное введение, например, транссклеральную инъекцию; субконъюнктивальное введение, например, субконъюнктивальную инъекцию; ретробульбарное введение, например, ретробульбарную инъекцию; интракамеральное введение, например, интракамеральную инъекцию, или субретинальное введение, например, субретинальную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК вводят субъекту внутривенно. В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК вводят субъекту местно.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает измерение уровня СА2 (например, гена СА2, мРНК СА2 или белка СА2) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня СА2 у субъекта включает измерение уровня белка СА2 в биологическом образце, полученном от субъекта (например, образце ресничного эпителия). В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает проведение анализа крови, диагностической визуализации, измерения давления или биопсии ресничного эпителия.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает измерение уровня СА2 (например, гена СА2, мРНК СА2 или белка СА2) у субъекта до лечения агентом на основе дцРНК или фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления после определения того, что уровень СА2 у субъекта превышает референсный уровень, субъекту вводят агент на основе дцРНК или фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня СА2 у субъекта проводят после лечения агентом на основе дцРНК или фармацевтической композицией.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает лечение субъекта с помощью терапии, подходящей для лечения или предупреждения СА2-ассоциированного нарушения, например, глаукомы, где

указанная терапия включает лекарственный препарат для снижения внутриглазного давления, лазерное лечение, хирургическое вмешательство или трабекулэктомию. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает введение субъекту дополнительного агента, подходящего для лечения или предупреждения СА2-ассоциированного нарушения. В некоторых вариантах осуществления указанный дополнительный агент включает аналог простагландина, бета-блокатор, агонист альфа-адренергических рецепторов, ингибитор карбоангидразы или агент против СА2.

В некоторых вариантах осуществления агент против СА2 включает антитело к СА2 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, молекулу антитела к СА2).

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие источники, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном объеме.

Подробная информация о различных вариантах осуществления настоящего изобретения изложена в описании ниже. Другие признаки, объекты и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из описания и графических материалов, а также из формулы изобретения.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

иРНК управляет сиквенс-специфичной деградацией мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (РНКи). В настоящем документе описаны иРНК и способы их применения для модулирования (например, ингибирования) экспрессии СА2. Также предложены композиции и способы лечения нарушений, связанных с экспрессией СА2, таких как глаукома или состояния, ассоциированные с глаукомой.

СА2 человека, также известный как карбоангидраза 2, представляет собой металлофермент, кодируемый геном СА2. СА2 катализирует взаимопревращение между диоксидом углерода и бикарбонатом. СА2 экспрессируется различными тканями, в том числе тканями глаза, такими как ресничный эпителий, эпителий роговицы, клетки Мюллера, хрусталик, непигментированный эпителий радужной оболочки, пигментный эпителий сетчатки и пигментированный и непигментированный эпителий ресничных отростков.

Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что СА2 может усугублять патогенез глаукомы, например, путем повышения внутриглазного давления. СА2, по-видимому, является основной формой СА, экспрессируемой в ресничном эпителии человека, которая отвечает за образование водянистой влаги. Было показано, что ингибиторы карбоангидраз снижают образование водянистой влаги на вплоть до 40% и тем самым снижают внутриглазное давление в глазу.

В следующем описании раскрыто, как получать и применять композиции, содержащие иРНК, для модулирования (например, ингибирования) экспрессии СА2, а также композиции и способы лечения нарушений, связанных с экспрессией СА2.

В некоторых аспектах в настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие иРНК к СА2 и фармацевтически приемлемый носитель, способы

применения указанных композиций для ингибирования экспрессии СА2 и способы применения указанных фармацевтических композиций для лечения нарушений, связанных с экспрессией СА2 (например, глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой).

### **I. Определения**

Для удобства ниже приведены значения некоторых терминов и фраз, используемых в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. При наличии явных расхождений между использованием термина в других частях данного описания и его определением, представленным в данном разделе, определение в данном разделе имеет преимущественную силу.

Термин «приблизительно» применительно к числу или числовому диапазону означает, что указанное число или числовой диапазон являются приблизительными в пределах варибельности от эксперимента к эксперименту (или в пределах статистической погрешности эксперимента), и, таким образом, число или числовой диапазон могут варьироваться в пределах, например, от 1% до 15% от указанного числа или числового диапазона.

Подразумевается, что термин «по меньшей мере» перед числом или рядом чисел включает число, смежное с термином «по меньшей мере», и все последующие числа или целые числа, которые логически могут быть включены, как следует из контекста. Например, количество нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 17 нуклеотидов 20-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов обладают указанным свойством. Если «по меньшей мере» присутствует перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «по меньшей мере» может относиться к каждому из чисел в указанном ряду или диапазоне.

В контексте настоящего документа под «не более» или «или менее» подразумевается значение, смежное с этой фразой, и логичные более низкие значения или целые числа, как следует из контекста, до нуля. Например, дуплекс с ошибками спаривания с сайтом-мишенью в количестве «не более 2 нуклеотидов» имеет 2, 1 или 0 ошибок спаривания. Если «не более» присутствует перед рядом чисел или диапазоном, подразумевается, что «не более» может относиться к каждому из чисел в указанном ряду или диапазоне.

В контексте настоящего документа под «не более», как в «не более 10», подразумевается до 10 и включая 10, т. е. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Подразумевается, что диапазоны, приведенные в настоящем документе, включают все отдельные целые значения и все поддиапазоны в пределах таких диапазонов.

Термины «активировать», «усиливать», «увеличивать экспрессию», «повышать экспрессию», и т. п., если они относятся к гену СА2, в настоящем документе относятся к по меньшей мере частичной активации экспрессии гена СА2, что проявляется в повышении количества мРНК СА2, которое может быть выделено из или обнаружено в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибирован ген СА2, и которая была или которые были обработаны таким образом, что экспрессия гена СА2 повышена, по сравнению со второй

клеткой или группой клеток, по существу идентичной (идентичных) первой клетке или группе клеток, но которая не была или которые не были обработаны таким образом (контрольные клетки).

В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена CA2 активируется на по меньшей мере приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% путем введения иРНК, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ген CA2 активируется на по меньшей мере приблизительно 60%, 70% или 80% путем введения иРНК, предложенной в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена CA2 активируется на по меньшей мере приблизительно 85%, 90% или 95%, или более путем введения иРНК, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена CA2 повышается в по меньшей мере 1 раз, по меньшей мере 2 раза, по меньшей мере 5 раз, по меньшей мере 10 раз, по меньшей мере 50 раз, по меньшей мере 100 раз, по меньшей мере 500 раз, по меньшей мере 1000 раз или более в клетках, обработанных иРНК, описанной в настоящем документе, по сравнению с экспрессией в необработанной клетке. Активация экспрессии малыми дцРНК описана, например, в Li *et al.*, 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:17337-42, и в US2007/0111963 и US2005/226848, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Термины «вызывать сайленсинг», «ингибировать экспрессию», «понижать экспрессию», «подавлять экспрессию» и т. п., если они относятся к CA2, в настоящем документе относятся к по меньшей мере частичному подавлению экспрессии CA2, оцененному, например, по экспрессии мРНК CA2, экспрессии белка CA2 или другому параметру, функционально связанному с экспрессией CA2. Например, ингибирование экспрессии CA2 может проявляться в снижении количества мРНК CA2, которое может быть выделено из или обнаружено в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибирована CA2, и которая была или которые были обработаны таким образом, что экспрессия CA2 ингибируется по сравнению с контролем. Контроль может представлять собой вторую клетку или группу клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, за исключением того, что вторая клетка или группа клеток не были обработаны таким образом (контрольные клетки). Степень ингибирования обычно выражают в процентах от контрольного уровня, например,

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

В качестве альтернативы, степень ингибирования может быть представлена с точки зрения снижения параметра, который функционально связан с экспрессией CA2, например, количества белка, кодируемого геном CA2. Снижение параметра, функционально связанного с экспрессией CA2, может аналогичным образом быть выражено в процентах от

контрольного уровня. В принципе сайленсинг СА2 может быть определен в любой клетке, экспрессирующей СА2, либо конститутивно, либо посредством геномной инженерии, и с помощью любого подходящего анализа.

Например, в некоторых случаях экспрессия СА2 подавляется на по меньшей мере приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% путем введения иРНК, раскрытой в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления СА2 подавляется на по меньшей мере приблизительно 60%, 65%, 70%, 75% или 80% путем введения иРНК, раскрытой в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления СА2 подавляется на по меньшей мере приблизительно 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более путем введения иРНК, описанной в настоящем документе.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи иРНК, например дцРНК, которая содержит область, которая по существу комплементарна последовательности-мишени.

В контексте настоящего документа термин «область комплементарности» относится к области на антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например, последовательности-мишени, как определено в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, ошибки спаривания могут находиться во внутренней или концевой областях молекулы. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит 0, 1 или 2 ошибки спаривания.

В контексте настоящего документа «смысловая цепь» или «пассажирская цепь» относится к цепи иРНК, которая содержит область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, соответствующей определению этого термина в настоящем документе.

Термины «тупой» или «с тупыми концами», используемые в настоящем документе в отношении дцРНК, означают, что на данном конце дцРНК нет неспаренных нуклеотидов или аналогов нуклеотидов, т. е., нет нуклеотидного выступающего конца. Один или оба конца дцРНК могут быть тупыми. Если оба конца дцРНК являются тупыми, то считается, что дцРНК представляет собой дцРНК с тупыми концами. Для ясности, дцРНК «с тупыми концами» представляет собой дцРНК, которая имеет тупые концы на обоих концах, т. е. не имеет нуклеотидного выступающего конца ни на одном из концов молекулы. Наиболее часто такая молекула будет двухцепочечной по всей своей длине.

В контексте настоящего документа, если не указано иное, термин «комплементарный» при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности в отношении второй нуклеотидной последовательности относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего указанную первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим указанную вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области техники. Такие условия могут представлять собой,

например, «жесткие условия», включая, не ограничиваясь перечисленным, 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 часов с последующим промыванием. В контексте настоящего документа «жесткие условия» или «жесткие условия гибридизации» относятся к условиям, при которых антисмысловое соединение будет гибридизоваться с его последовательностью-мишенью, но с минимальным количеством других последовательностей. Жесткие условия зависят от последовательности и будут отличаться в разных условиях, и «жесткие условия», при которых антисмысловые соединения гибридизируются с последовательностью-мишенью, определяются природой и составом антисмысловых соединений и анализами, в которых они исследуются. Могут применяться другие условия, такие как физиологически значимые условия, которые могут иметь место внутри организма. Специалист сможет определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в иРНК, например, в дцРНК, описанной в настоящем документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащих первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут называться в настоящем документе «полностью комплементарными» относительно друг друга. Однако, если первая последовательность называется «по существу комплементарной» по отношению ко второй последовательности в настоящем документе, эти две последовательности могут быть полностью комплементарными, или они могут образовывать одно или более, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 ошибочно спаренных оснований при гибридизации для дуплекса, состоящего из до 30 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления «по существу комплементарные» последовательности, раскрытые в настоящем документе, содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области последовательности-мишени GPR146, например, на приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% комплементарна. Однако, если два олигонуклеотида предназначены для образования при гибридизации одного или более одноцепочечных выступающих концов, такие выступающие концы не должны рассматриваться как ошибки спаривания в отношении определения комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где 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 пары оснований, отличные от пар по Уотсон-Крику, и/или пары оснований, образованные из неприродных и модифицированных нуклеотидов, или быть образованы полностью из них, если выполняются вышеуказанные требования в отношении их способности к гибридизации. Такие пары оснований, отличные от пар по Уотсон-Крику, включают, не ограничиваясь перечисленным, неоднозначные («Wobble») пары оснований G:U или хугстиновские пары оснований.

Термины «комплементарный», «полностью комплементарный» и «по существу комплементарный» в настоящем документе могут использоваться в отношении соответствия оснований между двумя олигонуклеотидами или полинуклеотидами, такими как смысловая цепь и антисмысловая цепь дцРНК, или между антисмысловой цепью агента на основе иРНК и последовательностью-мишенью, как будет понятно из контекста их использования.

В контексте настоящего документа полинуклеотид, «по существу комплементарный по меньшей мере части» матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывной части представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей белок СА2). Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК СА2, если последовательность по существу комплементарна не прерывающейся части мРНК, кодирующей СА2. Термин «комплементарность» относится к способности к спариванию между азотистыми основаниями первой нуклеиновой кислоты и второй нуклеиновой кислоты.

В контексте настоящего документа термин «область комплементарности» относится к области одного агента на основе нуклеотидной последовательности, которая по существу комплементарна другой последовательности, например, области смысловой последовательности и соответствующей антисмысловой последовательности дцРНК, или антисмысловой цепи иРНК и последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности СА2, как определено в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, ошибки спаривания могут находиться во внутренней или концевых областях антисмысловой цепи иРНК. Как правило, наиболее допустимые ошибки спаривания находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'- или 3'-конца агента на основе иРНК.

В контексте настоящего документа «приведение в контакт» включает приведение в непосредственный контакт с клеткой, а также приведение в опосредованный контакт с клеткой. Например, клетка в организме субъекта может быть приведена в контакт, когда субъекту вводят композицию, содержащую иРНК (например, внутриглазным способом, местно или внутривенно).

Термин «введение в клетку» применительно к иРНК означает облегчение или осуществление поглощения или абсорбции в клетку. Абсорбция или поглощение иРНК может происходить посредством самостоятельно протекающих диффузионных или активных клеточных процессов, или с помощью вспомогательных агентов или устройств.

Значение данного термина не ограничено клетками *in vitro*; иРНК также может быть «введена в клетку», где клетка является частью живого организма. В таком случае введение в клетку будет включать доставку в организм. Например, для доставки *in vivo* иРНК может быть введена в участок ткани или введена системно. Доставка *in vivo* также может осуществляться с помощью системы доставки на основе  $\beta$ -глобулинов, такой как описанные в патентах США № 5032401 и 5607677 и публикации заявки на патент США № 2005/0281781, которые настоящим включены посредством ссылки в полном объеме. Введение *in vitro* в клетку включает способы, известные из уровня техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в настоящем документе ниже или известны из уровня техники. В контексте настоящего документа «нарушение, связанное с экспрессией СА2», «заболевание, связанное с экспрессией СА2», «патологический процесс, связанный с экспрессией СА2», «СА2-ассоциированное нарушение», «СА2-ассоциированное заболевание» и т. п. включает любое состояние, нарушение или заболевание, при котором экспрессия СА2 изменена (например, снижена или повышена относительно референсного уровня, например, уровня, типичного для субъекта без заболевания). В некоторых вариантах осуществления экспрессия СА2 снижена. В некоторых вариантах осуществления экспрессия СА2 повышена. В некоторых вариантах осуществления снижение или повышение экспрессии СА2 может быть обнаружено в образце ткани, полученном от субъекта (например, в образце зрительного нерва). Снижение или повышение может быть оценено относительно уровня, наблюдаемого у того же индивидуума до развития нарушения, или относительно другого индивидуума (индивидуумов), у которого отсутствует нарушение. Снижение или повышение может быть ограничено определенным органом, тканью или областью тела (например, глазом). СА2-ассоциированные нарушения, включают, не ограничиваясь перечисленным, глаукому или состояния, ассоциированные с глаукомой.

В контексте настоящего документа термин «состояние (состояния), ассоциированное с глаукомой» означает любое заболевание или состояние, которое ассоциировано с повышением внутриглазного давления. Неограничивающие примеры состояний, ассоциированных с глаукомой, которые поддаются лечению способами, предложенными в настоящем документе, включают глаукому, открытоугольную глаукому, закрытоугольную глаукому, воспаление глаза, системное воспаление, передний увеит, острый некроз сетчатки, синдром Штурге-Вебера, синдром Аксенфельда-Ригера, синдром Марфана, гомоцистинурию, синдром Вейля-Маркезани и аутоиммунные заболевания, такие как ювенильный ревматоидный артрит и анкилозирующий спондилит Мари-Штрюмпеля.

Термин «двухцепочечная РНК», «дцРНК» или «миРНК» в контексте настоящего документа относится к иРНК, которая включает молекулу РНК или комплекс молекул, имеющий гибридную дуплексную область, которая содержит две антипараллельные и по существу комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, которые будут называться имеющими «смысловую» и «антисмысловую» ориентации относительно

РНК-мишени. Дуплексная область может иметь любую длину, которая обеспечивает специфичную деградацию требуемой РНК-мишени, например, по пути RISC, но, как правило, будет находиться в диапазоне от 9 до 36 пар оснований в длину, например, 15-30 пар оснований в длину. Учитывая дуплекс длиной от 9 до 36 пар оснований, дуплекс может иметь любую длину в этом диапазоне, например, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, или 36, и любой промежуточный поддиапазон, включая, не ограничиваясь перечисленным, 15-30 пар оснований, 15-26 пар оснований, 15-23 пары оснований, 15-22 пары оснований, 15-21 пары оснований, 15-20 пар оснований, 15-19 пар оснований, 15-18 пар оснований, 15-17 пар оснований, 18-30 пар оснований, 18-26 пар оснований, 18-23 пары оснований, 18-22 пары оснований, 18-21 пары оснований, 18-20 пар оснований, 19-30 пар оснований, 19-26 пар оснований, 19-23 пары оснований, 19-22 пары оснований, 19-21 пары оснований, 19-20 пар оснований, 20-30 пар оснований, 20-26 пар оснований, 20-25 пар оснований, 20-24 пары оснований, 20-23 пары оснований, 20-22 пары оснований, 20-21 пары оснований, 21-30 пар оснований, 21-26 пар оснований, 21-25 пар оснований, 21-24 пары оснований, 21-23 пары оснований или 21-22 пары оснований. дцРНК, полученные в клетке путем процессинга Dicer и аналогичными ферментами, как правило, имеют длину в диапазоне 19-22 пары оснований. Одна цепь дуплексной области дцДНК содержит последовательность, которая по существу комплементарна области РНК-мишени. Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут происходить из одной молекулы РНК, имеющей по меньшей мере одну самокомплементарную область, или могут быть образованы из двух или более отдельных молекул РНК. Если дуплексная область образована из двух цепей одной молекулы, молекула может иметь дуплексную область, разделенную одноцепочечной цепью нуклеотидов (в настоящем документе называемую «шпилечной петлей») между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру. Шпилечная петля может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид; в некоторых вариантах осуществления шпилечная петля может содержать по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренных нуклеотидов. Если две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, эти молекулы не обязательно должны быть, но могут быть ковалентно связаны. В некоторых вариантах осуществления две цепи ковалентно связаны способом, отличным от шпилечной петли, и соединительная структура представляет собой линкер.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК может представлять собой «одноцепочечную миРНК», которую вводят в клетку или организм для ингибирования мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные агенты на основе РНК могут связываться с эндонуклеазой RISC Argonaute 2, которая затем расщепляет мРНК-мишень. Одноцепочечные миРНК обычно состоят из 15-30 нуклеотидов и необязательно являются химически модифицированными. Конструирование и

тестирование одноцепочечных миРНК описаны в патенте США № 8101348 и в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894, содержание каждого из которых настоящим включено посредством ссылки в полном объеме. Любая из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в настоящем документе (например, последовательностей, представленных в таблицах 3-10), может быть использована в качестве одноцепочечной миРНК, описанной в настоящем документе, и необязательно в виде химически модифицированной, например, как описано в настоящем документе, например, способами, описанными в Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе РНК-интерференции включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени для управления расщеплением РНК-мишени. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что длинная двухцепочечная РНК, вводимая в клетки, расщепляется на миРНК с помощью эндонуклеазы III типа, известной как Dicer (Sharp *et al.*, *Genes Dev.* 2001, 15:485). Dicer, рибонуклеаза III-подобный фермент, осуществляет процессинг дцРНК на малые интерферирующие РНК из 19-23 пар оснований с характерными 3'-выступающими концами из двух оснований (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Затем миРНК включаются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), где одна или более хеликаз раскручивают дуплекс миРНК, что позволяет комплементарной антисмысловой цепи управлять распознаванием мишени (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). При связывании с соответствующей мРНК-мишенью одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляет мишень, индуцируя сайленсинг (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к одноцепочечной РНК, которая способствует образованию комплекса RISC для осуществления сайленсинга гена-мишени.

Каждый из «G», «C», «A», «T» и «U» в целом означает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Однако следует исходить из того, что термины «дезоксирибонуклеотид», «рибонуклеотид» или «нуклеотид» также могут относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или имитирующему замещающему фрагменту. Специалисту в данной области техники хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть заменены другими фрагментами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой замещающий фрагмент. Например, не ограничиваясь перечисленным, нуклеотид, содержащий инозин в качестве своего 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, представленных в настоящем изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любой части олигонуклеотида могут быть заменены гуанином и урацилом соответственно, с образованием неоднозначных («Wobble») пар оснований G-U с мРНК-мишенью. Последовательности, содержащие такие

замещающие фрагменты, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем изобретении.

В контексте настоящего документа термины «иРНК», «РНКи», «агент на основе иРНК» или «агент на основе РНКи» или «молекула РНКи» относятся к агенту, который содержит РНК, соответствующей определению этого термина в настоящем документе, и который опосредует направленное расщепление РНК-транскрипта, например, посредством пути РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, обеспечивает ингибирование экспрессии СА2, например, в клетке или организме млекопитающего. Ингибирование экспрессии СА2 может быть оценено по снижению уровня мРНК СА2 или снижению уровня белка СА2.

Термин «линкер» или «линкерная группа» означает органический фрагмент, который соединяет две части соединения, например, ковалентно присоединяет две части соединения.

Термин «липофильный» или «липофильный фрагмент» в широком смысле относится к любому соединению или химическому фрагменту, обладающему аффинностью к липидам. Одним из способов определения липофильности липофильного фрагмента является коэффициент распределения октанол-вода  $\log K_{ow}$ , где  $K_{ow}$  представляет собой отношение концентрации химического вещества в октанольной фазе к его концентрации в водной фазе двухфазной системы в равновесном состоянии. Коэффициент распределения октанол-вода представляет собой измеренное в лаборатории свойство вещества. Однако его также можно спрогнозировать с использованием коэффициентов, присвоенных структурным компонентам химического вещества, которые рассчитывают с использованием неэмпирических или эмпирических методов (см., например, Tetko et al., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 41:1407-21 (2001), включенный в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Это обеспечивает термодинамическую меру склонности вещества к предпочтению неводной или масляной среды, а не воды (т. е. его гидрофильно-липофильного баланса). По общему правилу, химическое вещество является липофильным по своему характеру, когда его  $\log K_{ow}$  превышает 0. Как правило, липофильный фрагмент характеризуется  $\log K_{ow}$ , превышающим 1, превышающим 1,5, превышающим 2, превышающим 3, превышающим 4, превышающим 5 или превышающим 10. Например, прогнозируется, что  $\log K_{ow}$  6-аминогексанола, например, будет составлять приблизительно 0,7. Спрогнозированное тем же способом  $\log K_{ow}$  холестерил-N-(гексан-6-ол)карбамата будет составлять 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 увеличить или уменьшить значение коэффициента распределения (например,  $\log K_{ow}$ ) липофильного фрагмента.

В качестве альтернативы, гидрофобность двухцепочечного агента на основе РНКи, конъюгированного с одним или более липофильными фрагментами, может быть измерена

по его характеристикам связывания с белками. Например, в отдельных вариантах осуществления может быть определено, что несвязанная фракция в анализе связывания с белками плазмы крови двухцепочечного агента на основе РНКи положительно коррелирует с относительной гидрофобностью двухцепочечного агента на основе РНКи, что затем может положительно коррелировать с сайленсинговой активностью двухцепочечного агента на основе РНКи.

В некоторых вариантах осуществления анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с использованием белка сывороточного альбумина человека. Иллюстративный протокол данного анализа связывания подробно проиллюстрирован, например, в РСТ/US2019/031170. Гидрофобность двухцепочечного агента на основе РНКи, измеренная по фракции несвязанной миРНК 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 миРНК *in vivo*.

Соответственно, конъюгирование липофильных фрагментов с внутренним положением (положениями) двухцепочечного агента на основе РНКи обеспечивает оптимальную гидрофобность для улучшенной доставки миРНК *in vivo*.

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

В контексте настоящего документа термин «модулировать экспрессию» относится к по меньшей мере частичному «ингибированию» или частичной «активации» экспрессии гена (например, гена CA2) в клетке, обработанной композицией на основе иРНК, описанной в настоящем документе, по сравнению с экспрессией соответствующего гена в контрольной клетке. Контрольная клетка включает необработанную клетку или клетку, обработанную ненацеленной контрольной иРНК.

Специалисту в данной области будет ясно, что термин «молекула РНК» или «молекула рибонуклеиновой кислоты» охватывает не только молекулы РНК, экспрессируемые или встречающиеся в природе, но также аналоги и производные РНК, содержащие один или более аналогов или производных рибонуклеотидов/рибонуклеозидов, описанных в настоящем документе или известных из уровня техники. Строго говоря, «рибонуклеозид» включает азотистое основание и рибозный сахар, а «рибонуклеотид» представляет собой рибонуклеозид с одним, двумя или тремя фосфатными фрагментами или их аналогами (например, фосфоротиоатом). Однако термины «рибонуклеозид» и «рибонуклеотид» можно считать эквивалентными в контексте настоящего документа. РНК может быть модифицирована по структуре азотистого основания, по структуре рибозы или по структуре рибозафосфатного остова, например, как

описано в настоящем документе ниже. Однако молекулы, содержащие аналоги или производные рибонуклеозидов, должны сохранять способность образовывать дуплекс. В качестве неограничивающих примеров молекула РНК может также включать по меньшей мере один модифицированный рибонуклеозид, включая, не ограничиваясь перечисленным, 2'-О-метил-модифицированный нуклеозид, нуклеозид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, концевой нуклеозид, связанный с холестерилловым производным или бисдециламидной группой додекановой кислоты, замкнутый нуклеозид, нуклеозид с удаленным азотистым основанием, ациклический нуклеозид, гликоль-модифицированный нуклеотид, 2'-дезоксид-2'-фтормодифицированный нуклеозид, 2'-аминомодифицированный нуклеозид, 2'-алкил-модифицированный нуклеозид, морфолиновый нуклеозид, фосфорамидат или нуклеозид, содержащий неприродное основание, или любую их комбинацию. В качестве альтернативы или в комбинации, молекула РНК может содержать по меньшей мере два модифицированных рибонуклеозида, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или более, вплоть до всей длины молекулы дцРНК. Модификации не обязательно должны быть одинаковыми для каждого из такого множества модифицированных рибонуклеозидов в молекуле РНК. В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНК, предусмотренные для применения в способах и композициях, описанных в настоящем документе, представляют собой пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), которые обладают способностью образовывать необходимую дуплексную структуру и которые обеспечивают или опосредуют специфичную деградацию РНК-мишени, например, посредством пути RISC. Для ясности, следует исходить из того, что термин «иРНК» не охватывает встречающуюся в природе молекулу двухцепочечной ДНК или молекулу ДНК, на 100% состоящую из дезоксирибонуклеозидов.

В некоторых аспектах модифицированный рибонуклеозид включает дезоксирибонуклеозид. В таком случае агент на основе иРНК может содержать один или более дезоксирибонуклеозидов, в том числе, например, дезоксирибонуклеозидный выступающий конец (концы) или один или более дезоксирибонуклеозидов в двухцепочечной части дцРНК. В отдельных вариантах осуществления процентное содержание дезоксирибонуклеозидов в молекуле РНК составляет по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или более (но не 100%) дезоксирибонуклеозидов, например, в одной или обеих цепях.

В контексте настоящего документа термин «нуклеотидный выступающий конец» относится к по меньшей мере одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры иРНК, например, дцРНК. Например, если 3'-конец одной цепи дцРНК проходит за пределы 5'-конца другой цепи, или наоборот, имеется нуклеотидный выступающий конец. дцРНК может содержать выступающий конец из по меньшей мере одного нуклеотида; в качестве альтернативы, выступающий конец может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре

нуклеотида или по меньшей мере пять нуклеотидов, или более. Нуклеотидный выступающий конец может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, в том числе дезоксинуклеотида/нуклеозида. Выступающий конец (концы) может находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы), составляющие выступающий конец, могут присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь дцРНК имеет выступающий конец из 1-10 нуклеотидов на 3'-конце и/или 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов в выступающем конце заменены нуклеозидным тиофосфатом.

В контексте настоящего документа «фармацевтическая композиция» содержит фармакологически эффективное количество терапевтического агента (например, иРНК) и фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего документа «фармакологически эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или просто «эффективное количество» относится к такому количеству агента (например, иРНК), которое является эффективным для достижения предполагаемого фармакологического, терапевтического или профилактического результата. Например, в способе лечения нарушения, связанного с экспрессией СА2 (например, или глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой), эффективное количество включает количество, эффективное для уменьшения одного или более симптомов, ассоциированных с нарушением, например, количество, эффективное для (а) подавления или снижения внутриглазного давления; (b) ингибирования или снижения экспрессии или активности СА2; (c) снижения количества водянистой влаги; (d) подавления или снижения повреждения зрительного нерва; или (e) подавления или снижения гибели ганглиозных клеток сетчатки, или количество, эффективное для снижения риска развития состояний, ассоциированных с указанным нарушением. Например, если отдельно взятое клиническое лечение считается эффективным, когда имеет место по меньшей мере 10% снижение измеряемого параметра, ассоциированного с заболеванием или нарушением, терапевтически эффективное количество лекарственного средства для лечения этого заболевания или нарушения представляет собой количество, необходимое для достижения по меньшей мере 10% снижения этого параметра. Например, терапевтически эффективное количество иРНК, нацеленной на СА2, может снижать уровень мРНК СА2 или уровень белка СА2 на любое измеримое количество, например, на по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к носителю для введения терапевтического агента. Такие носители включают, не ограничиваясь перечисленным, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. Из данного термина специально исключена среда для культивирования клеток. Для лекарственных средств, вводимых

перорально, фармацевтически приемлемые носители включают, не ограничиваясь перечисленным, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как инертные разбавители, разрыхлители, связующие средства, смазывающие средства, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты. Подходящие инертные разбавители включают карбонат натрия и кальция, фосфат натрия и кальция и лактозу, тогда как кукурузный крахмал и альгиновая кислота являются подходящими разрыхлителями. Связующие средства могут включать крахмал и желатин, тогда как смазывающее средство, при его наличии, обычно будет представлять собой стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк. При необходимости таблетки могут быть покрыты материалом, таким как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, для задержки всасывания в желудочно-кишечном тракте. Агенты, включенные в составы лекарственных средств, дополнительно описаны ниже в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термин «SNALP» относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. SNALP представляет собой везикулу из липидов, покрывающую восстановленное внутреннее пространство на водной основе, содержащее нуклеиновую кислоту, такую как иРНК, или плазмиду, из которой транскрибируется иРНК. SNALP описаны, например, в публикациях заявок на патент США № 2006/0240093, 2007/0135372 и в международной заявке WO 2009/082817. Эти заявки включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления SNALP представляет собой SPLP. В контексте настоящего документа термин «SPLP» относится к частице нуклеиновая кислота-липид, содержащей плазмидную ДНК, инкапсулированную в липидную везикулу.

В контексте настоящего документа термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описана последовательностью, обозначенной с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

В контексте настоящего документа «субъект», подлежащий лечению в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, включает человека или отличное от человека животное, например, млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой, например, грызуна (например, крысу или мышь) или примата (например, обезьяну). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

«Субъект, нуждающийся в этом» включает субъекта, имеющего, предположительно имеющего или подверженного риску развития нарушения, связанного с экспрессией, например, сверхэкспрессией, СА2 (например, глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или предположительно имеет нарушение, связанное с экспрессией или сверхэкспрессией СА2. В некоторых вариантах осуществления субъект подвержен риску развития нарушения, связанного с экспрессией или сверхэкспрессией СА2.

В контексте настоящего документа «последовательность-мишень» относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во

время транскрипции гена, например, СА2, включая мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. Целевая часть последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для иРНК-направленного расщепления в этой части или вблизи нее. Например, длина последовательности-мишени обычно будет составлять 9-36 нуклеотидов, например, 15-30 нуклеотидов, включая все промежуточные поддиапазоны. В качестве неограничивающих примеров последовательность-мишень может составлять 15-30 нуклеотидов, 15-26 нуклеотидов, 15-23 нуклеотида, 15-22 нуклеотида, 15-21 нуклеотид, 15-20 нуклеотидов, 15-19 нуклеотидов, 15-18 нуклеотидов, 15-17 нуклеотидов, 18-30 нуклеотидов, 18-26 нуклеотидов, 18-23 нуклеотида, 18-22 нуклеотида, 18-21 нуклеотид, 18-20 нуклеотидов, 19-30 нуклеотидов, 19-26 нуклеотидов, 19-23 нуклеотида, 19-22 нуклеотида, 19-21 нуклеотид, 19-20 нуклеотидов, 20-30 нуклеотидов, 20-26 нуклеотидов, 20-25 нуклеотидов, 20-24 нуклеотида, 20-23 нуклеотида, 20-22 нуклеотида, 20-21 нуклеотид, 21-30 нуклеотидов, 21-26 нуклеотидов, 21-25 нуклеотидов, 21-24 нуклеотида, 21-23 нуклеотида или 21-22 нуклеотида.

В контексте настоящего документа фразы «терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество», и т. п. относятся к количеству, которое обеспечивает терапевтическую пользу при лечении, предупреждении или контроле любого нарушения или патологического процесса, связанного с экспрессией СА2 (например, глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой). Конкретное количество, которое является терапевтически эффективным, может варьировать в зависимости от факторов, известных из уровня техники, таких как, например, тип нарушения или патологического процесса, анамнез и возраст пациента, стадия нарушения или патологического процесса и проведение других видов терапии.

В контексте настоящего изобретения термины «лечить», «лечение» и т. п. означают предупреждение, задержку, купирование или облегчение по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с нарушением, связанным с экспрессией СА2, или замедление или реверсию прогрессирования или ожидаемого прогрессирования такого нарушения. Например, способы, представленные в настоящем документе, при применении для лечения глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой, могут служить для уменьшения или предупреждения одного или более симптомов глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой, описанных в настоящем документе, или для снижения риска или тяжести ассоциированных состояний. Таким образом, если из контекста явно не следует иное, подразумевается, что термины «лечить», «лечение» и т. п. охватывают профилактику, например, предупреждение нарушений и/или симптомов нарушений, связанных с экспрессией СА2. Лечение также может означать продление выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствие лечения.

Под «более низким» в контексте маркера заболевания или симптома подразумевается любое снижение, например статистически или клинически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере 10%, по

меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%. Снижение может достигать уровня, считающегося находящимся в пределах нормы для индивидуума без такого нарушения.

В контексте настоящего документа «CA2» относится к «карбонангидразе 2», соответствующей мРНК («мРНК CA2») или соответствующему белку («белку CA2»). Последовательность мРНК-транскрипта CA2 человека представлена под SEQ ID NO: 1.

Термин «замещенный» относится к замене одного или более радикалов водорода в данной структуре радикалом указанного заместителя, включая, не ограничиваясь перечисленным: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероцикл, галоген, тиол, алкилтио, арилтио, алкилтиоалкил, арилтиоалкил, алкилсульфонил, алкилсульфонилалкил, арилсульфонилалкил, алкокси, арилокси, арилалкокси, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, ариламинокарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, галогеналкил, амино, трифторметил, циано, нитро, алкиламино, ариламино, алкиламиноалкил, ариламиноалкил, аминокламино, гидроксид, алкоксиалкил, карбоксиалкил, алкоксикарбонилалкил, аминокарбонилалкил, ацил, арилалкоксикарбонил, карбоновую кислоту, сульфоновую кислоту, сульфонил, фосфоновую кислоту, арил, гетероарил, гетероциклический и алифатический. Следует исходить из того, что заместитель может быть дополнительно замещен.

Термин «алкил» относится к насыщенным и ненасыщенным неароматическим углеводородным цепям, которые могут иметь неразветвленную или разветвленную цепь, содержащую указанное количество атомов углерода (они включают, не ограничиваясь перечисленным, пропил, аллил или пропаргил), в которые могут быть необязательно вставлены N, O или S. Например, «(C1-C6) алкил» означает радикал, имеющий от 1 до 6 атомов углерода в линейной или разветвленной компоновке. «(C1-C6) алкил» включает, например, метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, пентил и гексил. В отдельных вариантах осуществления липофильный фрагмент согласно настоящему изобретению может содержать C6-C18 алкильную углеводородную цепь.

Термин «алкилен» относится к необязательно замещенному насыщенному алифатическому двухвалентному углеводородному радикалу с разветвленной или неразветвленной цепью, содержащему указанное количество атомов углерода. Например, «(C1-C6) алкилен» означает двухвалентный насыщенный алифатический радикал, имеющий от 1 до 6 атомов углерода в линейной компоновке, например,  $[(CH_2)_n]$ , где n представляет собой целое число от 1 до 6. «(C1-C6) алкилен» включает метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен и гексилен. В качестве альтернативы, «(C1-C6) алкилен» означает двухвалентный насыщенный радикал, имеющий от 1 до 6 атомов углерода в разветвленной компоновке, например:  $[(CH_2CH_2CH_2CH_2CH(CH_3))]$ ,  $[(CH_2CH_2CH_2CH_2C(CH_3)_2)]$ ,  $[(CH_2C(CH_3)_2CH(CH_3))]$  и т. п. Термин «алкилендиоксо» относится к двухвалентному соединению структуры -O-R-O-, где R представляет собой алкилен.

Термин «меркапто» относится к радикалу  $-SH$ . Термин «тиоалкокси» относится к  $S$ -алкильному радикалу.

Термин «галоген» относится к любому радикалу, представляющему собой фтор, хлор, бром или иод. Термины «галоген» и «гало» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

В контексте настоящего документа термин «циклоалкил» означает насыщенную или ненасыщенную неароматическую углеводородную кольцевую группу, имеющую от 3 до 14 атомов углерода, если не указано иное. Например, «(C3-C10) циклоалкил» означает углеводородный радикал (3-10)-членного насыщенного алифатического циклического углеводородного кольца. Примеры циклоалкильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, циклопропил, метилциклопропил, 2,2-диметилциклобутил, 2-этилциклопентил, циклогексил и т. д. Циклоалкилы могут включать несколько спиро- или конденсированных колец. Циклоалкильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любом положении, которое допускается нормальной валентностью.

В контексте настоящего документа термин «алкенил» относится к неароматическому углеводородному радикалу, неразветвленному или разветвленному, содержащему по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь и имеющему от 2 до 10 атомов углерода, если не указано иное. В таких группах может присутствовать до пяти углерод-углеродных двойных связей. Например, «C2-C6» алкенил определен как алкенильный радикал, имеющий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, этенил, пропенил, бутенил и циклогексенил. Неразветвленная, разветвленная или циклическая часть алкенильной группы может содержать двойные связи и необязательно является моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенной в любом положении, которое допускается нормальной валентностью. Термин «циклоалкенил» означает моноциклическую углеводородную группу, имеющую указанное количество атомов углерода и по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

В контексте настоящего документа термин «алкинил» относится к углеводородному радикалу, неразветвленному или разветвленному, содержащему от 2 до 10 атомов углерода, если не указано иное, и содержащему по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Может присутствовать до 5 углерод-углеродных тройных связей. Таким образом, «C2-C6 алкинил» означает алкинильный радикал, имеющий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкинильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, этинил, 2-пропинил и 2-бутинил. Неразветвленная или разветвленная часть алкинильной группы может содержать тройные связи, если это допускается нормальной валентностью, и необязательно может быть моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенной в любом положении, которое допускается нормальной валентностью.

В контексте настоящего документа «алкоксил» или «алкокси» относится к алкильной группе, как определено выше, с указанным количеством атомов углерода, присоединенных через кислородный мостик. Например, «(C1-C3)алкокси» включает

метокси, этокси и пропокси. Например, подразумевается, что «(C1-C6)алкокси» включает C1, C2, C3, C4, C5 и C6 алкоксигруппы. Например, подразумевается, что «(C1-C8)алкокси» включает C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 и C8 алкоксигруппы. Примеры алкокси включают, не ограничиваясь перечисленным, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, s-бутокси, трет-бутокси, н-пентокси, s-пентокси, н-гептокси и н-октокси. «Алкилтио» означает алкильный радикал, присоединенный через связующий атом серы. Термины «алкиламино» или «аминоалкил» означают алкильный радикал, присоединенный через NH-связь. «Диалкиламино» означает два алкильных радикала, присоединенных через атом азота. Аминогруппы могут быть незамещенными, монозамещенными или дизамещенными. В некоторых вариантах осуществления два алкильных радикала являются одинаковыми (например, N, N-диметиламино). В некоторых вариантах осуществления два алкильных радикала являются разными (например, N-этил-N-метиламино).

В контексте настоящего документа «арил» или «ароматический» означает любое стабильное моноциклическое или полициклическое углеродное кольцо, имеющее до 7 атомов в каждом кольце, где по меньшей мере одно кольцо является ароматическим. Примеры арильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, фенил, нафтил, антраценил, тетрагидронафтил, инданил и бифенил. В случаях, когда арильный заместитель является бициклическим, и одно кольцо является неароматическим, следует исходить из того, что присоединение происходит по ароматическому кольцу. Арильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любом положении, которое допускается нормальной валентностью. Термин «арилалкил» или термин «аралкил» относится к алкилу, замещенному арилом. Термин «арилалкокси» относится к алкокси, замещенному арилом.

«Гетеро» относится к замене по меньшей мере одного атома углерода в кольцевой системе по меньшей мере одним гетероатомом, выбранным из N, S и O. «Гетеро» также относится к замене по меньшей мере одного атома углерода в ациклической системе. Гетерокольцевая система или гетероациклическая система может иметь, например, 1, 2 или 3 атома углерода, замененные гетероатомом.

В контексте данного документа термин «гетероарил» представляет собой стабильное моноциклическое или полициклическое кольцо, имеющее до 7 атомов в каждом кольце, где по меньшей мере одно кольцо является ароматическим и содержит от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Примеры гетероарильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, акридинил, карбазолил, циннолинил, хиноксалинил, пиразолил, индолил, бензотриазолил, фуранил, тиенил, бензотиенил, бензофуранил, бензимидазолонил, бензоксазолонил, хинолинил, изохинолинил, дигидроизоиндолонил, имидазопиридинил, изоиндолонил, индазолил, оксазолил, оксадиазолил, изоксазолил, индолил, пиразинил, пиридазинил, пиридинил, пиримидинил, пирролил, тетрагидрохинолин. Также подразумевается, что «гетероарил» включает N-оксидное производное любого азотсодержащего гетероарила. В случаях, когда гетероарильный заместитель является бициклическим, и одно кольцо является

неароматическим или не содержит гетероатомов, следует исходить из того, что присоединение происходит по ароматическому кольцу или по кольцу, содержащему гетероатом. Гетероарильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любом положении, которое допускается нормальной валентностью.

В контексте настоящего документа термин «гетероцикл», «гетероциклический» или «гетероциклил» означает 3-14-членный ароматический или неароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, включая полициклические группы. В контексте настоящего документа термин «гетероциклический» также считается синонимом терминов «гетероцикл» и «гетероциклил», и подразумевается, что он также имеет те же определения, которые изложены в настоящем документе. «Гетероциклил» включает вышеупомянутые гетероарилы, а также их дигидро- и тетрагидро-аналоги. Примеры гетероциклильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, азетидинил, бензоимидазолил, бензофуранил, бензофуразанил, бензопиразолил, бензотриазолил, бензотиофенил, бензоксазолил, карбазолил, карболинил, циннолинил, фуранил, имидазолил, индолинил, индолил, индолазинил, индазолил, изобензофуранил, изоиндолил, изохинолил, изотиазолил, изоксазолил, нафтиридинил, оксадиазолил, оксооксазолидинил, оксазолил, оксазолин, оксопиперазинил, оксопирролидинил, оксоморфолинил, изоксазолин, оксетанил, пиранил, пиразинил, пиразолил, пиридазинил, пиридопиридинил, пиридазинил, пиридил, пиридинонил, пиримидил, пиримидинонил, пирролил, хиназолинил, хинолил, хиноксалинил, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил, тетрагидротииопиранил, тетрагидроизохинолинил, тетразолил, тетразолопиридил, тиadiaзолил, тиазолил, тиенил, триазолил, 1,4-диоксанил, гексагидроазепинил, пиперазинил, пиперидинил, пиридин-2-онил, пирролидинил, морфолинил, тиоморфолинил, дигидробензоимидазолил, дигидробензофуранил, дигидробензотиофенил, дигидробензоксазолил, дигидрофуранил, дигидроимидазолил, дигидроиндолил, дигидроизооксазолил, дигидроизотиазолил, дигидрооксадиазолил, дигидрооксазолил, дигидропиразинил, дигидропиразолил, дигидропиридинил, дигидропиримидинил, дигидропирролил, дигидрохинолинил, дигидротетразолил, дигидротиадиазолил, дигидротиазолил, дигидротииенил, дигидротриазолил, дигидроазетидинил, диоксидотиоморфолинил, метилendioксибензоил, тетрагидрофуранил и тетрагидротииенил, и их N-оксиды. Присоединение гетероциклильного заместителя может происходить по атому углерода или по гетероатому. Гетероциклильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пента-замещенными в любом положении, которое допускается нормальной валентностью.

Термин «гетероциклоалкил» относится к циклоалкильному остатку, в котором от одного до четырех атомов углерода заменены гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Примеры гетероциклов, радикалы которых представляют собой гетероциклильные группы, включают тетрагидропиран, морфолин, пирролидин, пиперидин, тиазолидин, оксазол, оксазолин, изоксазол, диоксан, тетрагидрофуран и т. п.

Термин «гетероарил» относится к ароматической 5-8-членной моноциклической, 8-

12-членной бициклической или 11-14-членной трициклической кольцевой системе, имеющей 1-3 гетероатома, если она является моноциклической, 1-6 гетероатомов, если она является бициклической, или 1-9 гетероатомов, если она является трициклической, при этом указанные гетероатомы выбраны из O, N или S (например, атомы углерода и 1-3, 1-6 или 1-9 гетероатомов N, O или S, если она является моноциклической, бициклической или трициклической, соответственно), где 0, 1, 2, 3 или 4 атома каждого кольца могут быть замещены заместителем. Примеры гетероарильных групп включают пиридил, фурил или фуранил, имидазолил, бензимидазолил, пиримидинил, тиофенил или тиенил, хинолинил, индолил, тиазолил и т. п. Термин «гетероарилалкил» или термин «гетероаралкил» относится к алкилу, замещенному гетероарилом. Термин «гетероарилалкокси» относится к алкокси, замещенному гетероарилом.

Термин «циклоалкил» в контексте настоящего документа включает насыщенные и частично ненасыщенные циклические углеводородные группы, имеющие от 3 до 12 атомов углерода, например, от 3 до 8 атомов углерода и, например, от 3 до 6 атомов углерода, где циклоалкильная группа дополнительно может быть необязательно замещена. Циклоалкильные группы включают, не ограничиваясь перечисленным, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил и циклооктил.

Термин «ацил» относится к заместителю, представляющему собой алкилкарбонил, циклоалкилкарбонил, арилкарбонил, гетероциклилкарбонил или гетероарилкарбонил, любой из которых может быть дополнительно замещен заместителями.

В контексте настоящего документа «кето» относится к любой алкильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, циклоалкенильной, гетероциклильной, гетероарильной или арильной группе, как определено в настоящем документе, присоединенной через карбонильный мостик.

Примеры кетогрупп включают, не ограничиваясь перечисленным, алканоил (например, ацетил, пропионил, бутаноил, пентаноил, гексаноил), алкеноил (например, акрилоил), алкиноил (например, этиноил, пропиноил, бутиноил, пентиноил, гексиноил), арилоил (например, бензоил), гетероарилоил (например, пирролоил, имидазолил, хинолиноил, пиридилоил).

В контексте настоящего документа «алкоксикарбонил» относится к любой алкоксигруппе, как определено выше, присоединенной через карбонильный мостик (т. е. -C(O)O-алкил). Примеры алкоксикарбонильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, метоксикарбонил, этоксикарбонил, изопропоксикарбонил, н-пропоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил или н-пентоксикарбонил.

В контексте настоящего документа «арилоксикарбонил» относится к любой арильной группе, как определено в настоящем документе, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т. е. -C(O)O-арил). Примеры арилоксикарбонильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, феноксикарбонил и нафтилоксикарбонил.

В контексте настоящего документа «гетероарилоксикарбонил» относится к любой

гетероарильной группе, как определено в настоящем документе, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т. е.  $-C(O)O$ -гетероарил). Примеры гетероарилоксикарбонильных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, 2-пиридилоксикарбонил, 2-оксазолилоксикарбонил, 4-тиазолилоксикарбонил или пиримидинилоксикарбонил.

Термин «оксо» относится к атому кислорода, который образует карбонил при присоединении к углероду, N-оксид при присоединении к азоту и сульфоксид или сульфон при присоединении к сере.

Специалист в данной области техники без труда поймет, что соединения и композиции, раскрытые в настоящем документе, могут содержать определенные атомы (например, атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии в зависимости от среды, в которую помещено соединение или композиция. Соответственно, в контексте настоящего документа структуры, раскрытые в настоящем документе, предусматривают, что определенные функциональные группы, такие как, например, OH, SH или NH, могут быть протонированными или депротонированными. Подразумевается, что настоящее изобретение охватывает раскрытые соединения и композиции независимо от состояния их протонирования на основании pH окружающей среды, как будет ясно специалисту в данной области техники.

## **II. Агенты на основе иРНК**

В настоящем документе описаны агенты на основе иРНК, которые модулируют (например, ингибируют) экспрессию CA2.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК активирует экспрессию CA2 в клетке или организме млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии CA2 в клетке или в организме субъекта (например, в организме млекопитающего, например, в организме человека), где дцРНК содержит антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере части мРНК, образованной при экспрессии CA2, и где область комплементарности имеет длину 30 нуклеотидов или менее, обычно длину 19-24 нуклеотида, и где дцРНК, при контакте с клеткой, экспрессирующей CA2, ингибирует экспрессию CA2, например, на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, или 50% по сравнению с аналогичной клеткой, не приведенной в контакт с агентом на основе РНКи или агентом на основе РНКи, не комплементарным гену CA2.

Модуляция (например, ингибирование) экспрессии CA2 может быть проанализирована, например, методом на основе ПЦР или разветвленной ДНК (bDNA), или методом на основе белка, таким как вестерн-блоттинг. Экспрессия CA2 в клеточной культуре, такой как клетки COS, клетки ARPE-19, клетки hTERT RPE-1, клетки RPE-J, клетки HeLa, первичные гепатоциты, клетки HepG2, первичные культивируемые клетки, или в биологическом образце, полученном от субъекта, может быть проанализирована путем измерения уровней мРНК CA2, например, с помощью анализа bDNA или TaqMan,

или путем измерения уровней белка, например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа, с применением, например, методик вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

дцРНК обычно содержит две цепи РНК, которые являются достаточно комплементарными для гибридизации с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет использоваться дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) обычно содержит область комплементарности, которая является по существу комплементарной или полностью комплементарной последовательности-мишени, полученной из последовательности мРНК, образованной во время экспрессии СА2. Другая цепь (смысловая цепь) обычно содержит область, которая является комплементарной антисмысловой цепи, так что две цепи гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как правило, дуплексная структура имеет длину от 15 до 30 включительно, чаще от 18 до 25 включительно, еще чаще от 19 до 24 включительно и чаще всего от 19 до 21 пар оснований включительно. Аналогичным образом, область комплементарности последовательности-мишени имеет длину от 15 до 30 включительно, чаще от 18 до 25 включительно, еще чаще от 19 до 24 включительно и чаще всего от 19 до 21 нуклеотида включительно.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет длину от 15 до 20 нуклеотидов включительно, а в других вариантах осуществления дцРНК имеет длину от 25 до 30 нуклеотидов включительно. Как будет ясно обычному специалисту в данной области техники, целевая область РНК, выступающая мишенью для расщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях «часть» мишени мРНК представляет собой непрерывную последовательность мРНК-мишени длиной, достаточной для того, чтобы быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т. е. расщепления по пути RISC). дцРНК, имеющие дуплексы длиной всего лишь 9 пар оснований, могут в некоторых случаях опосредовать РНКи-направленное расщепление РНК. Чаще всего мишень будет иметь длину по меньшей мере 15 нуклеотидов, например, длину 15-30 нуклеотидов.

Специалисту в данной области техники также будет ясно, что дуплексная область представляет собой первичную функциональную часть дцРНК, например, дуплексную область из 9-36, например, 15-30 пар оснований. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в той степени, в которой она подвергается процессингу в функциональный дуплекс из, например, 15-30 пар оснований, нацеленный на требуемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющих дуплексную область, превышающую 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, специалисту в данной области техники будет ясно, что в некоторых вариантах осуществления микроРНК представляет собой дцРНК. В некоторых вариантах осуществления дцРНК не представляет собой встречающуюся в природе микроРНК. В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК, пригодный для целенаправленного воздействия на экспрессию СА2, не образуется в клетке-мишени путем расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, описанная в настоящем документе, может дополнительно содержать один

или более одноцепочечных нуклеотидных выступающих концов. дцРНК может быть синтезирована стандартными способами, известными из уровня техники, как дополнительно обсуждается ниже, например, с применением автоматизированного синтезатора ДНК, такого как коммерчески доступный, например, от Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

В некоторых вариантах осуществления СА2 представляет собой СА2 человека.

В конкретных вариантах осуществления дцРНК содержит смысловую цепь, которая содержит или состоит из смысловой последовательности, выбранной из смысловых последовательностей, представленных в таблицах 3-10, и антисмысловую цепь, которая содержит или состоит из антисмысловой последовательности, выбранной из антисмысловых последовательностей, представленных в таблицах 3-10.

В некоторых аспектах дцРНК будет включать по меньшей мере смысловую и антисмысловую нуклеотидные последовательности, при этом смысловая цепь выбрана из последовательностей, представленных в таблицах 3-10, и соответствующая антисмысловая цепь выбрана из последовательностей, представленных в таблицах 3-10.

В этих аспектах одна из этих двух последовательностей комплементарна другой из этих двух последовательностей, при этом одна из этих последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, генерируемой при экспрессии СА2. Таким образом, дцРНК будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь, а второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь. Как описано в других местах настоящего документа и известно из уровня техники, комплементарные последовательности дцРНК также могут содержаться в качестве самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не находиться на отдельных олигонуклеотидах.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, что дцРНК, имеющие дуплексную структуру из от 20 до 23, но, в частности, 21, пары оснований, были признаны особенно эффективными в индукции РНК-интерференции (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Однако другие исследователи обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными.

В вариантах осуществления, описанных выше, благодаря природе последовательностей олигонуклеотидов, представленных в таблицах 3-10, дцРНК, описанные в настоящем документе, могут включать по меньшей мере одну цепь длиной не менее 19 нуклеотидов. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие одну из последовательностей из таблиц 3-10 за вычетом лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, будут аналогичным образом эффективны по сравнению с дцРНК, описанными выше.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет частичную последовательность из по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из одной из последовательностей из таблиц 3-10.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет антисмысловую

последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 смежных нуклеотидов антисмысловой последовательности, представленной в таблицах 3-10, и смысловую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 смежных нуклеотидов соответствующей смысловой последовательности, представленной в таблицах 3-10.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит антисмысловую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 смежных нуклеотида антисмысловой последовательности, представленной в таблицах 3-10, и смысловую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 смежных нуклеотид соответствующей смысловой последовательности, представленной в таблицах 3-10.

В некоторых таких вариантах осуществления дцРНК, хотя она содержит только часть последовательностей, представленных в таблицах 3-10, является в равной степени эффективной в отношении ингибирования уровня экспрессии СА2, как и дцРНК, которая содержит полноразмерные последовательности, представленные в таблицах 3-10. В некоторых вариантах осуществления дцРНК отличается по ингибированию уровня экспрессии СА2 на не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% по сравнению с дцРНК, содержащей полную последовательность, раскрытую в настоящем документе.

иРНК из таблиц 3-10 были сконструированы на основе последовательности СА2 человека. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что последовательность СА2 является достаточно консервативной у разных видов, так что определенные иРНК, сконструированные на основе последовательности человека, обладают активностью в отношении СА2 от приматов, таких как яванский макак, и других видов, включая, например, мышь, крысу и кролика.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления иРНК из таблиц 3-10 снижает уровни белка СА2 или мРНК СА2 в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку грызуна (например, клетку крысы) или клетку примата (например, клетку яванского макака или клетку человека). В некоторых вариантах осуществления уровни белка СА2 или мРНК СА2 снижаются на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%. В некоторых вариантах осуществления иРНК из таблиц 3-10, которая ингибирует СА2 в клетке человека, имеет менее 5, 4, 3, 2 или 1 ошибки спаривания с соответствующей частью СА2 человека. В некоторых вариантах осуществления иРНК из таблиц 3-10, которая ингибирует СА2 в клетке человека, не имеет ошибок спаривания с соответствующей частью СА2 человека.

иРНК, сконструированные на основе последовательностей грызунов, могут быть применимы, например, для ингибирования СА2 в клетках человека, например, для терапевтических целей, или для ингибирования СА2 в клетках грызунов, например, для исследования, характеризующего СА2 в модели на грызунах.

В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, содержит антисмысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с

0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, содержит смысловую цепь, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0 или 1, 2 или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1. мРНК СА2 человека может иметь последовательность SEQ ID NO: 1, представленную в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в таблицах 3-10, и необязательно может быть связана с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, смежной с выбранной последовательностью в СА2.

Хотя длина последовательности-мишени, как правило, составляет 15-30 нуклеотидов, пригодность конкретных последовательностей в этом диапазоне для управления расщеплением любой отдельно взятой РНК-мишени широко изменчива. Различные пакеты программного обеспечения и рекомендации, изложенные в настоящем документе, обеспечивают руководство для идентификации оптимальных последовательностей-мишеней для любой заданной геномной мишени, но также можно применять эмпирический подход, при котором «окно» или «маску» заданного размера (в качестве неограничивающего примера, 21 нуклеотид) буквально или условно (включая, например, *in silico*) помещают на последовательность РНК-мишень для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить в качестве последовательностей-мишеней. Посредством постепенного перемещения «окна» последовательности на один нуклеотид выше или ниже исходного местоположения последовательности-мишени можно идентифицировать следующую потенциальную последовательность-мишень до тех пор, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для любого выбранного заданного размера мишени. Данный процесс в сочетании с системным синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с применением анализов, описанных в настоящем документе или известных из уровня техники) для идентификации тех последовательностей, которые работают оптимально, может позволить идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании на них агента на основе иРНК опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии гена-мишени. Таким образом, предполагается, что дальнейшая оптимизация эффективности ингибирования может быть достигнута путем постепенного «прохождения окна» на один нуклеотид выше или ниже заданных последовательностей для идентификации последовательностей с равными или лучшими характеристиками ингибирования.

Кроме того, предполагается, что для любой идентифицированной последовательности, например, в таблицах 3-10, дальнейшая оптимизация может быть достигнута путем систематического либо добавления, либо удаления нуклеотидов для получения более длинных или более коротких последовательностей и тестирования их и

последовательностей, полученных путем прохождения окна с более длинным или более коротким размером вверх или вниз РНК-мишени от этой точки. Как и в предыдущем случае, сочетание этого подхода с получением новых мишеней-кандидатов с тестированием эффективности иРНК на основе этих последовательностей-мишеней в анализе ингибирования, известном из уровня техники или описанном в настоящем документе, может привести к дополнительным улучшениям эффективности ингибирования. Кроме того, такие оптимизированные последовательности могут быть скорректированы посредством, например, введения модифицированных нуклеотидов, описанных в настоящем документе или известных из уровня техники, добавления или изменений в выступающем конце, или других модификаций, известных из уровня техники и/или обсуждаемых в настоящем документе, для дополнительной оптимизации молекулы (например, повышения стабильности в сыворотке крови или периода полужизни в кровотоке, повышения термической стабильности, улучшения трансмембранной доставки, нацеливания на определенное местоположение или тип клетки, увеличения взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, повышения высвобождения из эндосом и т. д.) в качестве ингибитора экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложена иРНК из любой из таблиц 3-10, которая является немодифицированной или неконъюгированной. В некоторых вариантах осуществления агент на основе РНК и согласно изобретению имеет нуклеотидную последовательность, представленную в любой из таблиц 3-10, но не содержит один или более лигандов или фрагментов, представленных в таблицах. Лиганд или фрагмент (например, липофильный лиганд или фрагмент) могут быть включены в любое из положений, предусмотренных в настоящей заявке.

иРНК, описанная в настоящем документе, может содержать одну или более ошибок спаривания с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, содержит не более 3 ошибок спаривания. В некоторых вариантах осуществления, если антисмысловая цепь иРНК содержит ошибки спаривания с последовательностью-мишенью, область ошибок спаривания не расположена в центре области комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, если антисмысловая цепь иРНК содержит ошибки спаривания с последовательностью-мишенью, расположение ошибок спаривания ограничено в пределах последних 5 нуклеотидов либо с 5'-конца, либо с 3'-конца области комплементарности. Например, для цепи РНК агента на основе иРНК из 23 нуклеотидов, которая комплементарна области CA2, цепь РНК обычно не содержит никаких ошибок спаривания в центральных 13 нуклеотидах. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные из уровня техники, можно применять для определения того, является ли иРНК, содержащая ошибку спаривания с последовательностью-мишенью, эффективной в отношении ингибирования экспрессии CA2. Например, в Jackson *et al.* (*Nat. Biotechnol.* 2003;21: 635-637) описано исследование профиля экспрессии, в котором экспрессия небольшого набора генов, идентичных последовательности миРНК MAPK14 только по 12-18 нуклеотидам смысловой

цепи, была подавлена с кинетикой, аналогичной MAPK14. Аналогичным образом, Lin *et al.*, (*Nucleic Acids Res.* 2005; 33(14): 4527-4535) с применением кПЦР и репортерных анализов показали, что 7-нуклеотидная комплементарность между миРНК и мишенью является достаточной для обеспечения деградации мРНК мишени. Учет эффективности иРНК с ошибками спаривания в отношении ингибирования экспрессии CA2 является важным, особенно если известно, что определенная область комплементарности в гене CA2 характеризуется полиморфной вариацией последовательности в пределах популяции.

РНК-мишень может иметь области или промежутки нуклеотидной последовательности РНК-мишени, которые являются относительно более восприимчивыми или поддающимися, чем другие области РНК-мишени, опосредованному расщеплению РНК-мишени посредством РНК-интерференции, индуцированной связыванием агентом на основе РНК с этой областью. Повышенная восприимчивость к РНК-интерференции в таких «областях «горячих точек»» (или просто «горячих точках») означает, что агенты на основе иРНК, нацеленные на такую область, вероятно, будут иметь более высокую эффективность в отношении индукции иРНК-интерференции, чем агенты на основе иРНК, которые нацелены на другие области РНК-мишени. Например, не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что доступность целевой области РНК-мишени может влиять на эффективность агентов на основе иРНК, которые нацелены на эту область, при этом некоторые области «горячих точек» имеют повышенную доступность. Вторичные структуры, например, которые образуются в РНК-мишени (например, в пределах или вблизи областей «горячих точек»), могут влиять на способность агента на основе иРНК связывать целевую область и индуцировать РНК-интерференцию.

В соответствии с отдельными аспектами настоящего изобретения агент на основе иРНК может быть сконструирован для нацеливания на область «горячей точки» любой из РНК-мишеней, описанных в настоящем документе, включая любые идентифицированные части РНК-мишени (например, конкретный экзон). В контексте настоящего документа область «горячей точки» может относиться к области из 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 нуклеотидов в последовательности РНК-мишени, для которой нацеливание с применением агентов на основе РНК обеспечивает заметно более высокую вероятность эффективного сайленсинга по сравнению с нацеливанием на другие области этой же РНК-мишени. В соответствии с отдельными аспектами настоящего изобретения область «горячей точки» может составлять ограниченную область РНК-мишени и, в некоторых случаях, существенно ограниченную область мишени, включая, например, менее половины длины РНК-мишени, например, приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25% или 30% длины РНК-мишени. И наоборот, другие области, с которыми сравнивают «горячую точку», могут в совокупности составлять по меньшей мере большую часть длины РНК-мишени. Например, другие области могут в совокупности составлять по меньшей мере приблизительно 60%, или по меньшей мере приблизительно 70%, или по меньшей мере приблизительно 80%, или по меньшей мере приблизительно 90%, или по

меньшей мере приблизительно 95% длины РНК-мишени.

Можно эмпирически оценить сравнение областей РНК-мишени для идентификации «горячих точек» с использованием данных по эффективности, полученных в скрининговых анализах *in vitro* или *in vivo*. Например, агенты на основе РНКи, нацеленные на различные области, которые охватывают РНК-мишень, могут быть сравнены по частоте эффективных агентов на основе иРНК (например, величине, на которую ингибируется экспрессия гена-мишени, например, измеренной по экспрессии мРНК или экспрессии белка), которые связывают каждую область. В целом, «горячая точка» может быть распознана при наблюдении группирования нескольких эффективных агентов на основе РНКи, которые связываются с ограниченной областью РНК-мишени. «Горячая точка» может быть в достаточной степени охарактеризована как таковая путем наблюдения эффективности агентов на основе иРНК, которые в совокупности охватывают по меньшей мере приблизительно 60% целевой области, идентифицированной как «горячая точка», как, например, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90% или приблизительно 95%, или более длины указанной области, включая оба конца области (т. е. по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 90% или 95%, или более нуклеотидов в пределах области, включая нуклеотиды на каждом конце области, выступали мишенью для агента на основе иРНК). В соответствии с некоторыми аспектами настоящего изобретения агент на основе иРНК, который демонстрирует по меньшей мере приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% ингибирование в пределах указанной области (например, не более приблизительно 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% или 5% оставшейся мРНК), может быть идентифицирован как эффективный.

Способность областей РНК выступать в качестве мишени также может быть оценена с использованием 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 значительно выше, чем среднее значение средних значений для всех оцененных областей. В соответствии с некоторыми аспектами средний уровень ингибирования в области «горячей точки» может быть по меньшей мере приблизительно на 10%, 20%, 30%, 40% или 50% выше среднего значения средних значений. В соответствии с некоторыми аспектами средний уровень ингибирования в области «горячей точки» может быть на по меньшей мере приблизительно 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 значения средних значений. 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 указанной области может быть по существу выше, чем среднее значение всех измерений ингибирования во всех измеренных областях. Например, каждое измерение ингибирования в области «горячей точки» может быть на по меньшей мере приблизительно 10%, 20%, 30%, 40% или 50% выше среднего значения всех измерений ингибирования. В соответствии с некоторыми аспектами каждое измерение ингибирования может быть на по меньшей мере приблизительно 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 значения всех измерений ингибирования. Каждое измерение ингибирования может быть выше на статистически значимую (например,  $p < 0,05$ ) величину, чем среднее значение всех измерений ингибирования. Стандарт для оценки «горячей точки» может включать различные комбинации вышеуказанных стандартов, если они совместимы (например, средний уровень ингибирования по меньшей мере приблизительно на первую величину и отсутствие измерений ингибирования ниже порогового уровня второй величины, которая меньше первой величины).

Таким образом, явным образом предусматривается, что любой агент на основе иРНК, включая конкретные иллюстративные агенты на основе иРНК, описанные в настоящем документе, которые нацелены на область «горячей точки» РНК-мишени, может быть предпочтительно выбран для индукции РНК-интерференции мРНК-мишени, поскольку нацеливание на такую область «горячей точки», вероятно, будет обеспечивать сильный ингибирующий ответ по сравнению с нацеливанием на область, которая не является областью «горячей точки». Агенты на основе РНКи, нацеленные на последовательности-мишени, которые по существу перекрываются с (например, на по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% длины последовательности-мишени) или предпочтительно находятся полностью в пределах области «горячей точки», можно рассматривать как нацеленные на область «горячей точки». Области «горячей точки» РНК-мишени (мишеней) согласно настоящему изобретению могут включать любую область, для которой данные, раскрытые в настоящем документе, демонстрируют более высокую частоту нацеливания эффективными агентами на основе РНКи, в том числе с помощью любого из стандартов, описанных в других местах настоящего документа, независимо от того, указан ли явным образом диапазон (диапазоны) такой области (областей) «горячей точки».

В различных вариантах осуществления агент на основе дцРНК согласно настоящему изобретению нацелен на область «горячей точки» мРНК, кодирующей СА2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один конец дцРНК имеет одноцепочечный нуклеотидный выступающий конец из от 1 до 4, как правило, 1 или 2 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дцРНК, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступающий конец, обладают лучшими ингибирующими свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. В некоторых вариантах осуществления РНК в составе иРНК (например, дцРНК) химически модифицирована для повышения стабильности или других полезных характеристик. Нуклеиновые кислоты, представленные

в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными в данной области техники, такими 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 настоящим включен в настоящий документ посредством ссылки. Модификации включают: например, (а) концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи, и т. д.), 3'-концевые модификации (конъюгацию, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи, и т. д.), (b) модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые спариваются с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями), или конъюгированные основания, (с) модификации сахара (например, в положении 2' или положении 4', или имеющие ациклический сахар) или замену сахара, а также (d) модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений РНК, применимых в настоящем изобретении, включают, не ограничиваясь перечисленным, РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природных межнуклеозидных связей. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают, среди прочего, РНК, которые не содержат атом фосфора в остове. Для целей настоящего описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, которые не содержат атом фосфора в своем межнуклеозидном остове, также можно считать олигонуклеозидами. В частных вариантах осуществления модифицированная РНК будет содержать атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги и имеющие инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных звеньев связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, в которых раскрыто получение вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают, не ограничиваясь перечисленным, 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, 6 239265, 6277603, 6326199, 6346614, 6444423, 6531590, 6534639, 6608035, 6683167, 6858715, 6867294, 6878805, 7015315, 7041816, 7273933, 7321029; и патент США RE39464, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат в себе 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. Они включают остовы с морфолиновыми связями (образованные частично из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетил- и тиоформацетильные остовы; метиленформацетил- и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленимино- и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смешанные N, O, S и CH<sub>2</sub>-компоненты.

Иллюстративные патенты США, в которых раскрыто получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают, не ограничиваясь перечисленным, 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, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

В других миметиках РНК, подходящих или предусмотренных для применения в иРНК, как сахар, так и межнуклеозидная связь, т. е. остов, нуклеотидных звеньев заменены альтернативными группами. Звенья азотистых оснований сохраняют для гибридизации с соответствующим соединением-мишенью нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидсодержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Азотистые основания сохраняются и непосредственно или опосредованно связываются с атомами азота азогрупп амидной части остова. Иллюстративные патенты США, в которых раскрыто получение соединений PNA, включают, не ограничиваясь перечисленным, патенты США № 5539082, 5714331 и 5719262, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Дополнительное описание соединений PNA приведено, например, в Nielsen *et al.*, Science, 1991, 254, 1497-1500.

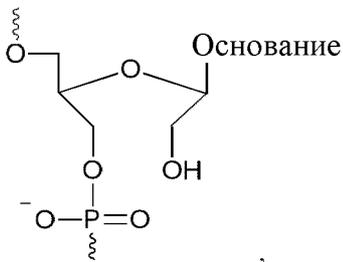
Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности, --CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>--[известный как метиленовый (метилямино) или MMI-остов], --CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- и --N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>-- из вышеупомянутого патента США № 5489677, и амидные остовы из вышеупомянутого патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в настоящем документе, имеют морфолиновые структуры остовов из вышеупомянутого патента США № 5034506. Нативный фосфодиэфирный остов может быть представлен как -O-P(O)(OH)-OCH<sub>2</sub>-.

Модифицированные РНК также могут содержать один или более замещенных сахарных фрагментов. иРНК, например, дцРНК, представленные в настоящем документе, могут включать одно из следующего в положении 2': OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилом или C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> и O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, где n и m равны от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления дцРНК включают одно из следующего в положении 2': C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> низший алкил, замещенный низший алкил, алкиларил, арилалкил, O-алкиларил или O-арилалкил, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, гетероциклоалкил, гетероциклоалкиларил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силил, группа, расщепляющая РНК, репортерная группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств иРНК или группа для улучшения фармакодинамических свойств иРНК, и другие заместители, характеризующиеся схожими свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) т. е. алкоксиалкоксигруппу. Другая иллюстративная модификация представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, т. е. группу O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, также известную как 2'-DMAOE, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известную из уровня техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т. е. 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

В других вариантах осуществления агент на основе иРНК содержит один или более (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) ациклических нуклеотидов (или нуклеозидов). В отдельных вариантах осуществления смысловая цепь или антисмысловая цепь, или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь, содержат менее пяти ациклических нуклеотидов на цепь (например, четыре, три, два или один ациклический нуклеотид на цепь). Один или более ациклических нуклеотидов могут содержаться, например, в двухцепочечной области смысловой или антисмысловой цепи или обеих цепей; на 5'-конце, 3'-конце, как на 5'-, так и 3'-конце смысловой или антисмысловой цепи или обеих цепей агента на основе иРНК. В некоторых вариантах осуществления один или более ациклических нуклеотидов присутствуют в положениях 1-8 смысловой или антисмысловой цепи, или обеих из них. В некоторых вариантах осуществления один или более ациклических нуклеотидов находятся в антисмысловой цепи в положениях 4-10 (например, положениях 6-8) с 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления один или более ациклических нуклеотидов находятся в одном или обоих 3'-концевых выступающих концах агента на основе иРНК.

В контексте настоящего документа термин «ациклический нуклеотид» или «ациклический нуклеозид» относится к любому нуклеотиду или нуклеозиду, содержащему ациклический сахар, например, ациклическую рибозу. Иллюстративный ациклический

нуклеотид или нуклеозид может включать азотистое основание, например, встречающееся в природе или модифицированное азотистое основание (например, азотистое основание, описанное в настоящем документе). В отдельных вариантах осуществления связь между любым из атомов углерода рибозы (C1, C2, C3, C4 или C5) независимо или в комбинации отсутствует в нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления связь между C2-C3 атомами углерода в рибозном кольце отсутствует, например, представляет собой ациклический 2'-3'-секонуклеотидный мономер. В других вариантах осуществления связь между C1-C2, C3-C4 или C4-C5 отсутствует (например, 1'-2', 3'-4' или 4'-5'-секонуклеотидный мономер). Иллюстративные ациклические нуклеотиды раскрыты в US 8314227, включенном в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Например, ациклический нуклеотид может включать любой из мономеров D-J на фигурах 1-2 US 8314227. В некоторых вариантах осуществления ациклический нуклеотид включает следующий мономер:



где Основание представляет собой азотистое основание, например, встречающееся в природе или модифицированное азотистое основание (например, азотистое основание, описанное в настоящем документе).

В отдельных вариантах осуществления ациклический нуклеотид может быть модифицирован или дериватизирован, например, путем связывания ациклического нуклеотида с другим фрагментом, например, среди прочего, лигандом (например, GalNAc, холестеринным лигандом), алкилом, полиамином, сахаром, полипептидом.

В других вариантах осуществления агент на основе иРНК включает один или более ациклических нуклеотидов и один или более LNA (например, LNA, описанный в настоящем документе). Например, один или более ациклических нуклеотидов и/или один или более LNA могут присутствовать в смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих из них. Количество ациклических нуклеотидов в одной цепи может быть таким же или отличаться от количества LNA в противоположной цепи. В отдельных вариантах осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь содержат менее пяти LNA (например, четыре, три, два или один LNA), расположенных в двухцепочечной области или 3'-выступающем конце. В других вариантах осуществления один или два LNA расположены в двухцепочечной области или 3'-выступающем конце смысловой цепи. В качестве альтернативы или в комбинации смысловая цепь и/или антисмысловая цепь содержит менее пяти ациклических нуклеотидов (например, четыре, три, два или один ациклический нуклеотид) в двухцепочечной области или 3'-выступающем конце. В некоторых вариантах



ed. John Wiley & Sons, 1990, раскрытые в Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613, и раскрытые в Sanghvi, Y. S., глава 15, *dsRNA Research and Applications*, стр. 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих модифицированных азотистых оснований особенно подходят для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6 замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замены 5-метилцитозином повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты 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, стр. 276-278) и представляют собой иллюстративные замены оснований, в частности, при объединении с 2'-О-метоксиэтильными модификациями сахара.

Иллюстративные патенты США, в которых раскрыто получение некоторых из указанных выше модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований, включают, не ограничиваясь перечисленным, вышеупомянутый патент США № 3687808, а также патенты США № 4845205, 5130302, 5134066, 5175273, 5367066, 5432272, 5457187, 5459255, 5484908, 5502177, 5525711, 5552540, 5587469, 5594121 5596091, 5614617, 5681941, 6015886, 6147200, 6166197, 6222025, 6235887, 6380368, 6528640, 6639062, 6617438, 7045610, 7427672 и 7495088, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки, и патент США № 5750692, также включенный в настоящий документ посредством ссылки.

РНК в составе иРНК также может быть модифицирована таким образом, чтобы она содержала один или более (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) бициклических сахарных фрагментов. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное мостиковым соединением двух атомов. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент, содержащий мостик, соединяющий два атома углерода в сахарном кольце, тем самым образуя бициклическую кольцевую систему. В отдельных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления агент согласно настоящему изобретению может содержать одну или более замкнутых нуклеиновых кислот (LNA) (также называемых в настоящем документе «замкнутыми нуклеотидами»). В некоторых вариантах осуществления замкнутая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированный фрагмент рибозы, в котором фрагмент рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий, например, 2'- и 4'-атомы углерода. Эта структура эффективно «запирает» рибозу в 3'-эндоструктурной конформации. Было показано, что добавление замкнутых нуклеиновых кислот к миРНК повышает стабильность миРНК в сыворотке крови, повышает термическую стабильность 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, не ограничиваясь перечисленным, нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В отдельных вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотидные агенты согласно настоящему изобретению включают один или более бициклических нуклеозидов, содержащих 4'-2'-мостик. Примеры таких бициклических нуклеозидов с 4'-2'-мостиками включают, не ограничиваясь перечисленным, 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (также называемый «конформационно ограниченным этилом» или «сEt») и 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' (и их аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, публикацию заявки на патент США № 2004/0171570); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (см., например, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Содержание каждого из приведенных выше источников включено в настоящий документ посредством ссылки в отношении приведенных в них способов. Иллюстративные патенты США, в которых описано получение замкнутых нуклеиновых кислот, включают, не ограничиваясь перечисленным, следующие: патенты США № 6268490, 6670461, 6794499, 6998484, 7053207, 7084125, 7399845 и 8314227, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Иллюстративные LNA включают, не ограничиваясь перечисленным, 2',4'-C-метиленбициклонуклеотид (см., например, Wengel *et al.*, публикации международных заявок PCT WO 00/66604 и WO 99/14226).

Любой из вышеупомянутых бициклических нуклеозидов может быть получен в одной или более стереохимических конфигурациях сахара, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

Агент на основе РНКи согласно настоящему изобретению также может быть модифицирован таким образом, чтобы он включал один или более конформационно ограниченных этилом нуклеотидов. В контексте настоящего документа термин «конформационно ограниченный этилом нуклеотид» или «сEt» представляет собой замкнутую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклический сахарный фрагмент, содержащий 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2'-мостик. В некоторых вариантах осуществления конформационно ограниченный этилом нуклеотид находится в S-конформации, называемой в настоящем документе «S-cEt».

Агент на основе РНКи согласно настоящему изобретению может также включать один или более «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим атомы углерода C2' и C4' рибозы или атомы углерода C3 и -C5' рибозы. CRN запирает рибозное кольцо в стабильной конформации и повышает аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину для размещения кислорода в оптимальном положении для

стабильности и аффинности, что приводит к меньшему отклонению от плоскости рибозного кольца.

Иллюстративные публикации, в которых описано получение некоторых из вышеуказанных CRN, включают, не ограничиваясь перечисленным, US 2013/0190383 и WO 2013/036868, содержание каждой из которых настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки в отношении приведенных в них способов.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе РНК согласно настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (незамкнутая нуклеиновая кислота). UNA представляет собой незамкнутую ациклическую нуклеиновую кислоту, где любая из связей сахара была удалена с образованием незамкнутого остатка «сахара». В одном примере UNA также охватывает мономер с удаленными связями между C1'-C4' (т. е. ковалентной углерод-кислород-углеродной связью между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере C2'-C3'-связь (т. е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') сахара была удалена (см. *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039).

Иллюстративные публикации США, в которых раскрыто получение UNA, включают, не ограничиваясь перечисленным, US8314227 и публикации заявок на патент США № 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, содержание каждой из которых настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки в отношении приведенных в них способов.

Агент на основе РНК согласно настоящему изобретению может также включать одну или более «циклогексеновых нуклеиновых кислот» или («CeNA»). CeNA представляют собой аналоги нуклеотидов с заменой фуранозного фрагмента ДНК циклогексеновым кольцом. Включение циклогексенилнуклеозидов в цепь ДНК повышает стабильность гибрида ДНК/РНК. CeNA является стабильным против деградации в сыворотке крови, и гибрид CeNA/РНК способен активировать РНКазу *N. E. Coli*, что приводит к расщеплению цепи РНК (см. Wang et al., *Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 36, 8595-8602, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

В других вариантах осуществления агенты на основе иРНК включают один или более (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) нуклеотидов G-зажима (G-clamp). Нуклеотид G-зажима представляет собой модифицированный аналог цитозина, в котором модификации придают способность к образованию водородной связи как с плоскостями Уотсона-Крика, так и с плоскостями Хугстена комплементарного гуанина в дуплексе, см., например, Lin and Matteucci, 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 8531-8532. Одна замена аналогом G-зажима в олигонуклеотиде может привести к существенно повышенной термической стабильности спирали и дифференцировке ошибок спаривания при гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами. Включение таких нуклеотидов в молекулы иРНК может привести к повышению аффинности и специфичности в отношении нуклеиновых кислот-мишеней, комплементарных последовательностей или матричных

цепей.

Потенциально стабилизирующие модификации концов 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, инвертированное основание dT(idT) и другие. Эта модификация раскрыта в публикации заявки РСТ WO 2011/005861.

Другие модификации агента на основе РНКи согласно настоящему изобретению включают 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата на антисмысловой цепи агента на основе РНКи. Подходящие миметики фосфата раскрыты, например, в US 2012/0157511, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в отношении приведенных в ней способов. В одном из вариантов осуществления двухцепочечный агент на основе РНКи согласно настоящему изобретению дополнительно содержит 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата при 5'-нуклеотиде антисмысловой цепи. В другом варианте осуществления двухцепочечный агент на основе РНКи дополнительно содержит миметик 5'-фосфата при 5'-нуклеотиде антисмысловой цепи. В конкретном варианте осуществления миметик 5'-фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (5'-VP). В одном из вариантов осуществления миметик фосфата представляет собой 5'-циклопропилфосфонат (VP). В некоторых вариантах осуществления 5'-конец антисмысловой цепи двухцепочечного агента на основе иРНК не содержит 5'-винилфосфоната (VP).

В одном из вариантов осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метилмодифицированного нуклеотида, 2'-фтормодифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), например, Ggn, Cgn, Tgn или Agn, нуклеотида с 2'-фосфатом, например, G2p, C2p, A2p или U2p, и винилфосфонатного нуклеотида; и их комбинаций. В других вариантах осуществления каждый из дуплексов из таблиц 5, 6, 8 и 10 может быть, в частности, модифицирован с получением другого двухцепочечного агента на основе иРНК согласно настоящему изобретению. В одном примере 3'-конец каждого смыслового дуплекса может быть модифицирован путем удаления 3'-концевого лиганда L96 и замены двух фосфодиэфирных межнауклеотидных связей между тремя 3'-концевыми нуклеотидами фосфоротиоатными межнауклеотидными связями. То есть, три 3'-концевых нуклеотида (N) смысловой последовательности формулы:

$$5' - N1 - \dots - Nn - 2Nn - 1NnL96 \ 3'$$

могут быть заменены

$$5' - N1 - \dots - Nn - 2sNn - 1sNn \ 3'$$

То есть, например, AD-1559459, смысловая последовательность:

**asgsaucgGfuGfCfCfгаииссугcuL96**

может быть заменена

asgsaucgGfuGfCfCfGauuccugscsu,

а антисмысловая последовательность остается неизменной, с получением другого двухцепочечного агента на основе иРНК согласно настоящему изобретению.

### III. Мотивы иРНК

В отдельных аспектах настоящего изобретения двухцепочечные агенты на основе РНКи согласно настоящему изобретению включают агенты с химическими модификациями, раскрытыми, например, в WO 2013/075035, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в отношении приведенных в ней способов. Как показано в настоящем документе и в WO 2013/075035, превосходный результат может быть достигнут путем введения одного или более мотивов трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь или антисмысловую цепь агента на основе РНКи, в частности, в сайте расщепления или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь агента на основе РНКи в противном случае могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает характер модификации смысловой или антисмысловой цепи, если он присутствует. Агент на основе РНКи может быть необязательно конъюгирован с липофильным фрагментом или лигандом, например, фрагментом или лигандом C16, например, на смысловой цепи. Агент на основе РНКи может быть необязательно модифицирован модификацией (S)-гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA), например, по одному или более остаткам антисмысловой цепи. Полученные агенты на основе РНКи обладают превосходной активностью в отношении сайленсинга генов.

В некоторых вариантах осуществления последовательность смысловой цепи может быть представлена формулой (I):



где:

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

каждый из  $r$  и  $q$  независимо равен 0-6;

каждый Na независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два различным образом модифицированных нуклеотида;

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

каждый из  $nr$  и  $nq$  независимо представляет собой нуклеотид выступающего конца; где Nb и Y не имеют одной и той же модификации; и

каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. В некоторых вариантах осуществления весь YYY представляет собой 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления Na и/или Nb содержат модификации чередующегося характера.

В некоторых вариантах осуществления мотив YYY присутствует в сайте расщепления смысловой цепи или вблизи него. Например, если агент на основе РНКи имеет дуплексную область длиной 17-23 нуклеотида, мотив YYY может присутствовать в сайте расщепления или вблизи него (например, может присутствовать в положениях 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой цепи, причем отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца; или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области с 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления  $i$  равен 1 и  $j$  равен 0, или  $i$  равен 0 и  $j$  равен 1, или как  $i$ , так и  $j$  равны 1. Следовательно, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

5' n<sub>p</sub>-Na-YYY-Nb-ZZZ-Na-n<sub>q</sub> 3' (Ib);

5' n<sub>p</sub>-Na-XXX-Nb-YYY-Na-n<sub>q</sub> 3' (Ic); или

5' n<sub>p</sub>-Na-XXX-Nb-YYY-Nb-ZZZ-Na-n<sub>q</sub> 3' (Id).

Если смысловая цепь представлена формулой (Ib), Nb представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если смысловая цепь представлена формулой (Ic), Nb представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Если смысловая цепь представлена формулой (Id), каждый Nb независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления Nb равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый Na 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 отличаться друг от друга.

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

5' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>-YYY- N<sub>a</sub>-n<sub>q</sub> 3' (Ia).

Если смысловая цепь представлена формулой (Ia), каждый N<sub>a</sub> независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления последовательность антисмысловой цепи РНКи может быть представлена формулой (Ie):

5' n<sub>q</sub>'-N<sub>a</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(X'X'X')<sub>l</sub>-N'<sub>a</sub>-n<sub>p</sub>' 3' (Ie)

где:

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

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

каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два различными образом 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 выступающего конца;

где  $N_b'$  и  $Y'$  не имеют одной и той же модификации; и

и

каждый из  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$  и  $Z'Z'Z'$  независимо представляет собой одну из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах.

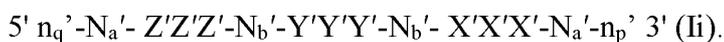
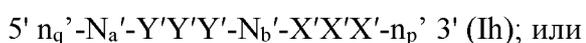
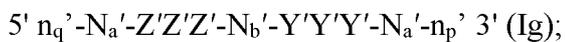
В некоторых вариантах осуществления  $N_a'$  и/или  $N_b'$  содержат модификацию чередующегося характера.

Мотив  $Y'Y'Y'$  присутствует в сайте расщепления антисмысловой цепи или вблизи него. Например, если агент на основе РНК имеет дуплексную область длиной 17-23 нуклеотида, мотив  $Y'Y'Y'$  может присутствовать в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, причем отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца; или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области с 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления мотив  $Y'Y'Y'$  присутствует в положениях 11, 12, 13.

В некоторых вариантах осуществления весь мотив  $Y'Y'Y'$  представляет собой 2'-О-те-модифицированные нуклеотиды.

В одном из вариантов осуществления  $k$  равен 1 и  $l$  равен 0, или  $k$  равен 0 и  $l$  равен 1, или как  $k$ , так и  $l$  равны 1.

Следовательно, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

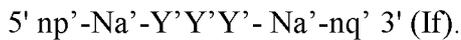


Если антисмысловая цепь представлена формулой (IgIb),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или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

Если антисмысловая цепь представлена формулой (Ii), каждый  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 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. В некоторых вариантах осуществления Nb равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления k равен 0 и l равен 0, и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:



Если антисмысловая цепь представлена формулой (If), каждый Na' 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 отличаться друг от друга.

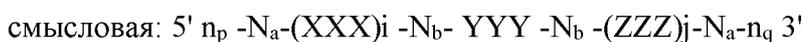
Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован с помощью LNA, HNA, CeNA, GNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-гидроксила или 2'-фтора. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Каждый X, Y, Z, X', Y' и Z', в частности, может представлять собой 2'-О-метильную модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе РНКи может содержать мотив YYY, присутствующий в положениях цепи 9, 10 и 11, когда дуплексная область составляет 21 нуклеотид, причем отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца; или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области с 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в виде выступающих модификаций на противоположном конце дуплексной области; и каждый из XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив Y'Y'Y', присутствующий в положениях 11, 12, 13 цепи, причем отсчет начинается с 1-го нуклеотида с 5'-конца; или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в 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 виде выступающих модификаций на противоположном конце дуплексной области; и каждый из X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая цепь, представленная любой из вышеуказанных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой цепью, представленной любой из формул (If), (Ig), (Ih) и (Ii) соответственно.

Соответственно, отдельные агенты на основе 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 и дуплекс РНКи представлен формулой (Ij):



где:

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

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

каждый  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два различным образом модифицированных нуклеотида;

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

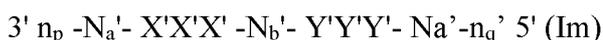
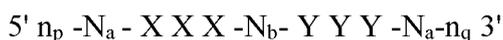
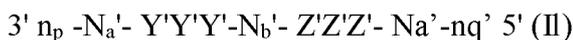
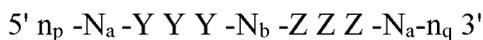
где:

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

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

В некоторых вариантах осуществления  $i$  равен 0 и  $j$  равен 0; или  $i$  равен 1 и  $j$  равен 0; или  $i$  равен 0 и  $j$  равен 1; или как  $i$ , так и  $j$  равны 0; или как  $i$ , так и  $j$  равны 1. В некоторых вариантах осуществления  $k$  равен 0 и  $l$  равен 0; или  $k$  равен 1 и  $l$  равен 0;  $k$  равен 0 и  $l$  равен 1; или как  $k$ , так и  $l$  равны 0; или как  $k$ , так и  $l$  равны 1.

Иллюстративные комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующие дуплекс РНКи, включают формулы ниже:



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

Если агент на основе РНКи представлен формулой (II), 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 на основе РНКи представлен формулой (Im), каждый  $N_b, N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 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 на основе РНКи представлен формулой (In), каждый  $N_b, N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 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 из  $N_a, N_a', N_b$  и  $N_b'$  независимо содержит модификации чередующегося характера.

Каждый из X, Y и Z в формулах (Ij), (Ik), (Il), (Im) и (In) может быть одинаковым или отличаться друг от друга.

Если агент на основе РНКи представлен формулой (Ij), (Ik), (Il), (Im) и (In), по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. В качестве альтернативы, по меньшей мере два нуклеотида Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три нуклеотида Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

Если агент на основе РНКи представлен формулой (Il) или (In), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. В качестве альтернативы, по меньшей мере два нуклеотида Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три нуклеотида Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

Если агент на основе РНКи представлен формулой (Im) или (In), по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. В качестве альтернативы, по меньшей мере два нуклеотида X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три нуклеотида X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

В некоторых вариантах осуществления модификация нуклеотида Y отличается от модификации нуклеотида Y', модификация нуклеотида Z отличается от модификации нуклеотида Z', и/или модификация нуклеотида X отличается от модификации нуклеотида X'.

В некоторых вариантах осуществления, если агент на основе РНКи представлен формулой (IId), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метильные или 2'-фтор-модификации. В некоторых вариантах осуществления, если агент на основе РНКи представлен формулой (In), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метильные или 2'-фтор-модификации, и  $pr' > 0$ , и по меньшей мере один  $pr'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи. В некоторых вариантах осуществления, если агент на основе РНКи представлен формулой (In), модификации  $N_a$  представляют собой 2'-О-метильные или 2'-фтор-модификации,  $pr' > 0$  и по меньшей мере один  $pr'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более фрагментами или лигандами (например, одним или более липофильными фрагментами, необязательно одним или более фрагментами C16 или одним или более фрагментами GalNAc), присоединенными посредством двухвалентного или

трехвалентного разветвленного линкера. В некоторых вариантах осуществления, если агент на основе РНКи представлен формулой (In), модификации Na представляют собой 2'-О-метильные или 2'-фтор-модификации,  $nr' > 0$  и по меньшей мере один  $nr'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более фрагментами или лигандами (например, одним или более липофильными фрагментами, необязательно одним или более фрагментами C16 или одним или более фрагментами GalNAc), присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления, если агент на основе РНКи представлен формулой (Ik), модификации Na представляют собой 2'-О-метильные или 2'-фтор-модификации,  $nr' > 0$  и по меньшей мере один  $nr'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфоротиоатной связи, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более фрагментами или лигандами (например, одним или более липофильными фрагментами, необязательно одним или более фрагментами C16 или одним или более фрагментами GalNAc), присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе РНКи представляет собой мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленные формулой (Ij), (Ik), (Il), (Im) и (In), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или два разных гена; или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген по двум разным сайтам-мишеням.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе РНКи представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (Ij), (Ik), (Il), (Im) и (In), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или два разных гена; или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген по двум разным сайтам-мишеням.

В некоторых вариантах осуществления два агента на основе РНКи, представленные формулой (Ij), (Ik), (Il), (Im) и (In), связаны друг с другом на 5'-конце, и одним или обоим из 3'-концов, и необязательно конъюгированы с лигандом. Каждый из агентов может быть нацелен на один и тот же ген или два разных гена; или каждый из агентов может быть нацелен на один и тот же ген по двум разным сайтам-мишеням.

В различных публикациях описаны мультимерные агенты на основе 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, содержание каждого из которых настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки в отношении приведенных в них способов. В отдельных вариантах осуществления агенты на основе РНКи согласно настоящему изобретению могут включать лиганды GalNAc.

Как более подробно описано ниже, агент на основе РНКи, который содержит конъюгации одного или более углеводных фрагментов с агентом на основе РНКи, может улучшить одно или более свойств агента на основе РНКи. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице агента на основе РНКи. Например, рибозный сахар одной или более рибонуклеотидных субъединиц агента на основе дцРНК может быть заменен другим фрагментом, например, неуглеводным (например, циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называется в настоящем документе субъединицей модификации замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую кольцевую систему, т. е. все атомы в кольце представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т. е. один или более атомов в кольце 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», например, две «точки присоединения к остову» и (ii) по меньшей мере одну «точку присоединения связи». В контексте настоящего документа «точка присоединения к остову» относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или в целом связи, доступной и подходящей для включения носителя в остов, например, например, содержащий фосфат или модифицированный фосфат, например, серу, остов рибонуклеиновой кислоты. Термин «точка присоединения связи» (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к атому, входящему в состав кольца циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), который присоединяет выбранный фрагмент. Фрагмент может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранный фрагмент соединен промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто будет содержать функциональную группу, например, аминогруппу, или в целом обеспечивать связь, которая подходит для включения или связывания другого химического объекта, например, лиганда, с составляющим носитель кольцом.

Агенты на основе РНКи могут быть конъюгированы с лигандом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую

группу. Циклическая группа может быть выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина. Ациклическая группа может представлять собой сериоловый остов или диэтаноламиновый остов.

В отдельных конкретных вариантах осуществления агент на основе РНКи для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой агент, выбранной из группы агентов, перечисленных в любой из таблиц 3-10. Эти агенты могут дополнительно содержать лиганд. Лиганд может быть присоединен к смысловой цепи, антисмысловой цепи или обоим цепям на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах. Например, лиганд может быть конъюгирован со смысловой цепью, в частности, 3'-концом смысловой цепи.

#### **IV. Конъюгаты иРНК**

Агенты на основе иРНК, раскрытые в настоящем документе, могут иметь форму конъюгатов. Конъюгат может быть присоединен в любом подходящем месте молекулы иРНК, например, на 3'-конце или 5'-конце смысловой или антисмысловой цепи. Конъюгаты необязательно присоединены посредством линкера.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК, описанный в настоящем документе, химически связан с одним или более лигандами, фрагментами или конъюгатами, которые могут придавать функциональность, например, путем воздействия (например, усиления) на активность, клеточное распределение или клеточное поглощение иРНК. Такие фрагменты включают, не ограничиваясь перечисленным, 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), 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 ундецильные 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, ди-гексадецил-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), полиаминовую или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973) или адамантан-уксусную кислоту (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), или октадециламиновый или гексиламино-карбонилхолестеринный фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

В некоторых вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни агента на основе иРНК, в который он включен. В некоторых

вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например, компартмента клетки или органа, ткани, органа или области организма, как, например, по сравнению с соединением, в котором отсутствует такой лиганд. Типичные лиганды не будут участвовать в спаривании дуплексов 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 малеиновой кислоты, сополимер 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. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметик-полиамин, дендример полиамина, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфилин, четвертичную соль полиамина или  $\alpha$ -спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, агент, нацеленный на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка глаза. 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.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), поперечно-сшивающие агенты (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеил)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, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, облегчающие транспорт/абсорбцию (например, аспирин, витамин E, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, акридин-имидазольные конъюгаты,  $\text{Eu}^{3+}$  комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфичной аффинностью к колиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка глаза. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные соединения, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лиганд может представлять собой вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение агента на основе иРНК клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например, путем разрушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джасплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления 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 белок агенты, полиэтиленгликоль (PEG), витамины и т. д. Иллюстративные модуляторы ФК включают, не ограничиваясь перечисленным, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин E, биотин и т. д. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат ряд фосфоротиоатных связей, связываются с сывороточным белком, таким образом, также в рамках настоящего изобретения в качестве лигандов (например, модулирующих ФК лигандов) пригодны короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько фосфоротиоатных связей в остове. Кроме того, также для применения в качестве модулирующих ФК лигандов в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, пригодны аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, сывороточные белки).

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды согласно изобретению могут быть

синтезированы с использованием олигонуклеотида, который содержит боковую реакционноспособную функциональную группу, такую как группа, полученная путем присоединения линкерной молекулы к олигонуклеотиду (как описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может вступать в реакцию непосредственно с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы так, чтобы они содержали любую из множества защитных групп, или лигандами, которые содержат присоединенный к ним линкерный фрагмент.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах согласно настоящему изобретению, могут быть удобным и обычным способом получены с помощью хорошо известной технологии твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems (Фостер-Сити, Калифорния). Дополнительно или в качестве альтернативы можно использовать любые другие средства для такого синтеза, известные из уровня техники. Также известно применение аналогичных методик для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандом олигонуклеотидах и молекуле лиганда, содержащей связанные с ней специфичные к последовательности нуклеозиды согласно настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с использованием стандартных нуклеотидных или нуклеозидных предшественников, или предшественников нуклеотидных или нуклеозидных конъюгатов, которые уже содержат линкерный фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотид или нуклеозид-конъюгат, которые уже содержат молекулу лиганда, или ненуклеозидных содержащих лиганд структурных элементов.

При использовании предшественников нуклеотид-конъюгат, которые уже содержат линкерный фрагмент, как правило, осуществляют синтез специфичных к последовательности связанных нуклеозидов, а затем молекулу лиганда подвергают реакции с линкерным фрагментом с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды согласно настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с использованием фосфорамидитов, происходящих из конъюгатов лиганд-нуклеозид в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые являются коммерчески доступными и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

#### *А. Липофильные фрагменты*

В отдельных вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой алифатический, циклический, такой как алициклический, или полициклический, такой как полиалициклическое соединение, такое как стероид (например, стерол), или линейный или разветвленный алифатический углеводород. Липофильный фрагмент может, как правило, содержать углеводородную цепь, которая может быть циклической или ациклической. Углеводородная цепь может содержать различные заместители или один или более гетероатомов, таких как атом кислорода или азота. Такие липофильные алифатические

фрагменты включают, не ограничиваясь перечисленным, насыщенный или ненасыщенный C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub> углеводород (например, C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> углеводород), насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты, воски (например, сложные эфиры одноатомных спиртов и жирных кислот и диамиды жирных кислот), терпены (например, C<sub>10</sub> терпены, C<sub>15</sub> сесквитерпены, C<sub>20</sub> дитерпены, C<sub>30</sub> тритерпены и C<sub>40</sub> тетратерпены) и другие полиалициклические углеводороды. Например, липофильный фрагмент может содержать C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub> углеводородную цепь (например, C<sub>4</sub>-C<sub>30</sub> алкил или алкенил). В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> углеводородную цепь (например, линейный C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> алкил или алкенил). В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C<sub>16</sub> углеводородную цепь (например, линейный C<sub>16</sub> алкил или алкенил).

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> кислоту (например, гексановую кислоту, гептановую кислоту, октановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту, ундекановую кислоту, додекановую кислоту, тридекановую кислоту, тетрадекановую кислоту, пентадекановую кислоту, гексадекановую кислоту, гептадекановую кислоту, октадекановую кислоту, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, арахидоновую кислоту, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексаеновую кислоту, витамин А, витамин Е, холестерин и т. д.) или C<sub>6</sub>-C<sub>30</sub> спирт (например, гексанол, гептанол, октанол, нонанол, деканол, ундеканол, додеканол, тридеканол, тетрадеканол, пентадеканол, гексадеканол, гептадеканол, октадеканол, олеиловый спирт, линолеиловый спирт, арахидоновый спирт, цис-4,7,10,13,16,19-докозагексанол, ретинол, витамин Е, холестерин и т. д.).

Липофильный фрагмент может быть присоединен к агенту на основе РНКи любым способом, известным из уровня техники, в том числе посредством функциональной группы, уже присутствующей в липофильном фрагменте, или введенной в агент на основе РНКи, такой как гидроксигруппа (например, -CO-CH<sub>2</sub>-OH). Функциональные группы, уже присутствующие в липофильном фрагменте или введенные в агент на основе РНКи, включают, не ограничиваясь перечисленным, гидроксил, амин, карбоновую кислоту, сульфонат, фосфат, тиол, азид и алкин.

Конъюгация агента на основе РНКи и липофильного фрагмента может происходить, например, посредством образования простой эфирной, или карбоксильной, или карбамоиловой сложноэфирной связи между гидроксигруппой и алкильной группой R-, алканоильной группой RCO- или замещенной карбамоильной группой RNHCO-. Алкильная группа R может быть циклической (например, циклогексилом) или ациклической (например, неразветвленной или разветвленной; и насыщенной или ненасыщенной). Алкильная группа R может представлять собой бутильную, пентильную, гексильную, гептильную, октильную, нонильную, децильную, ундецильную, додецильную, тридецильную, тетрадецильную, пентадецильную, гексадецильную, гептадецильную или октадецильную группу, и т. п.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с

двухцепочечным агентом на основе РНКи посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-простой тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол, полученный реакцией азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат.

В другом варианте осуществления липофильный фрагмент представляет собой стероид, такой как стерол. Стероиды представляют собой полициклические соединения, содержащие пергидро-1,2-циклопентанофенантроновую кольцевую систему. Стероиды включают, не ограничиваясь перечисленным, желчные кислоты (например, холевую кислоту, дезоксихолевую кислоту и дегидрохолевую кислоту), кортизон, дигоксигенин, тестостерон, холестерин и катионные стероиды, такие как кортизон. «Производное холестерина» относится к соединению, полученному из холестерина, например, путем замены, добавления или удаления заместителей.

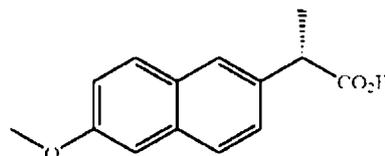
В другом варианте осуществления липофильный фрагмент представляет собой ароматический фрагмент. В данном контексте термин «ароматический» в широком смысле относится к моно- и полиароматическим углеводородам. Ароматические группы включают, не ограничиваясь перечисленным,  $C_6$ - $C_{14}$  арильные фрагменты, содержащие от одного до трех ароматических колец, которые могут быть необязательно замещенными; «аралкильные» или «арилалкильные» группы, содержащие арильную группу, ковалентно связанную с алкильной группой, каждая из которых может независимо быть необязательно замещенной или незамещенной; и «гетероарильные» группы. В контексте настоящего документа термин «гетероарил» относится к группам, содержащим от 5 до 14 атомов в кольце, предпочтительно от 5, 6, 9 или 10 атомов в кольце; содержащим 6, 10 или 14  $\pi$ -электронов, общих в циклической системе, и содержащим, помимо атомов углерода, от одного до приблизительно трех гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота (N), кислорода (O) и серы (S).

В контексте настоящего документа «замещенный» алкил, циклоалкил, арил, гетероарил или гетероциклическая группа представляет собой группу, имеющую от одного до приблизительно четырех, предпочтительно от одного до приблизительно трех, более предпочтительно один или два заместителя, отличные от водорода. Подходящие заместители включают, не ограничиваясь перечисленным, галоген, гидроксильный, нитро, галогеналкил, алкил, алкиларил, арил, арилалкил, алкокси, арилокси, амина, ациламино, алкилкарбамоил, арилкарбамоил, аминоалкил, алкоксикарбонил, карбокси, гидроксильный алкил, алкансульфонил, аренсульфонил, алкансульфонамидо, аренсульфонамидо, арилалкилсульфонамидо, алкилкарбонил, ацилокси, циано и уреидогруппы.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой арилалкильную группу, например, 2-арилпропаноильный фрагмент. Структурные признаки арилалкильной группы выбраны таким образом, чтобы липофильный фрагмент связывался с по меньшей мере одним белком *in vivo*. В отдельных вариантах осуществления структурные признаки арилалкильной группы выбраны таким образом, чтобы

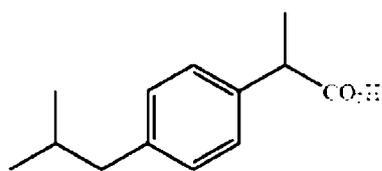
липофильный фрагмент связывался с сывороточными, сосудистыми или клеточными белками. В отдельных вариантах осуществления структурные признаки арилалкильной группы способствуют связыванию с альбумином, иммуноглобулином, липопротеином,  $\alpha$ -2-макроглобулином или  $\alpha$ -1-гликопротеином.

В отдельных вариантах осуществления лиганд представляет собой напроксен или структурное производное напроксена. Процедуры синтеза напроксена приведены в патенте США № 3904682 и патенте США № 4009197, которые настоящим включены посредством ссылки в полном объеме. Напроксен имеет химическое название (S)-6-метокси- $\alpha$ -метил-2-



нафталинуксусная кислота, и структура представляет собой

В отдельных вариантах осуществления лиганд представляет собой ибупрофен или структурное производное ибупрофена. Процедуры синтеза ибупрофена приведены в US3228831, который включен в настоящий документ посредством ссылки в отношении приведенных в нем способов. Структура ибупрофена представляет собой



Дополнительные иллюстративные арилалкильные группы проиллюстрированы в US 7626014, который включен в настоящий документ посредством ссылки в отношении приведенных в нем способов.

В другом варианте осуществления подходящие липофильные фрагменты включают липид, холестерин, ретиновую кислоту, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилксигексанола, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холеновую кислоту, ибупрофен, напроксен, диметокситритил или феноксазин.

В отдельных вариантах осуществления более одного липофильного фрагмента может быть включено в двухцепочечный агент на основе РНКи, в частности, если липофильный фрагмент характеризуется низкой липофильностью или гидрофобностью. В некоторых вариантах осуществления два или более липофильных фрагментов включены в одну и ту же цепь двухцепочечного агента на основе РНКи. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь двухцепочечного агента на основе РНКи содержит один или более включенных липофильных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления два или более липофильных фрагментов включены в одно и то же положение (т. е. в одно и то

же азотистое основание, один и тот же сахарный фрагмент или одну и ту же межнуклеозидную связь) двухцепочечного агента на основе РНКи. Это может быть достигнуто, например, конъюгацией двух или более липофильных фрагментов посредством носителя, или конъюгацией двух или более липофильных фрагментов посредством разветвленного линкера, или конъюгацией двух или более липофильных фрагментов посредством одного или более линкеров, при этом один или более линкеров связывают липофильные фрагменты последовательно.

Липофильный фрагмент может быть конъюгирован с агентом на основе РНКи посредством прямого присоединения к рибозному сахару агента на основе РНКи. В качестве альтернативы, липофильный фрагмент может быть конъюгирован с двухцепочечным агентом на основе РНКи посредством линкера или носителя.

В отдельных вариантах осуществления липофильный фрагмент может быть конъюгирован с агентом на основе РНКи посредством одного или более линкеров (связей).

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с двухцепочечным агентом на основе РНКи посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-простой тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол, полученный реакцией азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат.

#### *В. Конъюгаты с липидами*

В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида, как правило, может связывать сывороточный белок, такой как сывороточный альбумин человека (HSA). Связывающий HSA лиганд обеспечивает возможность сосудистого распределения конъюгата в ткань-мишень. Например, тканью-мишенью может быть глаз. Другие молекулы, которые могут связывать HSA, также могут быть использованы в качестве лигандов. Например, могут быть использованы напроксен или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость конъюгата к деградации, (b) повышать нацеливание или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану и/или (c) может использоваться для регулирования связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Лиганд на основе липида может быть использован для модуляции, например, контроля (например, ингибирования) связывания конъюгата с тканью-мишенью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липида, который связывается с HSA более сильно, будет менее подвержен нацеливанию на почку и, следовательно, менее подвержен выведению из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, который связывается с HSA менее сильно, может быть использован для нацеливания конъюгата на почку.

В некоторых вариантах осуществления лиганд на основе липида связывает HSA. Например, лиганд может связывать HSA с достаточной аффинностью, так что улучшается

распределение конъюгата в ткань, отличную от ткани почки. Однако аффинность, как правило, не настолько сильна, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

В некоторых вариантах осуществления лиганд на основе липида слабо связывает HSA или вообще не связывает HSA, так что улучшается распределение конъюгата к почке. Другие фрагменты, которые нацеливаются на клетки почек, также могут быть использованы вместо лиганда на основе липида или в дополнение к нему.

В другом аспекте лиганд представляет собой фрагмент, например, витамин, который поглощается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Они особенно подходят для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные 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).

### *С. Агенты, повышающие проникновение в клетки*

В другом аспекте лиганд представляет собой агент, повышающий проникновение в клетки, такой как агент со спиральной структурой, повышающий проникновение в клетки. В некоторых вариантах осуществления агент является амфипатическим. Иллюстративный агент представляет собой пептид, такой как tat или antennopedia. Если агент представляет собой пептид, он может быть модифицирован, включая пептидильный миметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Агент со спиральной структурой обычно представляет собой агент с  $\alpha$ -спиральной структурой и может иметь липофильную и липофобную фазы.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем документе олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную сворачиваться с образованием определенной трехмерной структуры, подобной природному пептиду. Присоединение пептида и пептидомиметиков к агентам на основе иРНК может повлиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, путем усиления распознавания и абсорбции клетками. Пептидный или пептидомиметический фрагмент может иметь длину приблизительно 5-50 аминокислот, например, длину приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, повышающий проникновение в клетки, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tug, Tgr или Phe). Пептидный фрагмент может представлять собой дендримерный пептид, конформационно ограниченный пептид или сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может содержать гидрофобную последовательность для переноса через мембрану (MTS). Иллюстративный гидрофобный MTS-содержащий пептид представляет собой RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 3). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAR

(SEQ ID NO: 4)), содержащий гидрофобный MTS, также может представлять собой нацеливающий фрагмент. Пептидный фрагмент может представлять собой пептид «доставки», который может переносить большие полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 5)) и белка *Drosophila Antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 6)) способны функционировать в качестве пептидов доставки. Пептид или пептидомиметик может 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, связанный с агентом на основе дцРНК посредством включенной мономерной единицы, представляет собой нацеленный на клетки пептид, такой как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Длина пептидного фрагмента может находиться в диапазоне от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, например, для повышения стабильности или обеспечения конформационных свойств. Может быть использована любая 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, для способствования нацеливанию на конкретную ткань (ткани). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические миметики RGD. Помимо RGD можно использовать другие фрагменты, нацеленные на лиганд интегрина. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты данного лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

Пептидный фрагмент RGD может быть использован для нацеливания на конкретный тип клеток, например, клетку глаза, 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 облегчать нацеливание агента на основе дцРНК на опухоли различных 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 на основе иРНК на глаз или почку. Пептид RGD может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован, для способствования нацеливанию на конкретные ткани. Например, гликозилированный пептид RGD может доставлять агент на основе иРНК в опухолевую клетку, экспрессирующую  $\alpha v \beta 3$  (Haubner *et al.*, *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001).

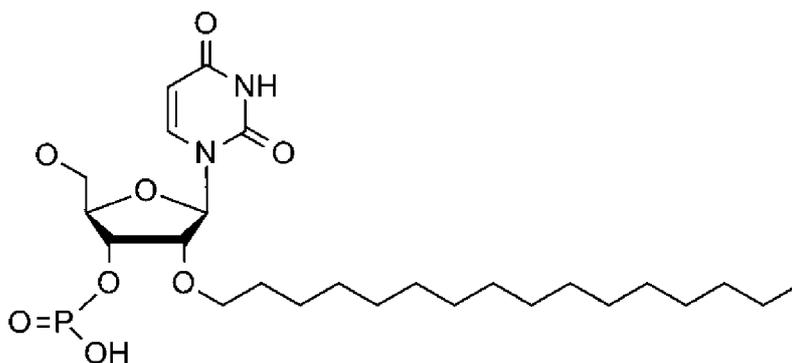
«Пептид, повышающий проникновение в клетки» способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная клетка или клетка гриба, или клетку млекопитающих, такую как клетка человека. Пептид, повышающий проникновение в

микробную клетку, может представлять собой, например,  $\alpha$ -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или цекропин P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например,  $\alpha$ -дефензин,  $\beta$ -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две доминирующих аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, повышающий проникновение в клетки, может также содержать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид, повышающий проникновение в клетки, может представлять собой амфипатический пептид из двух частей, такой как MPG, который получен из пептидного домена слияния gp41 ВИЧ-1 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 31:2717-2724, 2003).

#### *D. Конъюгаты с углеводами и углеводные лиганды*

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов согласно настоящему изобретению олигонуклеотид иРНК дополнительно содержит углевод. Конъюгированная с углеводом иРНК является предпочтительной для доставки нуклеиновых кислот *in vivo*, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, как описано в настоящем документе. В контексте настоящего документа «углевод» относится к соединению, которое представляет собой либо углевод как таковой, состоящий из одного или более моносахаридных звеньев, содержащих по меньшей мере 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим), где с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы; или соединению, содержащему в качестве его части углеводный 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), где с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы. Иллюстративные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают сахара C5 и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара, имеющие два или три моносахаридных звена (например, C5, C6, C7 или C8).

В отдельных вариантах осуществления композиции и способы согласно настоящему изобретению включают лиганд C16. В иллюстративных вариантах осуществления лиганд C16 согласно настоящему изобретению характеризуется следующей структурой (приведенной в настоящем документе ниже для основания урацила, однако присоединение лиганда C16 предусмотрено для нуклеотида, имеющего любое основание (C, G, A и т. д.) или обладающего любой другой модификацией, представленной в настоящем документе, при условии, что присоединение 2'-рибо сохраняется) и присоединен в положении 2'-рибо в остатке, который модифицирован таким образом:



Химическая формула:  $C_{25}H_{43}N_2O_8P$

Точная масса: 530,2757

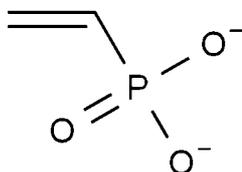
Молекулярная масса: 530,5913

Как показано выше, остаток, модифицированный лигандом С16, представляет собой неразветвленный алкил в положении 2'-рибо иллюстративного остатка (в данном случае урацила), который модифицирован таким образом.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат с углеводом агента на основе РНКи согласно настоящему изобретению дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, описанных выше, таких как, не ограничиваясь перечисленным, модулятор ФК или пептид, повышающий проникновение в клетки.

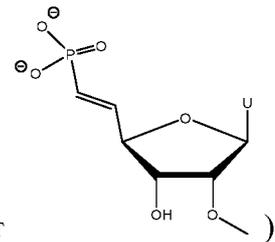
Дополнительные конъюгаты с углеводами (и линкеры), подходящие для применения в настоящем изобретении, включают конъюгаты, описанные в WO 2014/179620 и WO 2014/179627, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

В отдельных вариантах осуществления композиции и способы согласно настоящему изобретению включают винилфосфонатную (VP) модификацию агента на основе РНКи, как описано в настоящем документе. В иллюстративных вариантах осуществления винилфосфонат согласно настоящему изобретению имеет следующую структуру:



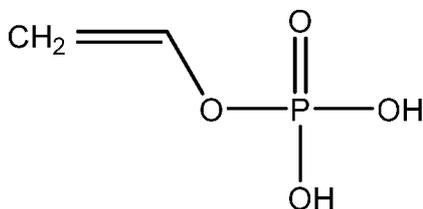
Винилфосфонат согласно настоящему изобретению может быть присоединен либо к антисмысловой, либо к смысловой цепи дцРНК согласно настоящему изобретению. В отдельных вариантах осуществления винилфосфонат согласно настоящему изобретению присоединен к антисмысловой цепи дцРНК, необязательно на 5'-конце антисмысловой цепи дцРНК. Агент на основе дцРНК может содержать фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой цепи или антисмысловой цепи. 5'-концевая фосфорсодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфоротиоат (5'-PS),

5'-концевой фосфородитиоат (5'-PS2), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат (MePhos) или 5'-дезоксид-5'-С-малонил. Если 5'-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-VP



может представлять собой изомер 5'-E-VP (т. е. транс-винилфосфонат) или изомер 5'-Z-VP (т. е. цис-винилфосфонат), либо их смеси.

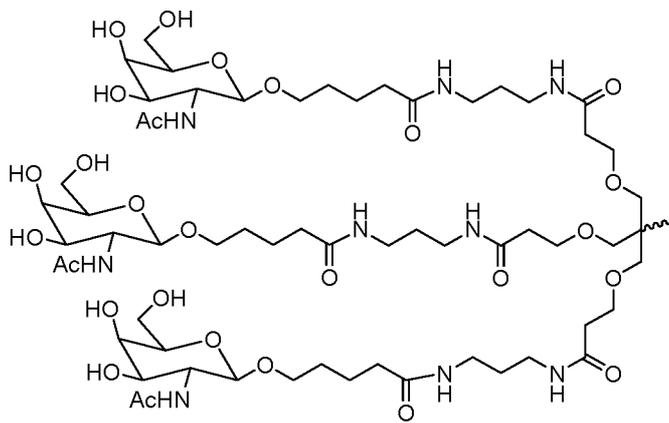
Винилфосфатные модификации также предусмотрены для композиций и способов согласно настоящему изобретению. Иллюстративная структура винилфосфата представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления конъюгат с углеводом содержит моносахарид. В некоторых вариантах осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Конъюгаты GalNAc, которые содержат одно или более производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), описаны, например, в патенте США № 8106022, содержание которого настоящим включено посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc служит в качестве лиганда, который нацеливает иРНК на конкретные клетки. В некоторых вариантах осуществления конъюгат GalNAc нацеливает иРНК на клетки печени, например, служа в качестве лиганда асиалогликопротеинового рецептора клеток печени (например, гепатоцитов).

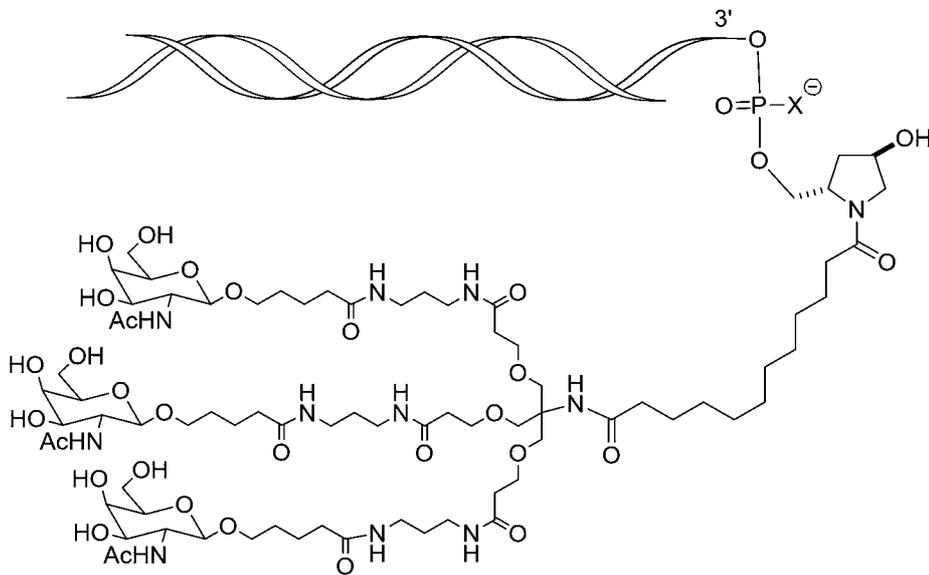
В некоторых вариантах осуществления конъюгат с углеводом содержит одно или более производных GalNAc. Производные GalNAc могут быть присоединены посредством линкера, например двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. В некоторых вариантах осуществления конъюгат с GalNAc конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления конъюгат с GalNAc конъюгирован с агентом на основе иРНК (например, с 3'-концом смысловой цепи) посредством линкера, например, линкера, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат с GalNAc представляет собой

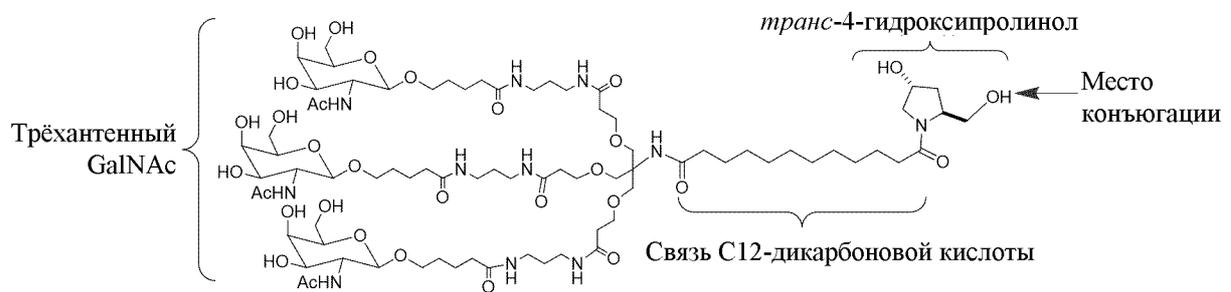


формула II.

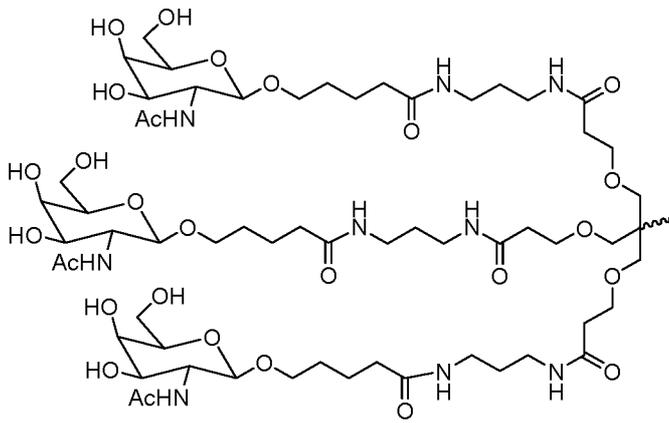
В некоторых вариантах осуществления агент на основе РНКи присоединен к конъюгату с углеводом посредством линкера, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S:



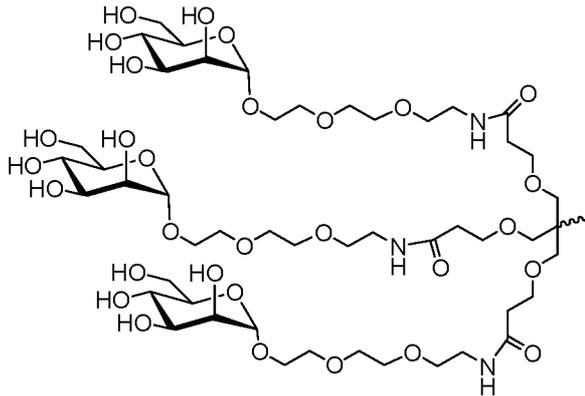
В некоторых вариантах осуществления агент на основе РНКи конъюгирован с L96, как определено в таблице 2 и показано ниже:



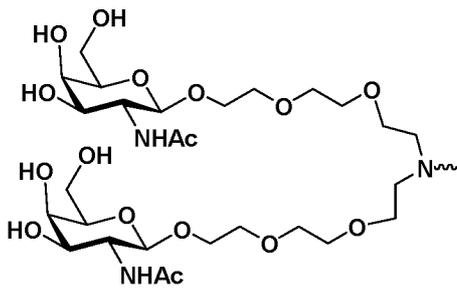
В некоторых вариантах осуществления конъюгат с углеводом для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из



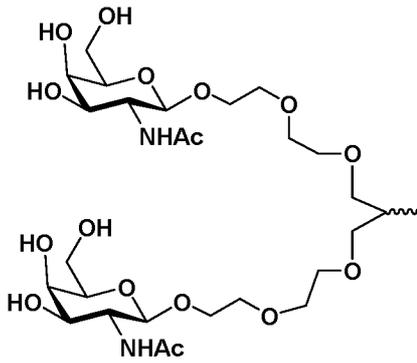
формулы II,



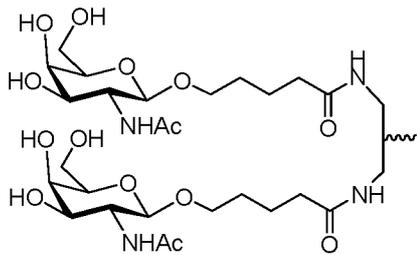
формулы III,



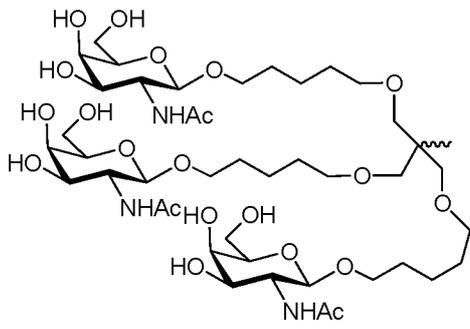
формулы IV,



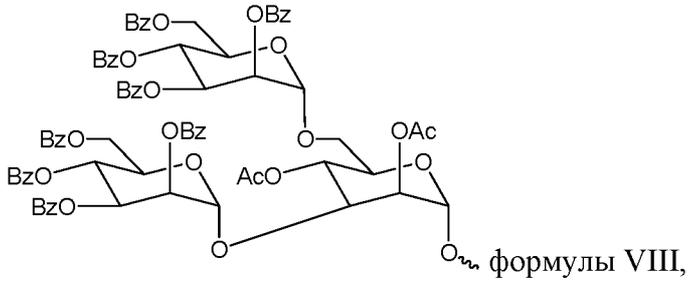
формулы V,



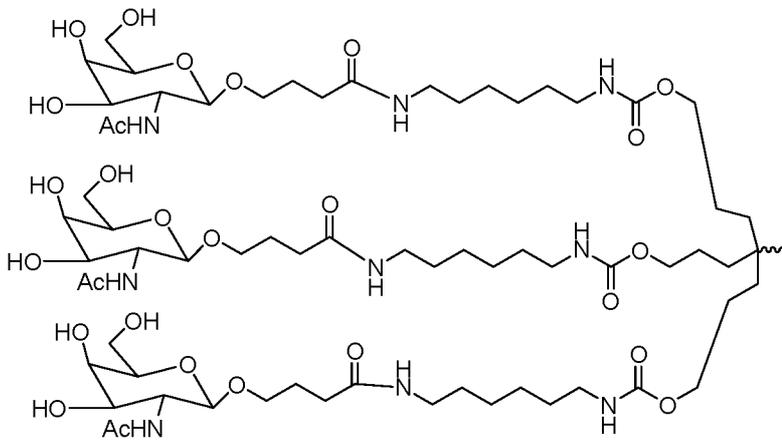
формулы VI,



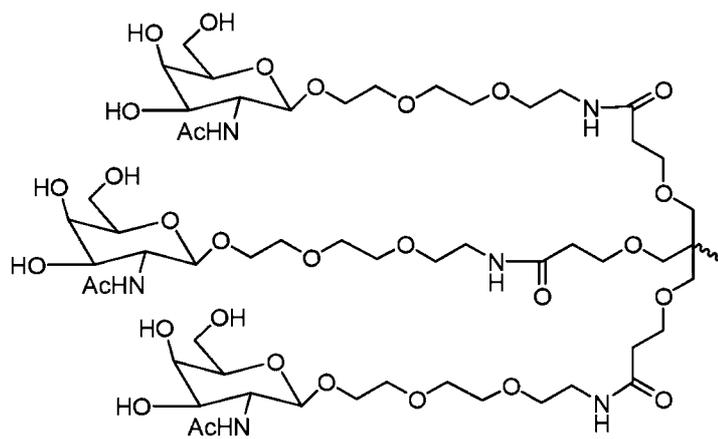
формулы VII,



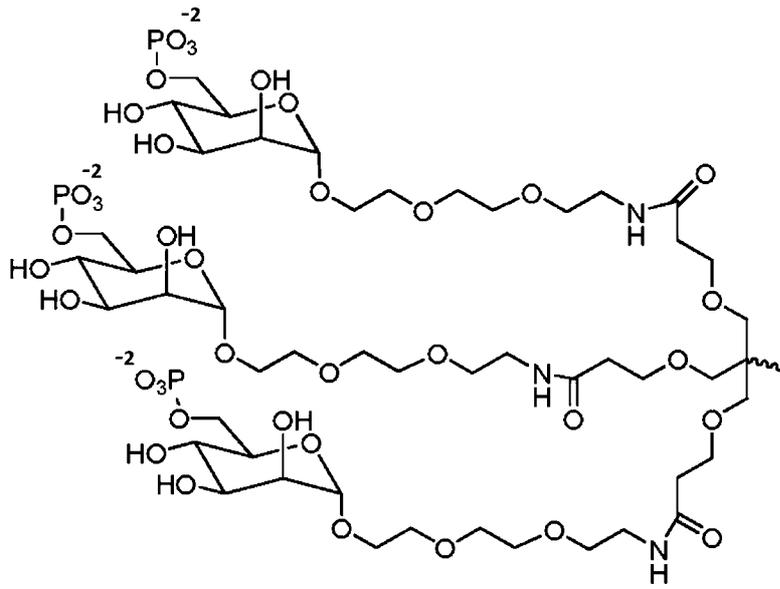
формулы VIII,



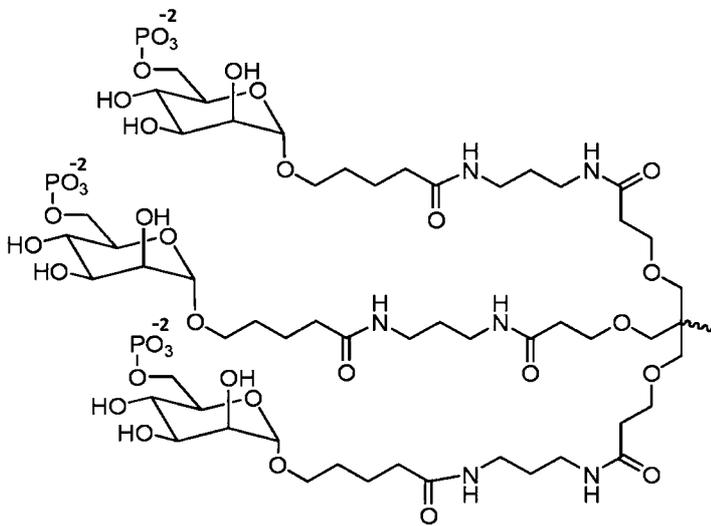
формулы IX,



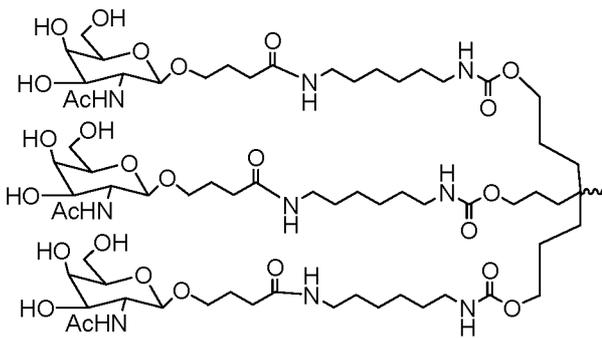
формулы X,



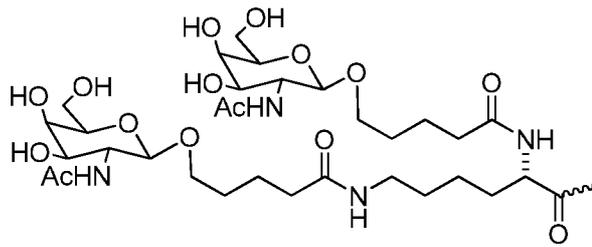
формулы XI,



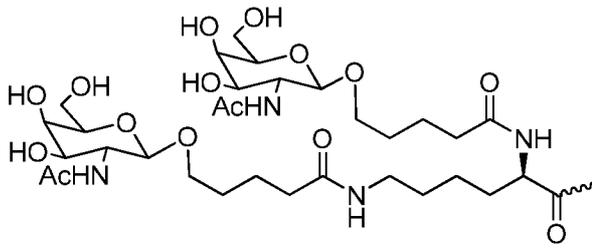
формулы XII,



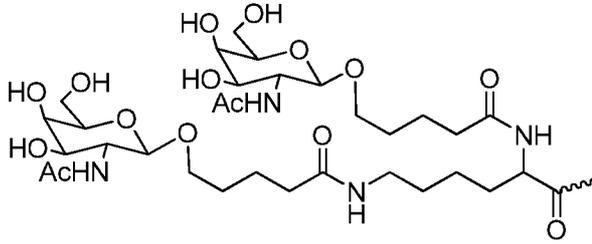
формулы XIII,



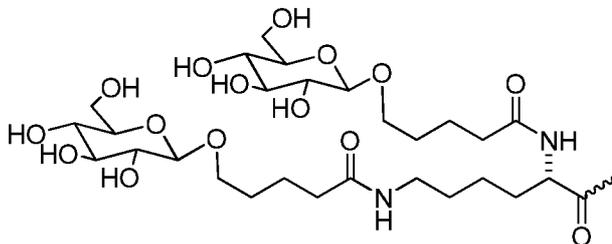
формулы XIV,



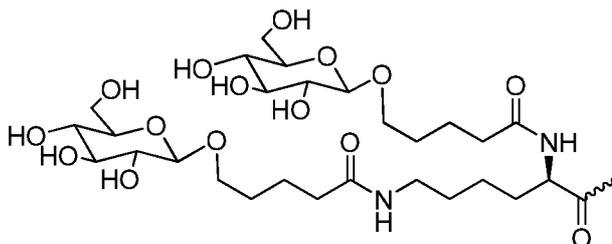
формулы XV,



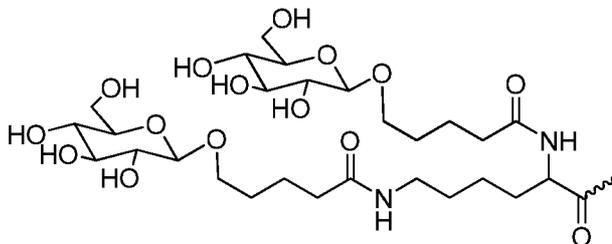
формулы XVI,



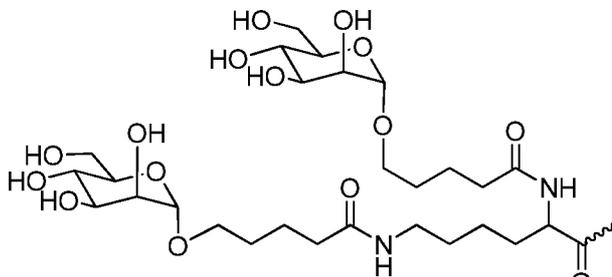
формулы XVII,



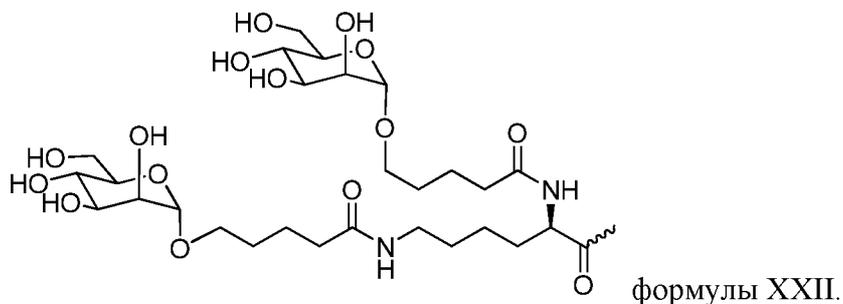
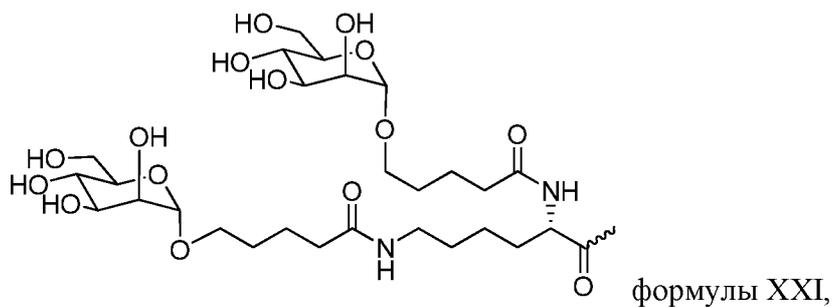
формулы XVIII,



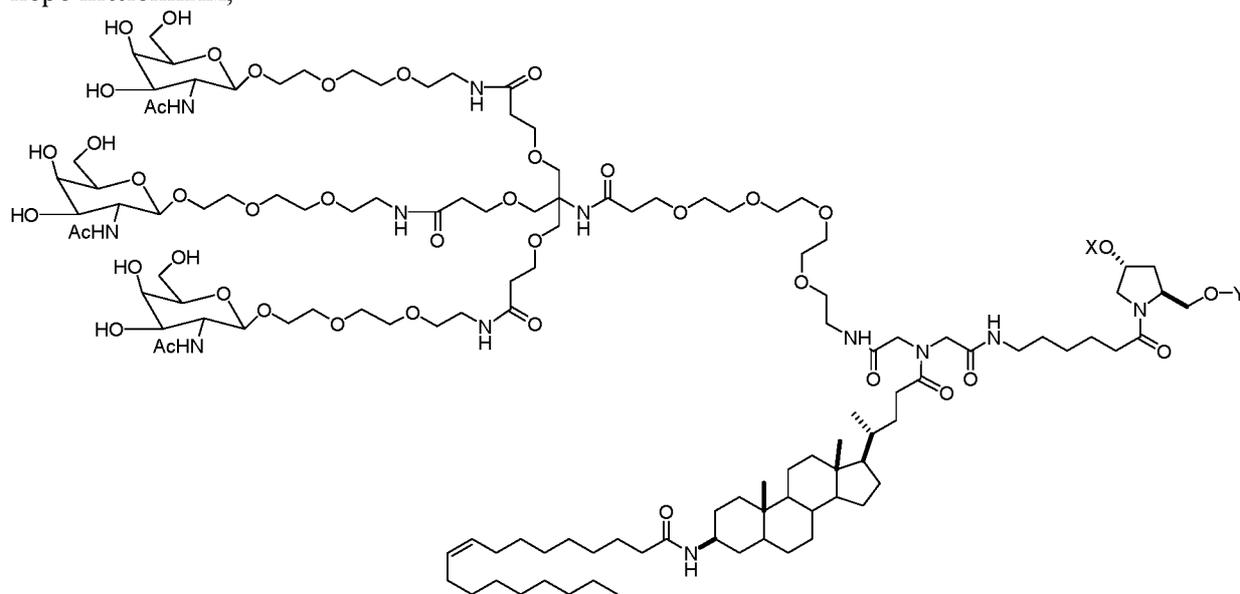
формулы XIX,



формулы XX,



Другой иллюстративный конъюгат с углеводом для применения в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включает, не ограничиваясь перечисленным,

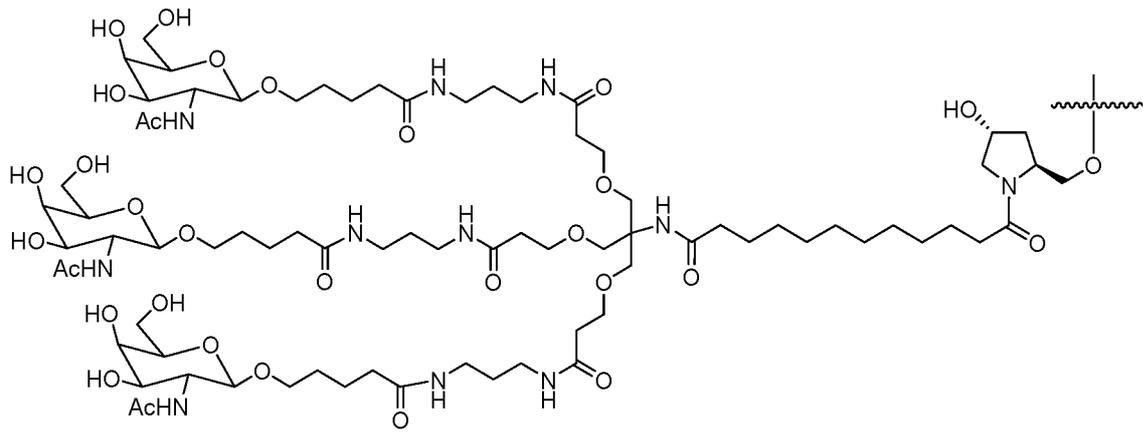


формулу XXIII,

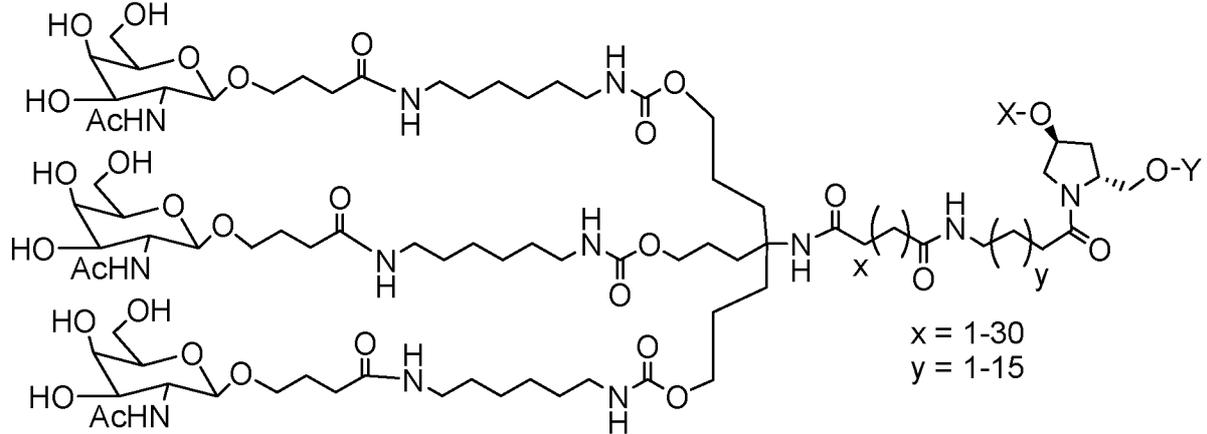
если один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат с углеводом дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, описанных выше, таких как, не ограничиваясь перечисленным, модулятор ФК и/или пептид, повышающий проникновение в клетки.

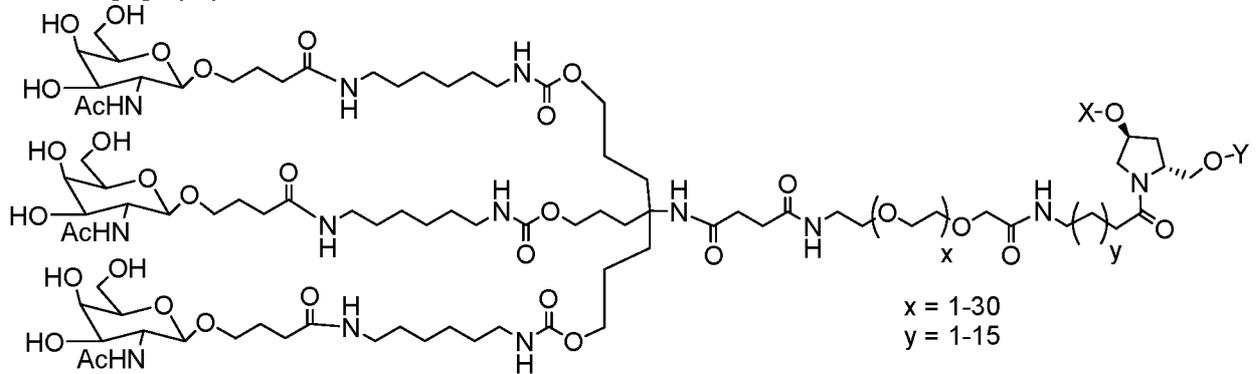
В некоторых вариантах осуществления иРНК согласно настоящему изобретению конъюгирована с углеводом посредством линкера. Неограничивающие примеры конъюгатов иРНК с углеводами с линкерами в композициях и способах согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным,



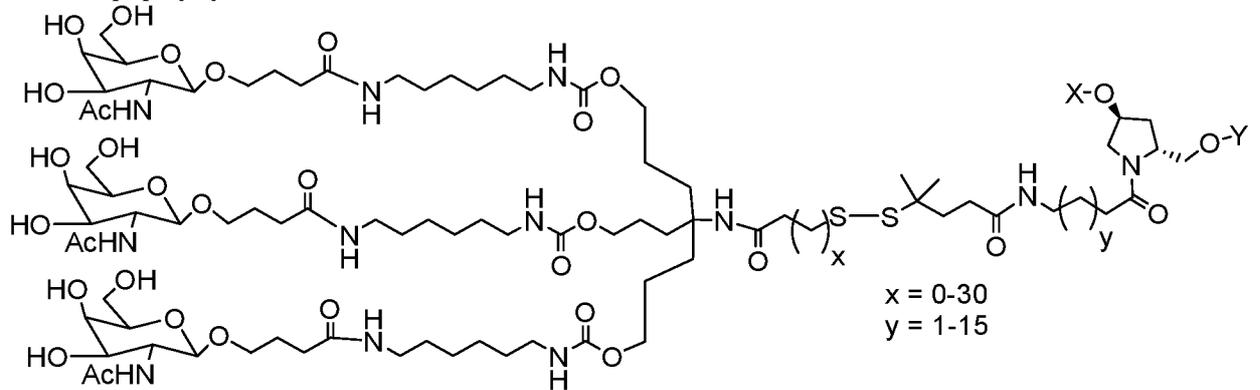
формулу XXIV,



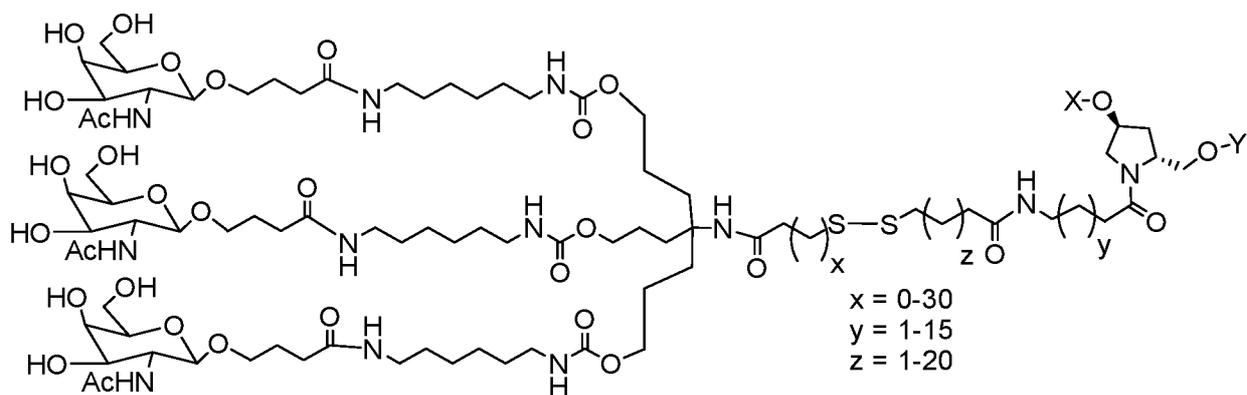
формулу XXV,



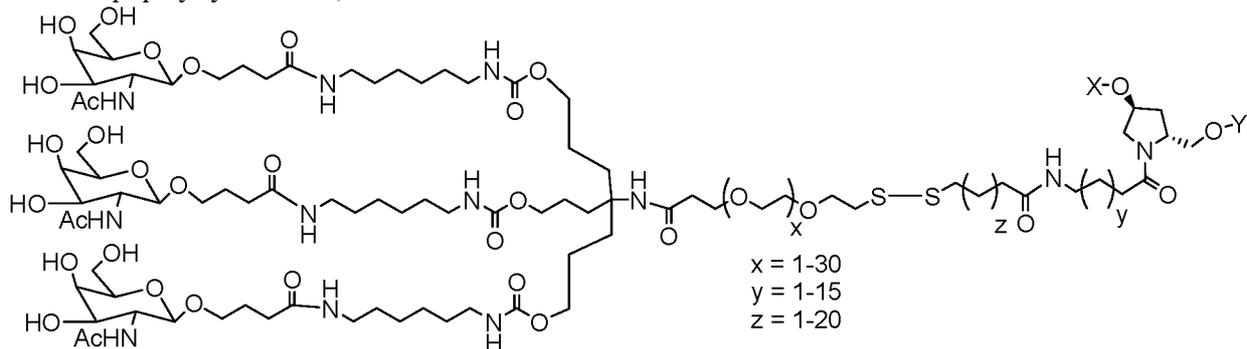
формулу XXVI,



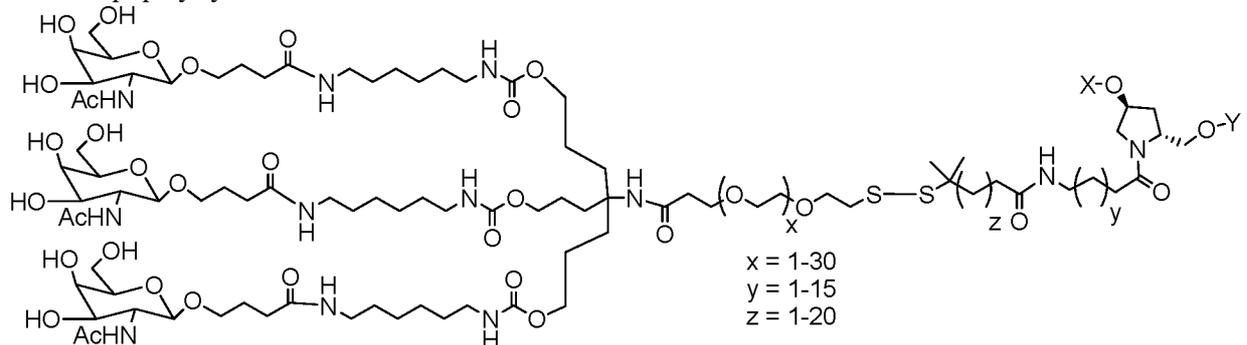
формулу XXVII,



формулу XXVIII,



формулу XXIX и



формулу XXX,

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

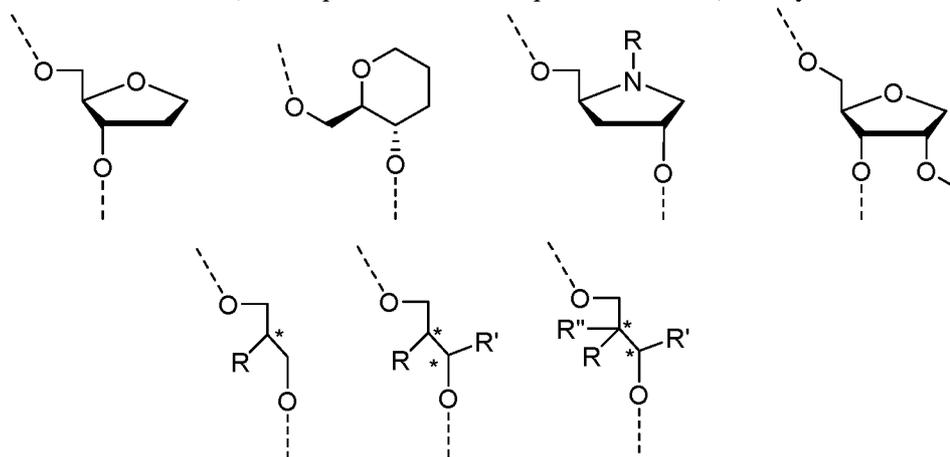
#### Е. Термически дестабилизирующие модификации

В отдельных вариантах осуществления молекула дцРНК может быть оптимизирована для РНК-интерференции путем включения термически дестабилизирующих модификаций в области узнавания мишени антисмысловой цепи (т. е. в положениях 2-9 с 5'-конца антисмысловой цепи) для снижения или подавления сайленсинга нецелевых генов. Было обнаружено, что дцРНК с антисмысловой цепью, содержащей по меньшей мере одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в пределах первых 9 нуклеотидных положений, считая с 5'-конца, антисмысловой цепи, характеризуются сниженной активностью сайленсинга нецелевых генов. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления одна или более термически дестабилизирующих модификаций дуплекса расположены в положениях 2-9 или положениях 4-8 с 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация (модификации) дуплекса расположена (расположены) в положении 6, 7 или 8 с 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 7 с 5'-конца антисмысловой цепи. Термин «термически дестабилизирующая модификация (модификации)» включает модификацию (модификации), которая будет приводить к получению дцРНК с более низкой общей температурой плавления ( $T_m$ ), такой как  $T_m$ , которая на один, два, три или четыре градуса ниже, чем  $T_m$  дцРНК без такой модификации (модификаций). В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 с 5'-конца антисмысловой цепи.

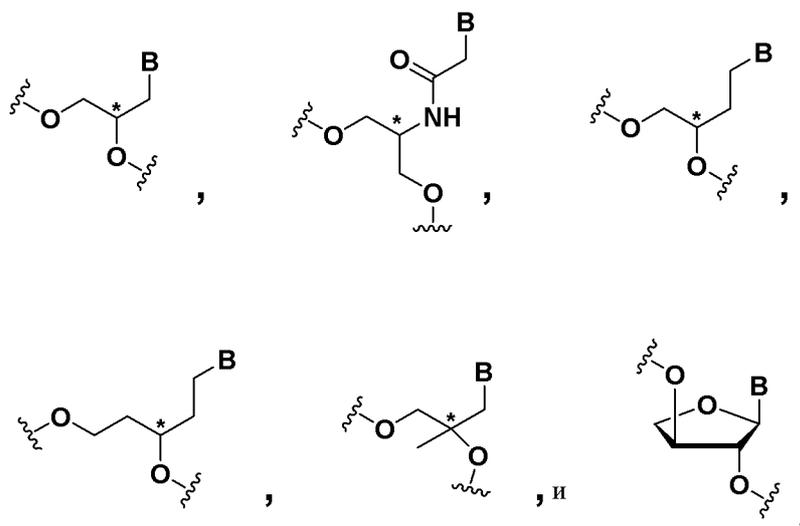
Термически дестабилизирующие модификации могут включать, не ограничиваясь перечисленным, модификацию нуклеотидами с удаленными азотистыми основаниями; ошибку спаривания с противоположным нуклеотидом в противоположной цепи; и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксимодификация или ациклический нуклеотид, например, незамкнутые нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA).

Иллюстративные модификации нуклеотидами с удаленными азотистыми основаниями включают, не ограничиваясь перечисленным, следующие:



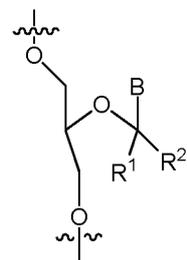
где  $R=H$ , Me, Et или OMe;  $R'=H$ , Me, Et или OMe;  $R''=H$ , Me, Et или OMe



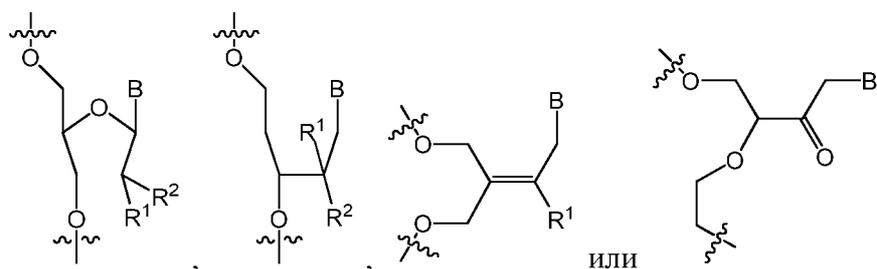


где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание, и звездочка на каждой структуре представляет собой *R*-, *S*-, либо рацемическую конфигурацию.

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



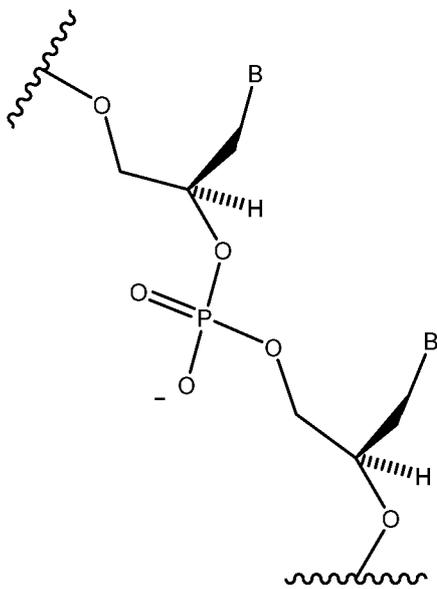
вариантах осуществления ациклический нуклеотид представляет собой



, где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание, R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> независимо представляют собой H, галоген, OR<sub>3</sub> или алкил; и R<sub>3</sub> представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, арилалкил, гетероарил или сахар). Термин «UNA» относится к незамкнутой (разомкнутой) ациклической нуклеиновой кислоте, где любая из связей сахара была удалена с образованием незамкнутого остатка «сахара». В одном примере UNA также охватывает мономеры с удаленными связями между C1'-C4' (т. е. ковалентной углерод-кислород-углеродной связью между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере удалена

C2'-C3'-связь (т. е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') сахара (см. Mikhailov et. al., *Tetrahedron Letters*, 26 (17): 2059 (1985); и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 10: 1039 (2009), которые настоящим включены посредством ссылки в полном объеме). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость остова без влияния на спаривание по Уотсону-Крику. Ациклический нуклеотид может быть связан посредством 2'-5' или 3'-5' связи.

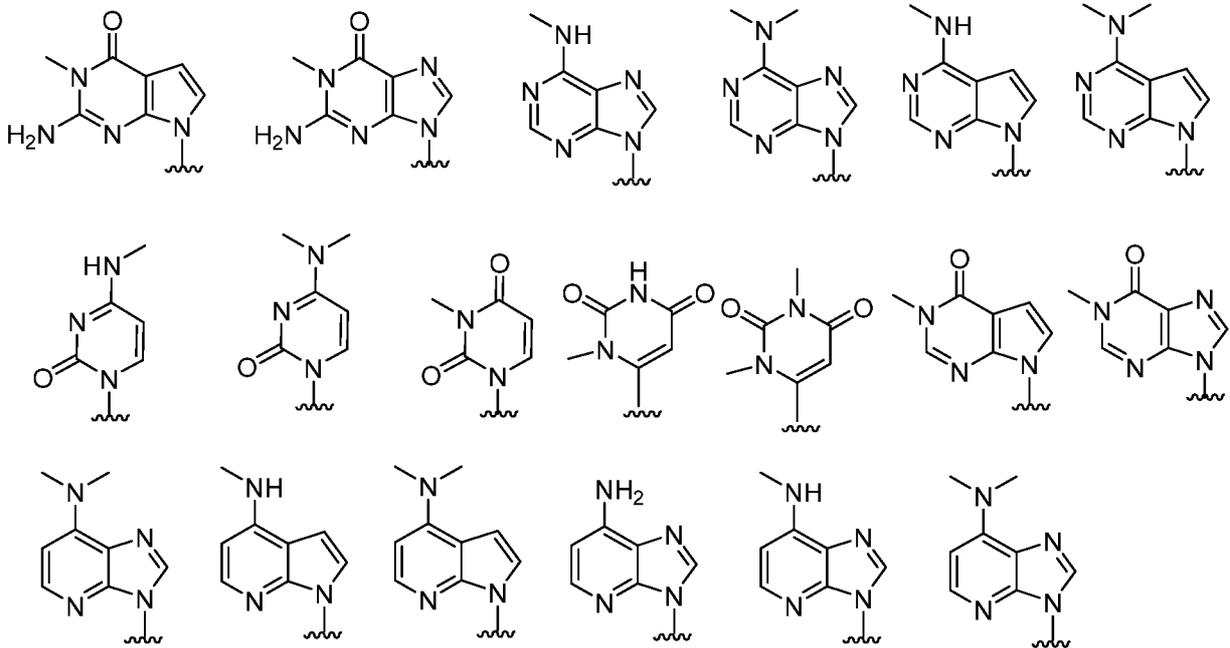
Термин «GNA» относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, аналогичный ДНК или РНК, но отличающийся по составу его «остова» тем, что он состоит из повторяющихся звеньев глицерина, связанных фосфодиэфирными связями:



(R) - GNA

Термически дестабилизирующая модификация дуплекса может представлять собой ошибки спаривания (т. е. некомплементарные пары оснований) между термически дестабилизирующим нуклеотидом и противоположным нуклеотидом в противоположной цепи в дуплексе дцРНК. Иллюстративные пары ошибочно спаренных 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 пары ошибочно спаренных оснований, известные из уровня техники, также пригодны в рамках настоящего изобретения. Ошибка спаривания может иметь место между нуклеотидами, которые являются либо встречающимися в природе нуклеотидами, либо модифицированными нуклеотидами, т. е. ошибка спаривания оснований может иметь место между азотистыми основаниями соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций рибозных сахаров этих нуклеотидов. В отдельных вариантах осуществления молекула дцРНК содержит по меньшей мере одно азотистое основание, образующее ошибку спаривания, которое представляет собой 2'-дезоксизотистое основание; например, 2'-дезоксизотистое основание находится в смысловой цепи.

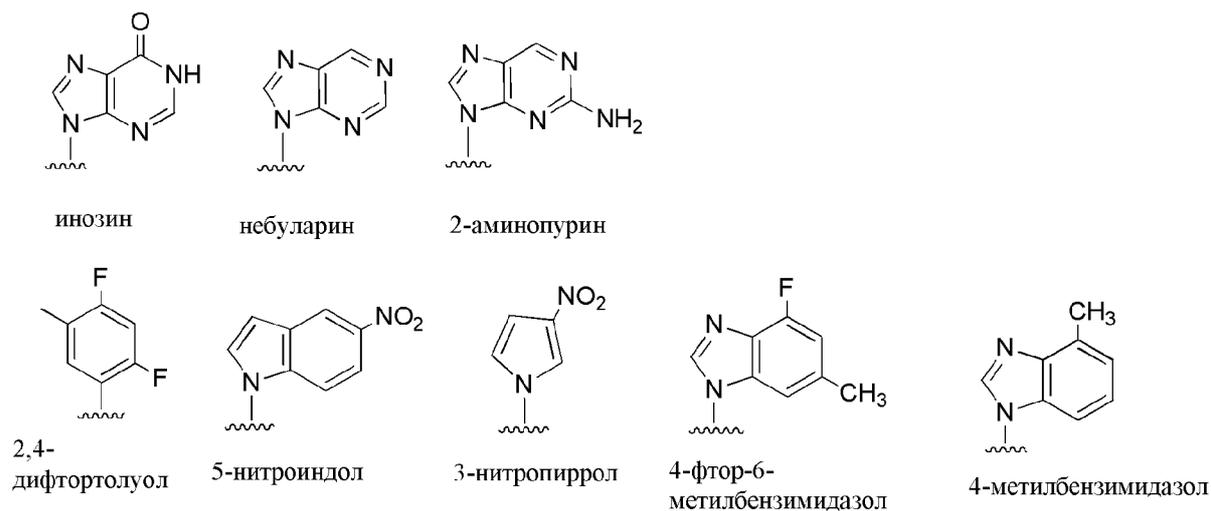
В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса в области узнавания мишени антисмысловой цепи включает нуклеотиды с нарушенной Н-связью по Уотсону-Крику с комплементарным основанием на мРНК-мишени, такие как:



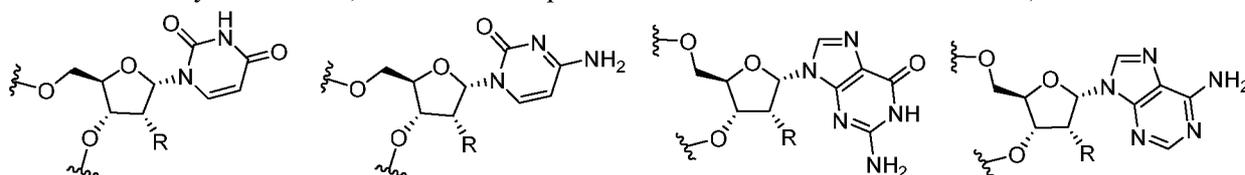
Дополнительные примеры нуклеотида с удаленным азотистым основанием, ациклических нуклеотидных модификаций (включая UNA и GNA) и модификаций с ошибками спаривания были подробно описаны в WO 2011/133876, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Термически дестабилизирующие модификации могут также включать универсальное основание с уменьшенной или устраненной способностью образовывать водородные связи с противоположными основаниями, и фосфатные модификации.

В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса включает нуклеотиды с неканоническими основаниями, такие как, не ограничиваясь перечисленным, модификации азотистых оснований с нарушенной или полностью устраненной способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной цепи. Эти модификации азотистых оснований были оценены в отношении дестабилизации центральной области дуплекса дцРНК, как описано в WO 2010/0011895, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Иллюстративные модификации азотистых оснований представляют собой:

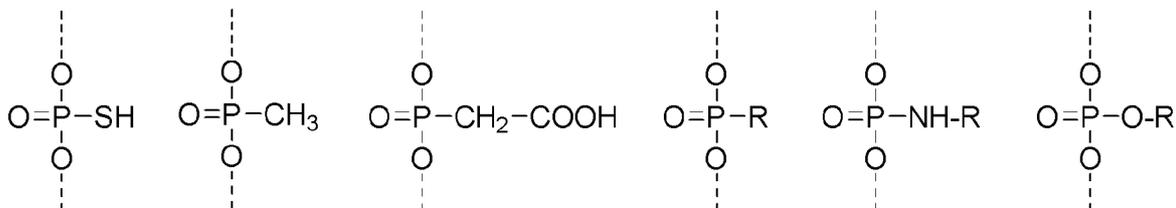


В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса в области узнавания мишени антисмысловой цепи включает один или более  $\alpha$ -нуклеотидов, комплементарных основанию на мРНК-мишени, таких как:



где R представляет собой H, OH, OCH<sub>3</sub>, F, NH<sub>2</sub>, NHMe, NMe<sub>2</sub> или O-алкил.

Иллюстративные фосфатные модификации, которые, как известно, снижают термическую стабильность дуплексов дцРНК по сравнению с природными фосфодиэфирными связями, представляют собой:



R = алкил

Алкил для группы R может представлять собой C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкил. Конкретные алкилы для группы R включают, не ограничиваясь перечисленным, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил и гексил.

Специалисту в данной области техники будет ясно, с учетом того, что функциональная роль азотистых оснований состоит в определении специфичности агента на основе РНК согласно настоящему изобретению, тогда как модификации азотистых оснований могут быть выполнены различными способами, как описано в настоящем документе, например, когда осуществить введение дестабилизирующих модификаций в агент на основе РНК согласно настоящему изобретению, например, с целью улучшения целевого эффекта по сравнению с нецелевым эффектом, доступный диапазон модификаций и в целом, в агентах на основе РНК согласно настоящему изобретению, как правило,

присутствует намного больше модификаций, отличных от модификаций азотистых оснований, например, модификаций сахарных групп или фосфатных остовов полирибонуклеотидов. Такие модификации более подробно описаны в других разделах настоящего описания и явным образом предусмотрены для агентов на основе РНК и согласно настоящему изобретению, либо обладающих нативными азотистыми основаниями, либо модифицированными азотистыми основаниями, как описано выше либо в других местах настоящего документа.

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. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепи содержат по меньшей мере две стабилизирующие модификации. Стабилизирующая модификация может присутствовать при любом нуклеotide смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, стабилизирующая модификация может присутствовать при каждом нуклеotide на смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая стабилизирующая модификация может чередоваться на смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат стабилизирующую модификацию чередующимся образом. Чередующийся характер стабилизирующих модификаций на смысловой цепи может быть таким же или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся характер стабилизирующих модификаций на смысловой цепи может иметь смещение относительно чередующегося характера стабилизирующих модификаций на антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления 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 любых положениях.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 с 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 с 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 14 и 16 с 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере одну стабилизирующую модификацию, смежную с дестабилизирующей модификацией. Например, стабилизирующая модификация может представлять собой нуклеотид с 5'-конца или 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 или +1 относительно положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующую модификацию

с каждого из 5'-конца и 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т. е. положения -1 и +1 относительно положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере две стабилизирующие модификации с 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях +1 и +2 относительно положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления 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 любых положениях. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 10 и 11 с 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 9, 10 и 11 с 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, считая с 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, считая с 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех стабилизирующих модификаций.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь не содержит стабилизирующую модификацию в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

Иллюстративные термически стабилизирующие модификации включают, не ограничиваясь перечисленным, 2'-фтор-модификации. Другие термически стабилизирующие модификации включают, не ограничиваясь перечисленным, LNA.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере четыре (например, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотида. Без ограничений все 2'-фторнуклеотиды могут присутствовать в одной цепи. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепи содержат по меньшей мере два 2'-фторнуклеотида. 2'-фтор-модификация может присутствовать при любом нуклеotide смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, 2'-фтор-модификация может присутствовать при каждом нуклеotide на смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая 2'-фтор-модификация может чередоваться на смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат 2'-фтор-модификацию чередуясь образом. Чередующийся характер 2'-фтор-модификаций на смысловой цепи может быть таким же или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся характер 2'-фтор-модификаций на смысловой цепи может иметь смещение относительно чередующегося характера 2'-фтор-модификаций на антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере два (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотида. Без ограничений 2'-фтор-модификация в антисмысловой цепи может присутствовать в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 с 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 14 и 16 с 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 с 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один 2'-фторнуклеотид, смежный с дестабилизирующей модификацией. Например, 2'-фторнуклеотид может представлять собой нуклеотид с 5'-конца или 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т. е. в положении -1 или +1 относительно положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотид с каждого из 5'-конца и 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т. е. положения -1 и +1 относительно положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит по меньшей мере два 2'-фторнуклеотида с 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях +1 и +2 относительно положения дестабилизирующей модификации.

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

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь не содержит 2'-фторнуклеотид в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида (нт) и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов (нт), где антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один термически

дестабилизирующий нуклеотид, где указанный по меньшей мере один термически дестабилизирующий нуклеотид присутствует в области узнавания мишени антисмысловой цепи (т. е. в положении 2-9 с 5'-конца антисмысловой цепи), где один конец дцРНК является тупым, в то время как другой конец содержит 2-нуклеотидный выступающий конец, и где дцРНК необязательно дополнительно обладает по меньшей мере одной (например, одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или всеми семью) 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 фосфоротиоатных 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 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит по меньшей мере четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. В отдельных вариантах осуществления 2-нуклеотидный выступающий конец находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи молекулы дцРНК может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицирован с помощью одной и той же или разных модификаций, которая может включать одно или более изменений одного или обоих из несвязывающих фосфатных атомов кислорода или одного или более из связывающих фосфатных атомов кислорода; изменение компонента рибозного сахара, например, 2' гидроксила в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента «дефосфо» линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания; и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, многие из модификаций присутствуют в положении, которое повторяется в нуклеиновой кислоте, например, модификации основания или фосфатного фрагмента, или несвязывающего O фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет присутствовать во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях этого не происходит. Например, модификация может присутствовать только в 3'-или 5'-концевом положении, может присутствовать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может присутствовать в двухцепочечной области, одноцепочечной области или в обеих из них. Модификация может присутствовать только в двухцепочечной области РНК или может присутствовать только в одноцепочечной области РНК. Например, фосфоротиоатная модификация в положении несвязывающего O может присутствовать на одном или обоих концах, может присутствовать только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи, или может присутствовать в двухцепочечной и одноцепочечной областях, в частности, на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированными.

Может быть возможно, например, чтобы повысить стабильность, включить

определенные основания в выступающие концы, или включить модифицированные нуклеотиды или имитаторы нуклеотидов, в выступающие концы одной цепи, например, в 5'- или 3'-выступающий конец, или в оба из них. Например, может быть желательным включение пуриновых нуклеотидов в выступающие концы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-выступающем конце могут быть модифицированы, например, посредством модификации, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, использование модификаций в 2'-положении рибозного сахара с модификациями, известными из уровня техники, например, использование дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидезокси-2'-фтор- (2'-F-) или 2'-О-метилмодифицированных вместо рибозного сахара азотистого основания, и модификации в фосфатной группе, например, фосфоротиоатные модификации. Выступающие концы не обязательно должны быть гомологичными последовательности-мишени.

В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован посредством LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-дезоксидезокси или 2'-фтора. Цепи могут содержать более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Следует исходить из того, что эти модификации являются дополнением к по меньшей мере одной термически дестабилизирующей модификации дуплекса, присутствующего в антисмысловой цепи.

На смысловой цепи и антисмысловой цепи, как правило, присутствуют по меньшей мере две разные модификации. Эти две модификации могут представлять собой 2'-дезоксидезокси-, 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, ациклические нуклеотиды или другие. В некоторых вариантах осуществления каждая из смысловой цепи и антисмысловой цепи содержит два различным образом модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-О-метила или 2'-дезоксидезокси. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилнуклеотидом, 2'-дезоксинуклеотидом, 2'-дезоксидезокси-2'-фторнуклеотидом, 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA) нуклеотидом, 2'-О-диметиламиноэтоксипропил (2'-О-DMAEOE) нуклеотидом, 2'-О-аминопропил (2'-О-AP) нуклеотидом или 2'-ага-F нуклеотидом. Аналогично вышеуказанному, следует исходить из того, что эти модификации являются дополнением к по меньшей мере одной термически дестабилизирующей модификации дуплекса, присутствующего в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит модификации чередующегося характера, в частности, в областях В1, В2, В3, В1', В2', В3', В4'. В контексте настоящего документа термин «чередующийся мотив» или «чередующийся характер» относится к мотиву, имеющему одну или более модификаций, при этом каждая модификация присутствует на чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или одному на каждые три нуклеотида, или аналогичному характеру. Например, если

каждый из А, В и С представляет один тип модификации нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВАААВАААВ...», «АААВВВВВВВВВ...» или «АВСАВСАВСАВС...» и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет один тип модификации нуклеотида, чередующийся характер, т. е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловых цепи или антисмысловых цепи может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в пределах чередующегося мотива, таких как «АВАВАВ...», «АСАСАС...», «ВДВДВД...» или «СДСДСД...» и т. д.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит характер модификаций для чередующего мотива на смысловой цепи, смещенный относительно характера модификаций для чередующего мотива на антисмысловой цепи. Смещение может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует отличающимся образом модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи, и наоборот. Например, когда смысловая цепь находится в паре с антисмысловой цепью в дуплексе дцРНК, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «АВАВАВ» в направлении 5'-3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВАВАВА» в направлении 3'-5' цепи в пределах дуплексной области. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ААВВААВВ» в направлении 5'-3' цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВВААВВАА» в направлении 3'-5' цепи в пределах дуплексной области, так что происходит полное или частичное смещение характера модификации между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

Молекула дцРНК согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Фосфоротиоатная или метилфосфонатная модификация межнуклеотидной связи может присутствовать на любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или в обеих цепях, в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может присутствовать на каждом нуклеотиде на смысловой цепи или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может присутствовать чередующимся образом на смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь обе содержат модификации межнуклеотидной связи чередующимся образом. Чередующийся характер модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может быть таким же или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся характер модификации межнуклеотидной связи на смысловой цепи может иметь смещение относительно чередующегося характера модификации межнуклеотидной связи на антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит

фосфоротиоатную или метилфосфонатную модификацию межнуклеотидной связи в области выступающего конца. Например, область выступающего конца содержит два нуклеотида, имеющих фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между этими двумя нуклеотидами. Также могут быть осуществлены модификации межнуклеотидных связей для связывания нуклеотидов выступающих концов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексной области. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды выступающего конца могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и необязательно могут присутствовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие нуклеотид выступающего конца со спаренным нуклеотидом, который находится рядом с нуклеотидом выступающего конца. Например, могут присутствовать по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов представляют собой нуклеотиды выступающего конца, а третий представляет собой спаренный нуклеотид рядом с нуклеотидом выступающего конца. В отдельных вариантах осуществления эти три концевых нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы дцРНК содержит 1-10 блоков из двух-десяти фосфоротиоатных 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 фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из двух фосфоротиоатных 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 фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из трех фосфоротиоатных 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 фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью,

содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из четырех фосфоротиоатных 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 фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из шести фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из семи фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК

содержит два блока из восьми фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из девяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, причем одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей размещена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в положениях 1-10 концевого положения (положений) смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи на одном конце или на обоих концах смысловой или антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в положениях 1-10 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 фосфоротиоатной метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 8-16 дуплексной области, считая с 5'-конца смысловой цепи; молекула дцРНК может необязательно дополнительно содержать одну или более фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в положениях 1-10 концевого положения (положений).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в положении 1-5 и от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидных связей в положении 18-23 смысловой цепи (считая с 5'-конца), и от одной до пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных модификаций межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая с 5'-конца).





изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая с 5'-конца), и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 20 и 21 антисмысловой цепи (считая с 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 1 или 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 21 и 22 смысловой цепи (считая с 5'-конца), и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении в положении 21 антисмысловой цепи (считая с 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая с 5'-конца), и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 антисмысловой цепи (считая с 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 1 или 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положении 22 и 23 смысловой цепи (считая с 5'-конца), и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении в положении 21 антисмысловой цепи (считая с 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению дополнительно содержит одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 1 и одну фосфоротиоатную модификацию межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая с 5'-конца), и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две фосфоротиоатные модификации межнуклеотидной связи в положениях 23 и 23 антисмысловой цепи (считая с 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления соединение согласно настоящему изобретению содержит определенный характер хиральных центров остова. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит по меньшей мере 5 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит по меньшей мере 6 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления



не являются хиральными (в качестве неограничивающего примера, фосфодизфир). В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит не более 7 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит не более 5 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит не более 4 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит не более 3 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит не более 2 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит не более 1 межнуклеотидной связи, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит по меньшей мере 10 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 8 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит по меньшей мере 11 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 7 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит по меньшей мере 12 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит по меньшей мере 13 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит по меньшей мере 14 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 5 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общий характер хиральных центров остова содержит по меньшей мере 15 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 4 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Sp-конфигурации необязательно являются смежными или не смежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Rp-конфигурации необязательно являются смежными или не смежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи, которые не являются хиральными, необязательно являются или не являются смежными.

В некоторых вариантах осуществления соединение согласно настоящему изобретению содержит блок, представляющий собой блок стереохимии. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Rp-блок в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Rp. В некоторых вариантах

осуществления 5'-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Sp-блок в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Sp. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления предложенные олигонуклеотиды содержат Rp- и Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления предложенные олигонуклеотиды содержат один или более Rp-, но не содержат Sp-блоков. В некоторых вариантах осуществления предложенные олигонуклеотиды содержат один или более Sp-, но не содержат Rp-блоков. В некоторых вариантах осуществления предложенные олигонуклеотиды содержат один или более блоков PO, в которых каждая межнуклеотидная связь представляет собой природную фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления соединение согласно настоящему изобретению содержит 5'-блок, представляющий собой Sp-блок, где каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок, в котором каждая из межнуклеотидных связей представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок, в котором каждая из межнуклеотидных связей представляет собой фосфоротиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, в котором каждая из межнуклеотидных связей представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, в котором каждая из межнуклеотидных связей представляет собой фосфоротиоатную связь, и каждый сахарный фрагмент содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев.

В некоторых вариантах осуществления соединение согласно настоящему изобретению содержит тип нуклеозида в области или олигонуклеотиде, за которым следует конкретный тип межнуклеотидной связи, например, природная фосфатная связь, модифицированная межнуклеотидная связь, хиральная межнуклеотидная связь в Rp-

конфигурации, хиральная межнуклеотидная связь в Sp-конфигурации и т. д. В некоторых вариантах осуществления за А следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за А следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за А следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за U следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за U следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за U следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за С следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за С следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за С следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за G следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за G следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за G следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за С и U следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за С и U следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за С и U следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за А и G следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за А и G следует Rp.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит ошибку (ошибки) спаривания с мишенью в дуплексе, или их комбинации. Ошибка спаривания может присутствовать в области выступающего конца или дуплексной области. Пару оснований можно ранжировать на основании их склонности к способствованию диссоциации или плавлению (например, на основании свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретного спаривания, самый простой подход заключается в изучении пар на основе отдельной пары, хотя также может быть использован анализ ближайшего соседа или аналогичный анализ). С точки зрения способствования диссоциации: А:U является предпочтительным по сравнению с G:C; G:U является предпочтительным по сравнению с G:C; и I:C является предпочтительным по сравнению с G:C (I=инозин). Ошибки спаривания, например, неканонические или отличные от канонических спаривания (как описано в других местах настоящего документа), являются предпочтительными по сравнению с каноническими (А:Т, А:U, G:C) спариваниями; и спаривания, которые содержат универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническими спариваниями.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных областях с 5'-конца антисмысловой цепи, которая может быть независимо выбрана из группы: А:U, G:U, I:C и ошибочно спаренных пар, например, неканонических или отличных от канонических спариваний или спариваний, которые содержат универсальное основание, для способствования диссоциации антисмысловой цепи на 5'-конце дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 в 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 дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований

AU. Например, первая пара оснований в дуплексной области с 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

Было обнаружено, что введение 4'-модифицированного или 5'-модифицированного нуклеотида в 3'-конец фосфодиэфирной (PO), фосфоротиоатной (PS) или фосфородитиоатной (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.

В некоторых вариантах осуществления 5'-модифицированный нуклеозид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Например, 5'-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Алкильная группа в 5'-положении рибозного сахара может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер. Иллюстративный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер.

В некоторых вариантах осуществления 4'-модифицированный нуклеозид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Например, 4'-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Алкильная группа в 4'-положении рибозного сахара может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер. Иллюстративный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может представлять собой рацемический или 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 миРНК. 4'-*O*-алкил рибозного сахара может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер. Иллюстративный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер.

В некоторых вариантах осуществления 5'-алкилированный нуклеозид вводят в любом положении на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или улучшает активность дцРНК. 5'-алкил может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер. Иллюстративный 5'-алкилированный нуклеозид представляет собой 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер.

В некоторых вариантах осуществления 4'-алкилированный нуклеозид вводят в любом положении на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или улучшает активность дцРНК. 4'-алкил может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер. Иллюстративный 4'-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может

представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер.

В некоторых вариантах осуществления 4'-*O*-алкилированный нуклеозид вводят в любом положении на смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или улучшает активность дцРНК. 5'-алкил может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер. Иллюстративный 4'-*O*-алкилированный нуклеозид представляет собой 4'-*O*-метилнуклеозид. 4'-*O*-метил может представлять собой рацемический или хирально чистый *R*- или *S*-изомер.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению может содержать 2'-5'-связи (с 2'-Н, 2'-ОН и 2'-ОМе и с Р=О или Р=S). Например, модификации 2'-5'-связей могут быть использованы для обеспечения устойчивости к нуклеазам или для ингибирования связывания смысловой с антисмысловой цепью, или могут быть использованы на 5'-конце смысловой цепи для предотвращения активации смысловой цепи посредством RISC.

В другом варианте осуществления молекула дцРНК согласно настоящему изобретению может содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-Н, 2'-ОН и 2'-ОМе). Например, эти модификации L-сахаров могут быть использованы для обеспечения устойчивости к нуклеазам или для ингибирования связывания смысловой с антисмысловой цепью, или могут быть использованы на 5'-конце смысловой цепи для предотвращения активации смысловой цепи посредством RISC.

В различных публикациях описаны мультимерные миРНК, все из которых могут быть использованы с дцРНК согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, US 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, которые настоящим включены в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления молекулы дцРНК согласно настоящему изобретению являются 5'-фосфорилированными или содержат фосфорильный аналог на 5'-праймированном конце. 5'-фосфатные модификации включают модификации, которые совместимы с RISC-опосредованным сайленсингом генов. Подходящие модификации включают: 5'-монофосфат ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-5'); 5'-дифосфат ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-трифосфат ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-гуанозиновый кэп (7-метилованный или неметилованный) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-аденозиновый кэп (A<sub>ppp</sub>) и любую модифицированную или немодифицированную нуклеотидную кэп-структуру (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-монотиофосфат (фосфоротиоат; (HO)<sub>2</sub>(S)P-O-5'); 5'-монодитиофосфат (фосфородитиоат; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-фосфоротиолат ((HO)<sub>2</sub>(O)P-S-5'); любую дополнительную комбинацию монофосфата, дифосфата и трифосфата с замененным кислородом/серой (например, 5'-альфа-тиотрифосфат, 5'-гамма-тиотрифосфат, и т. д.), 5'-фосфорамидаты ((HO)<sub>2</sub>(O)P-NH-5', (HO)(NH<sub>2</sub>)(O)P-O-5'), 5'-алкилфосфонаты (R=алкил=метил, этил, изопропил, пропил, и т. д., например, RP(OH)(O)-O-5'-, 5'-алкенилфосфонаты (т. е. винил, замещенный винил), (OH)<sub>2</sub>(O)P-5'-CH<sub>2</sub>-), 5'-алкилэфирфосфонаты (R=простой алкиловый эфир=метоксиметил (MeOCH<sub>2</sub>-), этоксиметил, и т. д., например, RP(OH)(O)-O-5'-). В одном

примере модификация может быть помещена в антисмысловую цепь молекулы дцРНК.

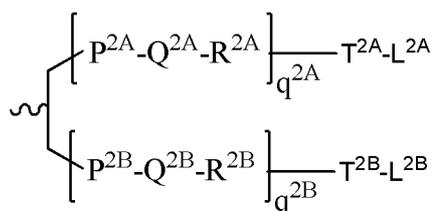
### *F. Линкеры*

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в настоящем документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду иРНК с помощью различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

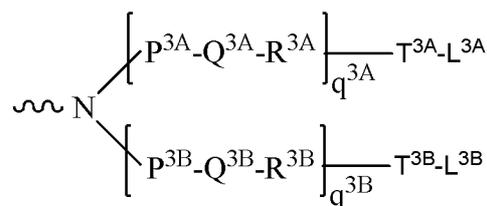
Линкеры, как правило, содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, элемент, такой как NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH или цепь атомов, такую как, не ограничиваясь перечисленным, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкинилариалалкил, алкинилариалалкенил, алкинилариалалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкинилариал, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, причем один или более метиленов могут быть прерваны или окончены O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R8), C(O), замещенным или незамещенным арилом, замещенным или незамещенным гетероарилом, замещенным или незамещенным гетероциклическим соединением; где R8 представляет собой водород, ацил, алифатическую группу или замещенную алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит приблизительно 1-24 атомов, 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.

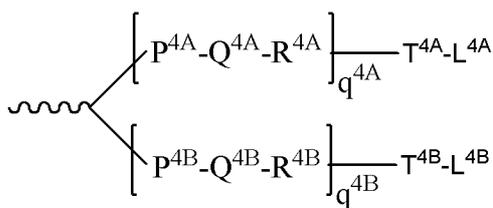
В некоторых вариантах осуществления дцРНК согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, представленных в любой из формул (XXXI) - (XXXIV):

Формула XXXI

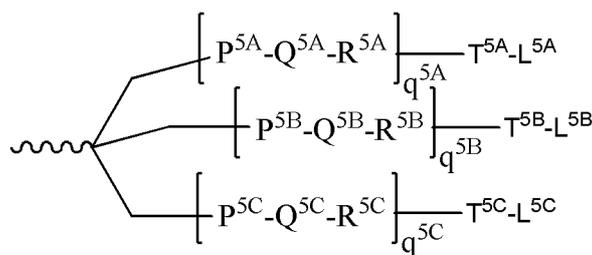


Формула XXXII





Формула XXXIII



Формула XXXIV

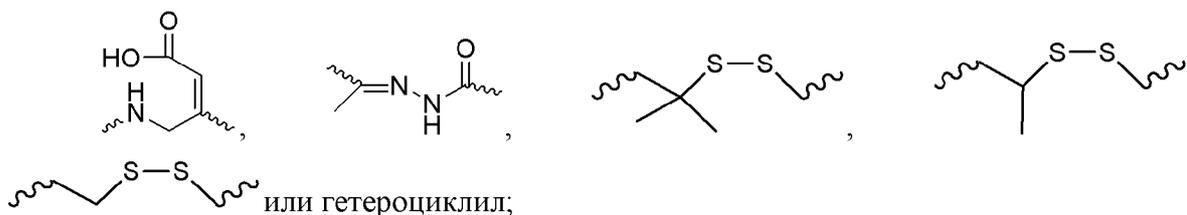
где:

$q_{2A}$ ,  $q_{2B}$ ,  $q_{3A}$ ,  $q_{3B}$ ,  $q_{4A}$ ,  $q_{4B}$ ,  $q_{5A}$ ,  $q_{5B}$  и  $q_{5C}$  независимо в каждом случае равны 0-20, и при этом повторяющееся звено может быть одинаковым или разным;

каждый из  $P^{2A}$ ,  $P^{2B}$ ,  $P^{3A}$ ,  $P^{3B}$ ,  $P^{4A}$ ,  $P^{4B}$ ,  $P^{5A}$ ,  $P^{5B}$ ,  $P^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{5A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$  независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH или CH<sub>2</sub>O;

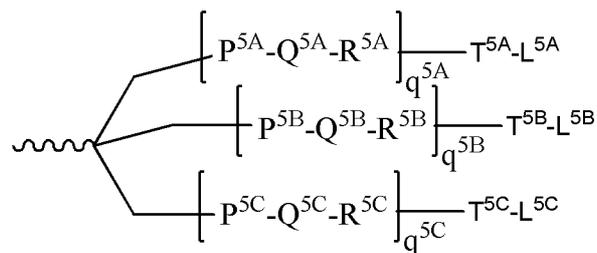
$Q^{2A}$ ,  $Q^{2B}$ ,  $Q^{3A}$ ,  $Q^{3B}$ ,  $Q^{4A}$ ,  $Q^{4B}$ ,  $Q^{5A}$ ,  $Q^{5B}$ ,  $Q^{5C}$  независимо в каждом случае отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где один или более метиленов могут быть прерваны или окончены одним или более из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

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



$L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  и  $L^{5C}$  представляют собой лиганд; т. е. каждый независимо в каждом случае представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R<sup>a</sup> представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc особенно подходят для применения с агентами на основе РНК и для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как имеющие формулу (XXXV):

## Формула XXXV



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, не ограничиваясь перечисленным, структуры, приведенные выше в формулах II, VII, XI, X и XIII.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая является достаточно стабильной за пределами клетки, но которая при попадании в клетку-мишень расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В некоторых вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется по меньшей мере приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более, или по меньшей мере приблизительно в 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первом эталонном условии (которое может, например, быть выбрано таким образом, чтобы имитировать или представлять собой внутриклеточные условия), чем в крови субъекта, или при втором эталонном условии (которое может, например, быть выбрано таким образом, чтобы имитировать или представлять собой условия, которые имеют место в крови или сыворотке крови).

Расщепляемые линкерные группы восприимчивы к средствам расщепления, например, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию деструктивных молекул. Как правило, средства расщепления более распространены или обнаруживаются на более высоких уровнях или при более высокой активности внутри клеток, чем в сыворотке крови или крови. Примеры таких деструктивных агентов включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или агенты-восстановители, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут вызывать деградацию расщепляемой в условиях восстановления-окисления линкерной группы путем восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, например, агенты, которые обеспечивают значение рН, равное пяти или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или расщеплять расщепляемую кислотой линкерную группу, действуя в качестве обычной кислоты, пептидазы (которые могут быть специфичными к субстрату) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть

восприимчива к рН. Значение рН сыворотки крови человека составляет 7,4, тогда как среднее внутриклеточное значение рН немного ниже и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым значением рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым значением рН, составляющим приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при подходящем рН с высвобождением катионного липида из лиганда внутрь клетки или в желаемый компартмент клетки.

Линкер может содержать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется определенным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, выступающей в качестве мишени.

Как правило, пригодность расщепляемой линкерной группы-кандидата можно оценить путем тестирования способности деструктивного агента (или условия) расщеплять линкерную группу-кандидата. Также будет желательно проверить расщепляемую линкерную группу-кандидата 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 выбрано таким образом, чтобы оно указывало на расщепление в клетке-мишени, а второе выбрано таким образом, чтобы оно указывало на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке крови. Оценку можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в клеточной культуре, в культуре органа или ткани, или у животных целиком. Может быть полезным проведение первоначальной оценки в бесклеточных условиях или условиях культивирования и подтверждение посредством дальнейшей оценки у животных целиком. В некоторых вариантах осуществления подходящие соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточные условия) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внеклеточные условия).

#### *і. Расщепляемые в условиях восстановления-окисления линкерные группы*

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую в условиях восстановления-окисления линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой в условиях восстановления линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли расщепляемая линкерная группа-кандидат подходящей «расщепляемой в условиях восстановления линкерной группой», или, например, является ли она подходящей для применения с конкретным фрагментом иРНК и конкретным нацеливающим агентом, можно использовать способы, описанные в настоящем документе. Например, кандидата можно оценивать посредством инкубации с дитиотрептолом (ДТТ), или другим восстановителем с использованием реагентов, известных в данной области, которые имитируют скорость расщепления,

которая наблюдается в клетке, например, в клетке-мишени. Кандидатов также можно оценивать в условиях, которые выбраны так, чтобы имитировать условия в крови или сыворотке крови. В одном варианте соединения-кандидаты расщепляются не более чем на 10% в крови. В других вариантах осуществления подходящие соединения-кандидаты подвергаются деградации по меньшей мере приблизительно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или приблизительно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточные условия) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внеклеточные условия). Скорость расщепления соединений-кандидатов может быть определена с использованием стандартных ферментативных анализов кинетики в условиях, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточную среду, и сравнена с условиями, выбранными так, чтобы они имитировали внеклеточную среду.

### *ii. Расщепляемые линкерные группы на основе фосфата*

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе фосфата. Расщепляемая линкерная группа на основе фосфата расщепляется агентами, которые подвергают деградации или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы, в клетках. Примерами линкерных групп на основе фосфата являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. В некоторых вариантах осуществления линкерные группы на основе фосфата 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-, где Rk в каждом случае может представлять собой, независимо, C1-C20 алкил, C1-C20 галогеналкил, C6-C10 арил или C7-C12 арилалкил. В некоторых вариантах осуществления линкерная группа на основе фосфата представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены способами, аналогичными описанным выше.

### *iii. Расщепляемые кислотой линкерные группы*

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В некоторых вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже), или агентами, такими как ферменты, которые могут действовать в качестве обычной кислоты. В клетке определенные органеллы с низким значением pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить условия расщепления для расщепляемых кислотой линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотой линкерных групп включают, не ограничиваясь перечисленным, гидразоны,

сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу  $-C=NN-$ ,  $C(O)O$  или  $-OC(O)$ . В некоторых вариантах осуществления атом углерода, связанный с кислородом сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены способами, аналогичными описанным выше.

*iv. Расщепляемые линкерные группы на основе сложного эфира*

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе сложного эфира. Расщепляемая линкерная группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы, в клетках. Примеры расщепляемых линкерных групп на основе сложного эфира включают, не ограничиваясь перечисленным, сложные эфиры алкиленовой, алкениленовой и алкиниленовой групп. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу  $-C(O)O-$  или  $-OC(O)-$ . Эти кандидаты могут быть оценены способами, аналогичными описанным выше.

*v. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида*

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе пептида. Расщепляемая линкерная группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы, в клетках. Расщепляемые линкерные 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 алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образованной 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 всю амидную функциональную группу. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида имеют общую формулу  $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$ , где  $R^A$  и  $R^B$  представляют собой R-группы двух смежных аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены способами, аналогичными описанным выше. Иллюстративные патенты США, в которых раскрыто получение конъюгатов РНК, включают, не ограничиваясь перечисленным, 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 и 5688941, 6294664, 6320017, 6576752, 6783931, 6900297, 7037646, 8106022, содержание каждого из которых включено в настоящий

документ посредством ссылки в полном объеме.

Не требуется, чтобы все положения в отдельно взятом соединении были модифицированы одинаково, и фактически в одно соединение или даже в один нуклеозид в иРНК может быть включено более одной из вышеупомянутых модификаций. Настоящее изобретение также включает соединения иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» соединения иРНК или «химеры» в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения иРНК, например, 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. Эти иРНК, как правило, содержат по меньшей мере одну область, где РНК модифицирована таким образом, чтобы придавать иРНК повышенную устойчивость к деградации нуклеазами, повышенное клеточное поглощение и/или повышенную аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью. Дополнительная область иРНК может служить субстратом для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. Например, РНКазы H представляют собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Таким образом, активация РНКазы H приводит к расщеплению РНК-мишени, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования экспрессии генов посредством иРНК. Следовательно, сопоставимые результаты часто могут быть получены с более короткими иРНК при использовании химерных дцРНК по сравнению с фосфоротиоатными дезокси-дцРНК, гибридирующимися с той же областью-мишенью. Расщепление РНК-мишени может быть обнаружено обычным способом с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, связанных методов гибридизации нуклеиновых кислот, известных из уровня техники.

В отдельных случаях РНК в составе иРНК может быть модифицирована группой, отличной от лиганда. Ряд молекул, отличных от лиганда, был конъюгирован с иРНК для усиления активности, клеточного распределения или клеточного поглощения иРНК, и процедуры выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. Такие фрагменты, отличные от лиганда, включают 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), тиоэфир, например, гексил-S-третилтиол (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например, додекандиоловые или ундецильные 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, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), полиаминовую или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантан-уксусную кислоту

(Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), или октадециламиновый или гексиламинокарбонилноксистероидный фрагмент (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Иллюстративные патенты США, в которых описано получение таких конъюгатов РНК, перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих аминокислотный линкер в одном или более положениях последовательности. Затем аминокислотную группу подвергают взаимодействию с конъюгируемой молекулой с использованием подходящих реагентов для сочетания или активации. Реакция конъюгации может быть проведена либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после отщепления РНК, в жидкой фазе. В результате очистки конъюгата РНК с помощью ВЭЖХ, как правило, получают чистый конъюгат.

## V. Доставка иРНК

Доставка иРНК нуждающемуся в этом субъекту может быть достигнута рядом различных способов. Доставку *in vivo* можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей иРНК, например, дцРНК. В качестве альтернативы, доставка может быть осуществлена опосредованно путем введения одного или более векторов, которые кодируют и управляют экспрессией иРНК. Эти альтернативы дополнительно обсуждаются ниже.

### A. Непосредственная доставка

В целом, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты может быть адаптирован для применения с иРНК (см., например, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO94/02595, которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Однако существует три фактора, которые важно учитывать для успешной доставки молекулы иРНК *in vivo*: (а) биологическая стабильность доставляемой молекулы, (б) предупреждение неспецифических эффектов и (в) накопление доставляемой молекулы в ткани-мишени. Неспецифические эффекты иРНК можно минимизировать путем локального введения, например, путем прямой инъекции или имплантации в ткань (в качестве неограничивающего примера, глаз) или местного введения препарата. Локальное введение в область обработки максимально увеличивает локальную концентрацию агента, ограничивает воздействие агента на системные ткани, которые в противном случае могут быть повреждены агентом или которые могут подвергнуться агенту деградации, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы иРНК. Несколько исследований показали успешный нокдаун продуктов генов при локальном введении иРНК. Например, было показано, что доставка дцРНК внутриглазным способом путем интравитреальной инъекции яванским макакам (Tolentino, MJ., *et al* (2004) *Retina* 24:132-138) и субретинальных инъекций мышам (Reich, SJ., *et al* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) предотвращают неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной дегенерации желтого пятна. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция дцРНК мышам уменьшает объем опухоли (Pille, J., *et al* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) и может продлить выживаемость мышей с опухолями (Kim, WJ., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., *et al* (2007) *Mol.*

*Ther.* 15:515-523). РНК-интерференция также оказалась успешной при локальной доставке в ЦНС путем 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 путем интраназального введения (Howard, KA., *et al.* (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., *et al.* (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Для системного введения иРНК для лечения заболевания РНК может быть модифицирована или, в качестве альтернативы, доставлена с помощью системы доставки лекарственных средств; оба способа направлены на предотвращение быстрой деградации дцРНК эндо- и экзонуклеазами *in vivo*.

Модификация РНК или фармацевтического носителя также может обеспечить нацеливание композиции иРНК на ткань-мишень и избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы иРНК могут быть модифицированы путем химической конъюгации с другими группами, например, липидной или углеводной группой, описанной в настоящем документе. Такие конъюгаты могут быть использованы для нацеливания иРНК на конкретные клетки, например, клетки печени, например, гепатоциты. Например, конъюгаты с GalNAc или липидные (например, LNP) составы могут быть использованы для нацеливания иРНК на конкретные клетки, например, клетки печени, например, гепатоциты.

Молекулы иРНК также могут быть модифицированы путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для усиления клеточного поглощения и предотвращения деградации. Например, иРНК, направленную против AroB, конъюгированную с липофильным холестериновым фрагментом, системно вводили мышам с достижением нокдауна мРНК ароВ как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J., *et al.* (2004) *Nature* 432:173-178). Было показано, что конъюгация иРНК с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регрессию опухоли в мышинной модели рака предстательной железы (McNamara, JO., *et al.* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления иРНК может быть доставлена с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы иРНК (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране для обеспечения эффективного поглощения иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связаны с иРНК, либо может быть индуцировано образование из них везикулы или мицеллы (см., например, Kim SH., *et al.* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которая включает в себе иРНК. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию иРНК при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов иРНК находятся в пределах способностей 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 включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, подходящих для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003), цитируемый выше; Verma, UN., *et al* (2003), цитируемый выше), олигофектамин, «твердые липидные частицы с нуклеиновой кислотой» (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 электронная публикация до печати; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидоамины (Tomalia, DA., *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления иРНК образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов описаны в патенте США № 7427605, который включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

#### *В. иРНК, кодируемые вектором*

В другом аспекте иРНК, нацеленная на CA2, может экспрессироваться с единиц транскрипции, вставленных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., *et al.*, публикацию международной заявки РСТ WO 00/22113, Conrad, публикацию международной заявки РСТ WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от нескольких часов до нескольких недель) или длительной (от нескольких недель до нескольких месяцев или дольше), в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа ткани-мишени или клетки-мишени. Эти трансгены могут быть введены в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, которые могут представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор. Трансген также может быть сконструирован так, чтобы позволить ему наследоваться в качестве внехромосомной плазмиды (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельная цепь или цепи иРНК могут быть транскрибированы с промотора в векторе экспрессии. Если необходима экспрессия двух отдельных цепей для получения, например, дцРНК, два отдельных вектора экспрессии могут быть совместно введены (например, посредством трансфекции или инфицирования) в клетку-мишень. В качестве альтернативы, каждая отдельная цепь дцРНК может транскрибироваться промоторами, оба из которых расположены на одной и той же плазмиде экспрессии. В некоторых вариантах осуществления дцРНК экспрессируется в виде инвертированного повтора, соединенного линкерной полинуклеотидной последовательностью таким образом, что дцРНК имеет структуру стебля и петли.

Вектор экспрессии иРНК обычно представляет собой ДНК-плазмиду или вирусный вектор. Вектор экспрессии, совместимый с эукариотическими клетками, например, с клетками позвоночных, может быть использован для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии иРНК, описанной в настоящем документе. Векторы

экспрессии в эукариотических клетках хорошо известны из уровня техники и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, такие векторы содержат подходящие сайты рестрикции для вставки требуемого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих иРНК, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в клетки-мишени, эксплантированные из пациента с последующим повторным введением пациенту, или с помощью любых других средств, которые позволяют осуществлять введение в желаемую клетку-мишень.

Плазмиду экспрессии иРНК можно трансфицировать в клетку-мишень в виде комплекса с катионным липидным носителем (например, олигофектаминол) или некатионным носителем на основе липидов (например, Transit-ТКО™). Также настоящее изобретение предусматривает множественные липидные трансфекции для опосредуемого иРНК нокдауна, нацеленного на различные области РНК-мишени, в течение периода, составляющего неделю или более. Успешное введение векторов в клетки-хозяева можно отслеживать с использованием различных известных способов. Например, сигнал в случае временной трансфекции может осуществляться с помощью репортера, такого как флуоресцентный маркер, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильную трансфекцию клеток *ex vivo* можно подтвердить с использованием маркеров, которые придают трансфицированной клетке устойчивость к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотики и лекарственные средства), например, устойчивость к гигромицину В.

Вирусные векторные системы, которые можно использовать в способах и композициях, описанных в настоящем документе, включают, не ограничиваясь перечисленным, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая, не ограничиваясь перечисленным, лентивирусные векторы, вирус лейкоза мышей Молони и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированных вирусов; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавирусов; (i) векторы на основе поксвирусов, такие как векторы на основе ортопоксвирусов, например, вируса осповакцины, или авипоксвирусов, например, вирусов оспы канареек и вируса оспы домашней птицы; и (j) хелпер-зависимый или «выпотрошенный» аденовирус. Также могут быть предпочтительными вирусы, дефектные по репликации. Различные векторы встраиваются или не встраиваются в геном клеток. При необходимости конструкции могут содержать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть встроена в векторы, способные к эписомальной репликации, например, векторы EPV и EBV. Конструкциям для рекомбинантной экспрессии иРНК обычно требуются регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т. д., для обеспечения экспрессии иРНК в клетках-мишенях. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, дополнительно описаны ниже.

Векторы, подходящие для доставки иРНК, будут включать регуляторные элементы (промотор, энхансер и т. д.), достаточные для экспрессии иРНК в желаемой клетке-мишени

или ткани-мишени. Регуляторные элементы могут быть выбраны для обеспечения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцибельной экспрессии.

Экспрессию иРНК можно точно регулировать, например, с использованием индуцибельной регуляторной последовательности, которая является чувствительной к определенным физиологическим регуляторам, например, циркулирующим уровням глюкозы или гормонам (Docherty *et al.*, 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Такие индуцибельные системы экспрессии, подходящие для контроля экспрессии дцРНК в клетках или в организме млекопитающих, включают, например, регуляцию экдизоном, эстрогеном, прогестероном, тетрациклином, химическими индукторами димеризации и изопропил-бета-D1-тиогалактопиранозидом (IPTG). Специалист в данной области способен выбрать подходящую регуляторную/промоторную последовательность, исходя из предполагаемого применения трансгена иРНК.

В конкретном варианте осуществления могут быть использованы вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК. Например, может быть использован ретровирусный вектор (см. Miller *et al.*, *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Эти ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие иРНК, клонируют в один или более векторов, что способствует доставке нуклеиновой кислоты пациенту. Более подробную информацию о ретровирусных векторах можно найти, например, в Voesen *et al.*, *Biotherapy* 6:291-302 (1994), где описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* в гемопоэтические стволовые клетки с целью повышения устойчивости стволовых клеток к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов для генной терапии, являются: Clowes *et al.*, *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem *et al.*, *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); и Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, рассматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе ВИЧ, описанные в патентах США № 6143520, 5665557 и 5981276, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Также для доставки иРНК предусмотрены аденовирусы. Аденовирусы являются особенно привлекательными носителями, например, для доставки генов в эпителий дыхательных путей. Аденовирусы естественным образом инфицируют дыхательный эпителий, где они вызывают заболевание легкой степени. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышцы. Аденовирусы обладают преимуществом, заключающимся в том, что они способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) представлен обзор генной терапии на основе аденовируса. Bout *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) продемонстрировали применение аденовирусных векторов для переноса гена в эпителий дыхательных путей макаков-резусов. Другие случаи применения аденовирусов в генной

терапии можно найти в Rosenfeld *et al.*, *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); публикации заявки PCT WO94/12649; и Wang, *et al.*, *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Подходящий AV-вектор для экспрессии иРНК согласно изобретению, способ конструирования рекомбинантного AV-вектора и способ доставки вектора в клетки-мишени, описаны в Xia H *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

Также предусмотрено применение векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (Walsh *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В некоторых вариантах осуществления иРНК может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных одноцепочечных молекул РНК из рекомбинантного AAV-вектора, имеющего, например, промоторы либо U6, либо H1 РНК, или промотор цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии дцРНК согласно изобретению, способы конструирования рекомбинантного AV-вектора и способы доставки векторов в клетки-мишени, описаны в Samulski R *et al.* (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J *et al.* (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski R *et al.* (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патенте США № 5139941; международной патентной заявке WO 94/13788 и международной патентной заявке WO 93/24641, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Другим типичным вирусным вектором является поксвирус, такой как вирус осповакцины, например ослабленный вирус осповакцины, такой как модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипоксвирус, такой как вирус оспы домашней птицы или вирус оспы канареек.

Тропизм вирусных векторов может быть модифицирован посредством псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов, или посредством замены различных белков капсида вируса, в зависимости от ситуации. Например, лентивирусные векторы могут быть псевдотипированы поверхностными белками из вируса везикулярного стоматита (VSV), бешенства, Эбола, Мокола и т. п. AAV-векторы могут быть нацелены на различные клетки с помощью модификации векторов методами инженерии для экспрессии различных серотипов капсидных белков; см., например, Rabinowitz J E *et al.* (2002), *J Virol* 76:791-801, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Фармацевтический препарат вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе, или он может включать матрикс с замедленным высвобождением, в который погружен носитель для доставки гена. В качестве альтернативы, если полный вектор для доставки генов может быть получен в интактном виде из рекомбинантных клеток, например, ретровирусные векторы, фармацевтический препарат может включать одну или более клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

## **VI. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК**

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложены

фармацевтические композиции, содержащие иРНК, описанную в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция, содержащая иРНК, применима для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью СА2 (например, глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой). Такие фармацевтические композиции составляют, исходя из способа доставки. В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены для локализованной доставки, например, путем доставки внутриглазным способом (например, интравитреального введения, например, интравитреальной инъекции; транссклерального введения, например, транссклеральной инъекции; субконъюнктивального введения, например, субконъюнктивальной инъекции; ретробульбарного введения, например, ретробульбарной инъекции; интракамерального введения, например, интракамеральной инъекции, или субретинального введения, например, субретинальной инъекции). В других вариантах осуществления композиции могут быть составлены для местной доставки. В другом примере композиции могут быть составлены для системного введения посредством парентеральной доставки, например, посредством внутривенной (в/в) доставки. В некоторых вариантах осуществления композиция, предложенная в настоящем документе (например, композиция, содержащая конъюгат GalNAc или состав LNP), составлена для внутривенной доставки.

Фармацевтические композиции, предложенные в настоящем документе, вводят в дозировке, достаточной для ингибирования экспрессии СА2. Как правило, подходящая доза иРНК будет находиться в диапазоне от 0,01 до 200,0 миллиграмма на килограмм массы тела реципиента в сутки. Фармацевтическая композиция может быть введена один раз в сутки, или иРНК может быть введена в виде двух, трех или более субдоз с соответствующими интервалами в течение дня или даже с применением непрерывной инфузии или доставки с помощью состава с контролируемым высвобождением. В этом случае количество иРНК, содержащееся в каждой субдозе, должно быть соответственно меньшим, чтобы обеспечить общую суточную дозировку. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, с применением традиционного состава с замедленным высвобождением, который обеспечивает замедленное высвобождение иРНК в течение нескольких дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области техники и особенно подходят для доставки агентов в определенный участок, как, например, их можно применять с агентами согласно настоящему изобретению. В этом варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее кратное суточной дозы.

Влияние разовой дозы на уровни СА2 может быть длительным, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней или с интервалами не более 1, 2, 3, 4, 12, 24 или 36 недель.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что определенные факторы могут влиять на дозировку и сроки, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, не ограничиваясь перечисленным, тяжесть заболевания или нарушения,

предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократное лечение или серию лечений. Оценки эффективных дозировок и периодов полужизни *in vivo* для отдельных иРНК, охватываемых настоящим изобретением, могут быть осуществлены с помощью традиционных методик или на основании тестирования *in vivo* с помощью подходящей животной модели.

Подходящая животная модель, например, мышь или яванский макак, например, животное, содержащее трансген, экспрессирующий СА2 человека, может быть использована для определения терапевтически эффективной дозы и/или эффективной схемы дозирования для введения миРНК к СА2.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают соединения иРНК, представленные в настоящем документе. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены рядом способов в зависимости от того, требуется ли локальное или системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть локальным (например, путем внутриглазной инъекции), местным (например, с помощью раствора глазных капель) или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное, например, посредством имплантированного устройства; или интракраниальное, например, посредством интрапаренхиматозного, интратекального или интравентрикулярного введения.

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или маслянистые основания, загустители и т. п. могут быть необходимыми или желательными. Также могут быть полезны покрытые презервативы, перчатки и т. п. Подходящие составы для местного применения включают составы, в которых иРНК, представленные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством 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, диолеилфосфатидил DOPC этаноламин, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеилфосфатидилэтанолламин DOTMA). иРНК, представленные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы, иРНК могут образовывать комплекс с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, не ограничиваясь перечисленным, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту,

эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C<sub>1-20</sub> алкиловый сложный эфир (например, изопропилмиристат ИРМ), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

#### *А. Липосомальные составы*

Существует множество организованных поверхностно-активных структур помимо микроэмульсий, которые были изучены и использованы для составления рецептур лекарственных средств. Они включают монослои, мицеллы, бислои и везикулы. Везикулы, такие как липосомы, вызывали большой интерес из-за их специфичности и продолжительности действия, которые они предлагают с точки зрения доставки лекарственных средств. В контексте настоящего документа термин «липосома» означает везикулу, состоящую из амфифильных липидов, расположенных в сферическом бислое или бислоях.

Липосомы представляют собой однослойные или многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю среду. Водная часть содержит композицию, подлежащую доставке. Катионные липосомы обладают преимуществом, заключающимся в способности связываться с клеточной стенкой. Некатионные липосомы, хотя и не способны так эффективно сливаться с клеточной стенкой, поглощаются макрофагами *in vivo*.

Для того, чтобы пройти через интактную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проходить через ряд тонких пор, каждая из которых имеет диаметр менее 50 нм, под действием подходящего трансдермального градиента. Следовательно, желательно использовать липосому, которая является высокодеформируемой и способной проходить через такие тонкие поры.

Дополнительные преимущества липосом включают: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразлагаемыми; липосомы могут включать широкий диапазон растворимых в воде и липидах лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные лекарственные средства в их внутренних компартментах от метаболизма и деградации (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 245). Важными аспектами получения составов на основе липосом являются поверхностный заряд липидов, размер везикулы и объем водного раствора в липосомах.

Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов в место действия. Поскольку липосомальная мембрана структурно схожа с биологическими мембранами, когда липосомы наносят на ткань, липосомы начинают объединяться с клеточными мембранами, и по мере прогрессирования объединения липосомы и клетки содержащее липосомы опустошается в клетку, где может проявлять свое действие

активный агент.

Липосомальные составы были предметом всестороннего исследования в качестве способа доставки многих лекарственных средств. Существует все больше доказательств того, что для местного введения липосомы обладают несколькими преимуществами по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженные побочные действия, связанные с высокой системной абсорбцией вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в желаемой мишени и способность вводить широкий спектр лекарственных средств, как гидрофильных, так и гидрофобных, в кожу.

В нескольких источниках подробно описана способность липосом доставлять агенты, в том числе высокомолекулярную ДНК, в кожу. В кожу вводили соединения, в том числе анальгетики, антитела, гормоны и высокомолекулярные ДНК. Большинство применений приводило к нацеливанию на верхний эпидермис.

Липосомы делятся на два широких класса. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами ДНК с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс ДНК/липосома связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализируется в эндосому. Вследствие кислотного pH внутри эндосомы липосомы разрушаются, высвобождая свое содержимое в цитоплазму клеток (Wang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Липосомы, которые являются чувствительными к pH или отрицательно заряженными, захватывают ДНК, а не образуют с ней комплекс. Поскольку как ДНК, так и липид заряжены одинаково, происходит отталкивание, а не образование комплекса. Тем не менее, некоторая часть ДНК захватывается в водной внутренней части этих липосом. Липосомы, чувствительные к pH, использовали для доставки ДНК, кодирующей ген тимидинкиназы, в клеточные монослои в культуре. В клетках-мишенях была обнаружена экспрессия экзогенного гена (Zhou *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Один основной тип липосомальной композиции включает фосфолипиды, отличные от полученного из природного источника фосфатидилхолина. Композиции нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции анионных липосом обычно образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы главным образом из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомальной композиции образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, соевый PC и яичный PC. Другой тип образован из смесей фосфолипида, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

В нескольких исследованиях оценивали местную доставку липосомальных лекарственных составов в кожу. Нанесение липосом, содержащих интерферон, на кожу морской свинки приводило к уменьшению количества герпетических язв на коже, тогда как доставка интерферона другими способами (например, в виде раствора или в виде эмульсии)

была неэффективной (Weiner *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Кроме того, в дополнительном исследовании тестировали эффективность интерферона, вводимого в качестве части липосомального состава, при введении интерферона с помощью водной системы, и пришли к выводу, что липосомальный состав превосходил введение водного раствора (du Plessis *et al.*, *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

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 (глицерил дилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерил дистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), применяли для доставки циклоспорина А в дерму кожи мыши. Результаты показали, что такие неионогенные липосомальные системы были эффективными в облегчении отложения циклоспорина А в различные слои кожи (Hu *et al.* *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 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 продолжительности пребывания в кровотоке по сравнению с липосомами, в которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами стерически стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть липидной части, образующей везикулу, липосомы (А) содержит один или более гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид  $G_{M1}$ , или (В) дериватизирована одним или более гидрофильными полимерами, такими как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. 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 (RES) (Allen *et al.*, *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu *et al.*, *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

Различные липосомы, содержащие один или более гликолипидов, известны из уровня техники. Parahadjopoulos *et al.* (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) сообщали о способности моносиалоганглиозидов  $G_{M1}$ , галактоцереброзида сульфата и фосфатидилинозита улучшать периоды полужизни липосом в крови. Эти результаты были интерпретированы Gabizon *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, авторами обоих из которых являются Allen и соавт., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид  $G_{M1}$  или сложный эфир галактоцереброзида сульфата. 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.*).

Многие липосомы, содержащие липиды, дериватизированные одним или более

гидрофильными полимерами, и способы их получения известны из уровня техники. Sunamoto *et al.* (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) описали липосомы, содержащие неионогенный детергент, 2С 1215G, который содержит PEG-компонент. Illum *et al.* (FEBS Lett., 1984, 167, 79) отметили, что гидрофильное покрытие частиц полистирола полимерными гликолями приводит к значительно увеличенным периодам полужизни в крови. Синтетические фосфолипиды, модифицированные путем присоединения карбоксильных групп полиалкиленгликолей (например, PEG), описаны Sears (патенты США № 4426330 и 4534899). Klibanov *et al.* (FEBS Lett., 1990, 268, 235) описали эксперименты, демонстрирующие, что липосомы, содержащие фосфатидилэтаноламин (PE), дериватизированный PEG или стеаратом PEG, характеризуются значительным увеличением периодов полужизни в кровотоке. Blume *et al.* (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) распространили эти наблюдения на другие PEG-дериватизированные фосфолипиды, например, DSPE-PEG, образованные из комбинации дистеароилфосфатидилэтаноламина (DSPE) и PEG. Липосомы, содержащие ковалентно связанные фрагменты PEG на своей внешней поверхности, описаны в европейском патенте EP 0445131 B1 и WO 90/04384, автором которых является Fisher. Композиции на основе липосом, содержащие 1-20 молярных процентов PE, дериватизированных PEG, и способы их применения описаны Woodle *et al.* (патенты США № 5013556 и 5356633) и Martin *et al.* (патент США № 5213804 и европейский патент EP 0496813 B1). Липосомы, содержащие ряд других конъюгатов липид-полимер, раскрыты в WO 91/05545 и патенте США № 5225212 (авторами обоих из которых являются Martin и соавт.), и в WO 94/20073 (Zalipsky *et al.*). Липосомы, содержащие PEG-модифицированные керамидные липиды, описаны в WO 96/10391 (Choi *et al.*). В патенте США № 5540935 (Miyazaki *et al.*) и патенте США № 5556948 (Tagawa *et al.*) описаны PEG-содержащие липосомы, которые могут быть дополнительно дериватизированы функциональными фрагментами на их поверхностях.

В данной области техники известен ряд липосом, содержащих нуклеиновые кислоты. В WO 96/40062, авторами которой являются Thierry и соавт., раскрыты способы инкапсуляции высокомолекулярных нуклеиновых кислот в липосомы. В патенте США № 5264221, авторами которого являются Tagawa и соавт., раскрыты связанные с белком липосомы и утверждается, что содержимое таких липосом может включать дцРНК. В патенте США № 5665710, авторами которого являются Rahman и соавт., описаны определенные способы инкапсуляции олигодезоксинуклеотидов в липосомы. В WO 97/04787, авторами которой являются Love и соавт., раскрыты липосомы, содержащие дцРНК, нацеленные на ген *gaf*.

Трансферосмы представляют собой еще один тип липосом и представляют собой высокодеформируемые липидные агрегаты, которые являются привлекательными кандидатами в качестве носителей для доставки лекарственных средств. Трансферосмы могут быть описаны как липидные капли, которые являются настолько высокодеформируемыми, что они способны без труда проникать через поры, размер которых меньше капли. Трансферосмы адаптируются к окружающей среде, в которой их

используют, например, они являются самооптимизирующимися (адаптивными к форме пор в коже), самовосстанавливающимися, часто достигают своих мишеней без фрагментации, и часто являются самонагружающимися. Для получения трансферсом можно добавлять активаторы поверхности, особенно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомальной композиции. Трансферсомы использовали для доставки сывороточного альбумина в кожу. Было показано, что опосредованная трансферосомами доставка сывороточного альбумина является столь же эффективной, как и подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (в том числе микроэмульсии) и липосомы. Наиболее распространенным способом классификации и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, является использование гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как «голова») обеспечивает наиболее подходящее средство для классификации различных поверхностно-активных веществ, используемых в составах (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, стр. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не является ионизированной, 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 приблизительно 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. Неионогенные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-полимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее популярными представителями 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, ациламидаминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и 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 широко используемыми представителями этого класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью переносить либо положительный, либо 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 средствах, составах и эмульсиях (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., 1988, стр. 285).

#### *В. Частицы нуклеиновая кислота-липид*

В некоторых вариантах осуществления дцРНК CA2, представленная в настоящем изобретении, полностью инкапсулирована в липидный состав, например, с образованием SPLP, pSPLP, SNALP или другой частицы нуклеиновая кислота-липид. SNALP и SPLP, как правило, содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частицы (например, конъюгат PEG-липид). SNALP и SPLP являются чрезвычайно эффективными для системных применений, поскольку они характеризуются увеличенным сроком пребывания в кровотоке после внутривенной (в/в) инъекции и накапливаются в дистальных областях (например, областях, физически отделенных от места введения). SPLP включают «pSPLP», который включает инкапсулированный комплекс конденсирующий агент-нуклеиновая кислота, описанный в публикации заявки РСТ WO 00/03683. Частицы согласно настоящему изобретению, как правило, характеризуются средним диаметром от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, чаще от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, чаще от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм, чаще всего от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, и являются по существу нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, при их наличии в частицах нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению, являются устойчивыми в водном растворе к деградации нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США № 5976567, 5981501, 6534484, 6586410, 6815432; и публикации заявки РСТ WO 96/40964.

В некоторых вариантах осуществления соотношение липид/лекарственное средство (соотношение мас./мас.) (например, соотношение липид/дцРНК) будет находиться в диапазоне от приблизительно 1:1 до приблизительно 50:1, от приблизительно 1:1 до приблизительно 25:1, от приблизительно 3:1 до приблизительно 15:1, от приблизительно 4:1 до приблизительно 10:1, от приблизительно 5:1 до приблизительно 9:1 или от приблизительно 6:1 до приблизительно 9:1.

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP), хлорид N-(1-(2,3-

диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-(2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлорид 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.C1), хлорид 1,2-дилинолеоил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.C1), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N,N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N, N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазепандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может составлять от приблизительно 20 мол.% до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего количества липида, присутствующего в частице.

В некоторых вариантах осуществления для получения наночастиц липид-миРНК может быть использовано соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США № 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления частица липид-миРНК содержит 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана: 10% DSPC: 40% холестерина: 10% PEG-C-DOMG (молярный процент) с размером частиц  $63,0 \pm 20$  нм и соотношением миРНК/липид 0,027.

Некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, включая, не ограничиваясь перечисленным, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеил-фосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь.

Некатионный липид может составлять от приблизительно 5 мол.% до приблизительно 90 мол.%, приблизительно 10 мол.% или приблизительно 58 мол.%, если включен холестерин, от общего количества липида, присутствующего в частице.

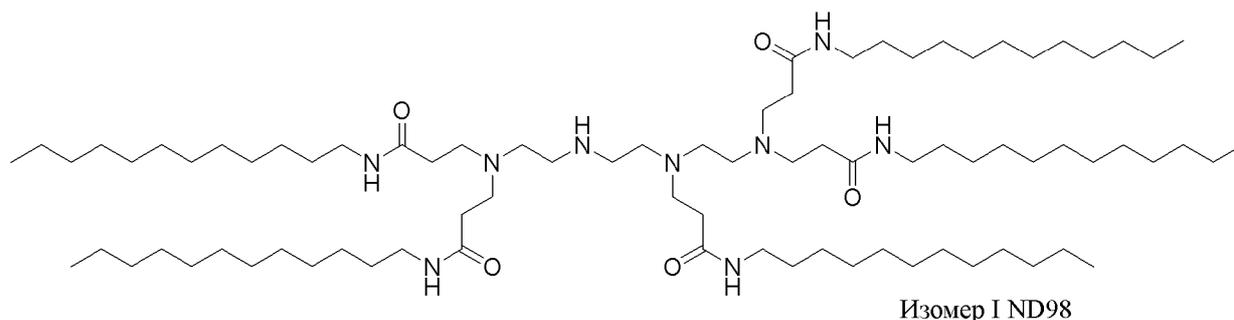
Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может представлять собой, например, полиэтиленгликоль (PEG)-липид, включая, не ограничиваясь перечисленным, PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил (C<sub>12</sub>), PEG-димиристилоксипропил (C<sub>14</sub>), PEG-дипальмитилоксипропил (C<sub>16</sub>) или PEG-дистеарилоксипропил (C<sub>18</sub>). Конъюгированный липид, который предотвращает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол.% до приблизительно 20 мол.% или приблизительно 2 мол.% от общего количества липида, присутствующего в частице.

В некоторых вариантах осуществления частица нуклеиновая кислота-липид дополнительно содержит холестерин в количестве, например, от приблизительно 10 мол.% до приблизительно 60 мол.% или приблизительно 48 мол.% от общего количества липида, присутствующего в частице.

В некоторых вариантах осуществления иРНК составлена в виде липидной наночастицы (LNP).

#### *LNP01*

В некоторых вариантах осуществления для получения наночастиц липид-дцРНК (например, частиц LNP01) может быть использован липидоид ND98·4HCl (MW 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26.03.2008, которая включена в настоящий документ посредством ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids). Исходные растворы каждого в этаноле могут быть получены следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Исходные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 затем могут быть объединены, например, в молярном соотношении 42:48:10. Объединенный раствор липидов может быть смешан с водным раствором дцРНК (например, в ацетате натрия, pH 5) таким образом, чтобы конечная концентрация этанола составляла приблизительно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла приблизительно 100-300 мМ. Наночастицы липид-дцРНК, как правило, образуются спонтанно при смешивании. В зависимости от требуемого распределения частиц по размерам полученную смесь наночастиц можно экструдировать через поликарбонатную мембрану (например, с отсечкой 100 нм) с применением, например, термического барабанного экструдера, такого как экструдер Lipex (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадия экструзии может быть исключена. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть проведены, например, посредством диализа или тангенциальной поточной фильтрации. Буфер может быть заменен, например, натрий-фосфатным буфером (PBS) при приблизительно pH 7, например, приблизительно pH 6,9, приблизительно pH 7,0, приблизительно pH 7,1, приблизительно pH 7,2, приблизительно pH 7,3 или приблизительно pH 7,4.



### Формула I

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки WO 2008/042973, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы на основе липида и дцРНК представлены в следующей таблице 1.

**Таблица 1. Иллюстративные липидные составы**

	<b>Катионный липид</b>	<b>катионный липид/некатионный липид/холестерин/ конъюгат PEG-липид Соотношение липид:миРНК</b>
SNALP	1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:миРНК ~ 7:1
S-XTC	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DPPC/Холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:миРНК ~ 7:1
LNP05	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миРНК ~ 6:1
LNP06	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миРНК ~ 11:1
LNP07	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миРНК ~ 6:1

LNP08	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миРНК ~ 11:1
LNP09	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК 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:миРНК 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (C12-200)	C12-200/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/Хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Хол/PEG-DMG 40/15/40/5 Липид:миРНК: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Хол/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Липид:миРНК: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК: 7:1

LNP17	MC3	MC3/DSPC/Хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Хол/PEG-DMG 50/10/35/5 Липид:миРНК: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Хол/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК: 7:1
LNP22	ХТС	ХТС/DSPC/Хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Липид:миРНК: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин

DPPE: дипальмитоилфосфатидилхолин

PEG-DMG: PEG-димиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средней молекулярной массой 2000)

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средней молекулярной массой 2000)

PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристилоксипропиламин (PEG со средней молекулярной массой 2000)

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации WO2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Составы, содержащие ХТС, описаны, например, в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/148366, поданной 29 января 2009 г.; предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/156851, поданной 2 марта 2009 г.; предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/185712, поданной 10 июня 2009 г.; предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/228373, поданной 24 июля 2009 г.; предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/239686, поданной 3 сентября 2009 г., и международной заявке PCT/US2010/022614, поданной 29 января 2010 г., которые настоящим включены

посредством ссылки.

Составы, содержащие МСЗ, описаны, например, в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/244834, поданной 22 сентября 2009 г., предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/185800, поданной 10 июня 2009 г., и международной заявке PCT/US10/28224, поданной 10 июня 2010 г., которые настоящим включены посредством ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны, например, в международной патентной заявке PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 г., которая настоящим включена посредством ссылки.

Составы, содержащие C12-200, описаны в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/175770, поданной 5 мая 2009 г., и международной заявке PCT/US10/33777, поданной 5 мая 2010 г., которые настоящим включены посредством ссылки.

### *С. Синтез катионных липидов*

Любое из соединений, например, катионных липидов и т. п., используемых в частицах нуклеиновая кислота-липид, представленных в настоящем изобретении, может быть получено с помощью известных методик органического синтеза. Все заместители являются такими, как определено ниже, если не указано иное.

«Алкил» означает неразветвленный или разветвленный, нециклический или циклический, насыщенный алифатический углеводород, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Иллюстративные насыщенные неразветвленные алкилы включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т. п.; в то время как насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, *втор*-бутил, изобутил, *трет*-бутил, изопентил и т. п. Иллюстративные насыщенные циклические алкилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т. п.; тогда как ненасыщенные циклические алкилы включают циклопентенил и циклогексенил, и т. п.

«Алкенил» означает алкил, как определено выше, содержащий по меньшей мере одну двойную связь между смежными атомами углерода. Алкенилы включают как *цис*-, так и *транс*-изомеры. Иллюстративные неразветвленные и разветвленные алкенилы включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т. п.

«Алкинил» означает любой алкил или алкенил, как определено выше, который дополнительно содержит по меньшей мере одну тройную связь между смежными атомами углерода. Иллюстративные неразветвленные и разветвленные алкинилы включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т. п.

«Ацил» означает любой алкил, алкенил или алкинил, где углерод в точке присоединения замещен оксогруппой, как определено ниже. Например, -C(=O)алкил, -C(=O)алкенил и -C(=O)алкинил представляют собой ацильные группы.

Термин «гетероцикл» означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное

бициклическое гетероциклическое кольцо, которое является насыщенным, ненасыщенным или ароматическим и которое содержит от 1 или 2 гетероатомов, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизован, включая бициклические кольца, в которых любой из вышеуказанных гетероциклов слит с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен посредством любого гетероатома или атома углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, как определено ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамыл, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и т. п.

Термины «необязательно замещенный алкил», «необязательно замещенный алкенил», «необязательно замещенный алкинил», «необязательно замещенный ацил» и «необязательно замещенный гетероцикл» означают, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменен заместителем. В случае оксозаместителя (=O) заменены два атома водорода. В этой связи заместители включают оксо, галоген, гетероцикл,  $-CN$ ,  $-OR^x$ ,  $-NR^xR^y$ ,  $-NR^xC(=O)R^y$ ,  $-NR^xSO_2R^y$ ,  $-C(=O)R^x$ ,  $-C(=O)OR^x$ ,  $-C(=O)NR^xR^y$ ,  $-SO_nR^x$  и  $-SO_nNR^xR^y$ , где  $n$  равен 0, 1 или 2,  $R^x$  и  $R^y$  являются одинаковыми или разными и независимо представляют собой водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных алкильных и гетероциклических заместителей может быть дополнительно замещен одним или более из оксо, галогена,  $-OH$ ,  $-CN$ , алкила,  $-OR^x$ , гетероцикла,  $-NR^xR^y$ ,  $-NR^xC(=O)R^y$ ,  $-NR^xSO_2R^y$ ,  $-C(=O)R^x$ ,  $-C(=O)OR^x$ ,  $-C(=O)NR^xR^y$ ,  $-SO_nR^x$  и  $-SO_nNR^xR^y$ .

«Галоген» означает фтор, хлор, бром и иод.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем изобретении, могут потребовать применения защитных групп. Методика применения защитных групп хорошо известна специалистам в данной области техники (см., например, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. *et al.*, Wiley-Interscience, New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего изобретения представляют собой любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональной группы. Защитная группа может быть добавлена к функциональной группе для маскирования ее реакционной способности во время определенных реакций, а затем удалена с получением исходной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления применяют «защитную группу спирта». «Защитная группа спирта» представляет собой любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную реакционную способность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавлять и удалять с помощью методик, хорошо известных из уровня техники.

Синтез формулы А

В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид,

представленные в настоящем изобретении, составлены с использованием катионного

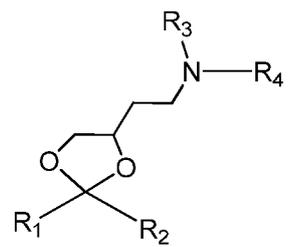
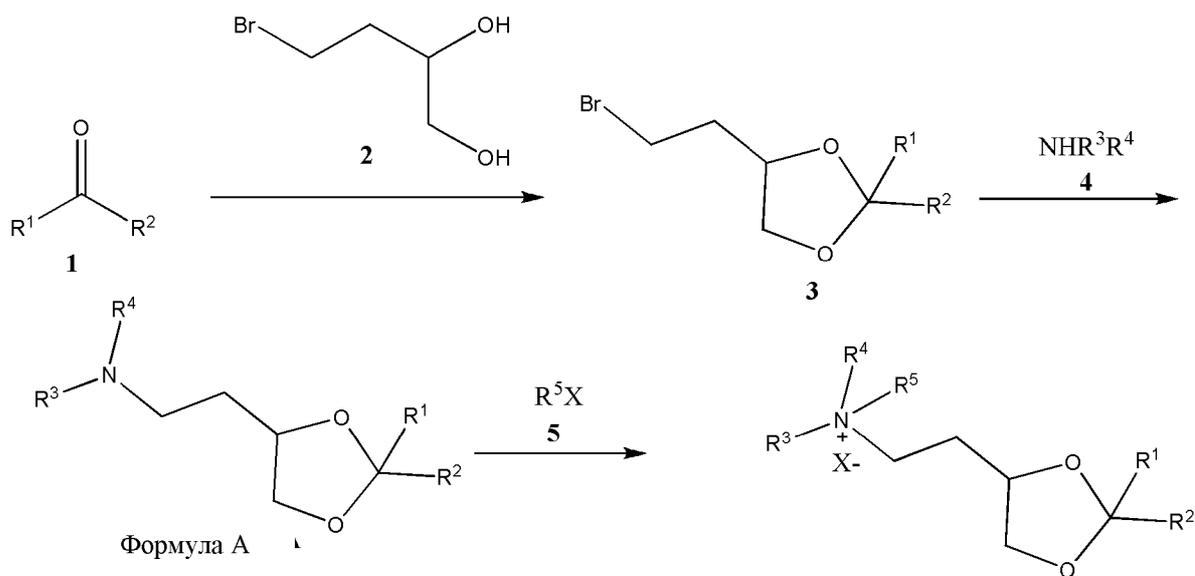
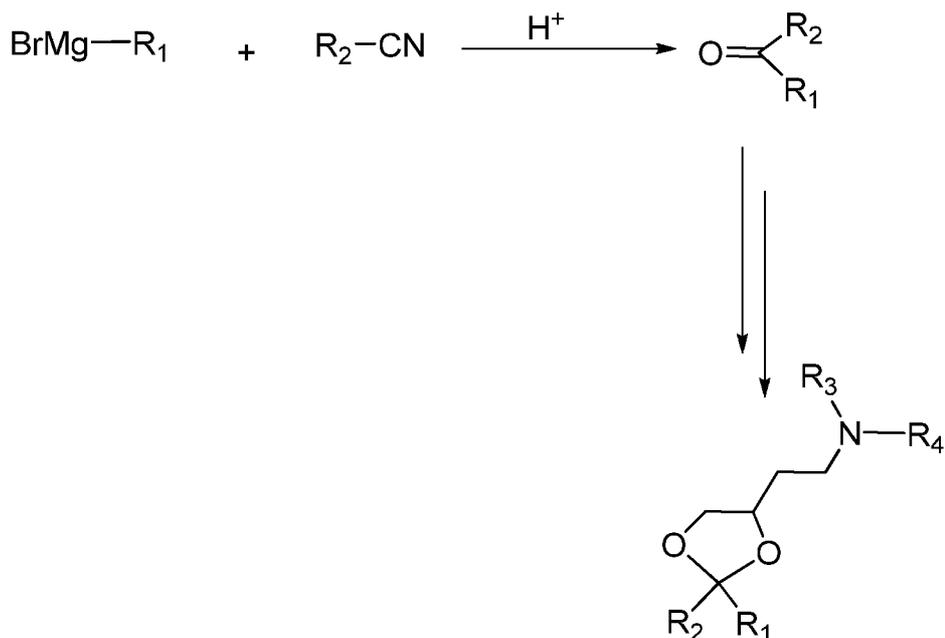
липид формулы А: , где R1 и R2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, каждый из которых необязательно может быть замещен, и R3 и R4 независимо представляют собой низший алкил, или R3 и R4 могут быть взяты вместе с образованием необязательно замещенного гетероциклического кольца. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой ХТС (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан). В целом, липид формулы А выше может быть получен по следующим схемам реакции 1 или 2, где все заместители являются такими, как определено выше, если не указано иное.

Схема 1



Липид А, где R1 и R2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, каждый из которых необязательно может быть замещен, и R3 и R4 независимо представляют собой низший алкил, или R3 и R4 могут быть взяты вместе с образованием необязательно замещенного гетероциклического кольца, может быть получен в соответствии со схемой 1. Кетон 1 и бромид 2 могут быть приобретены или получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники. Реакция 1 и 2 приводит к получению кетала 3. Обработка кетала 3 амином 4 приводит к получению липидов формулы А. Липиды формулы А могут быть преобразованы в соответствующую соль аммония с помощью органической соли формулы 5, где X представляет собой анионный противоион, выбранный из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата и т. п.

Схема 2



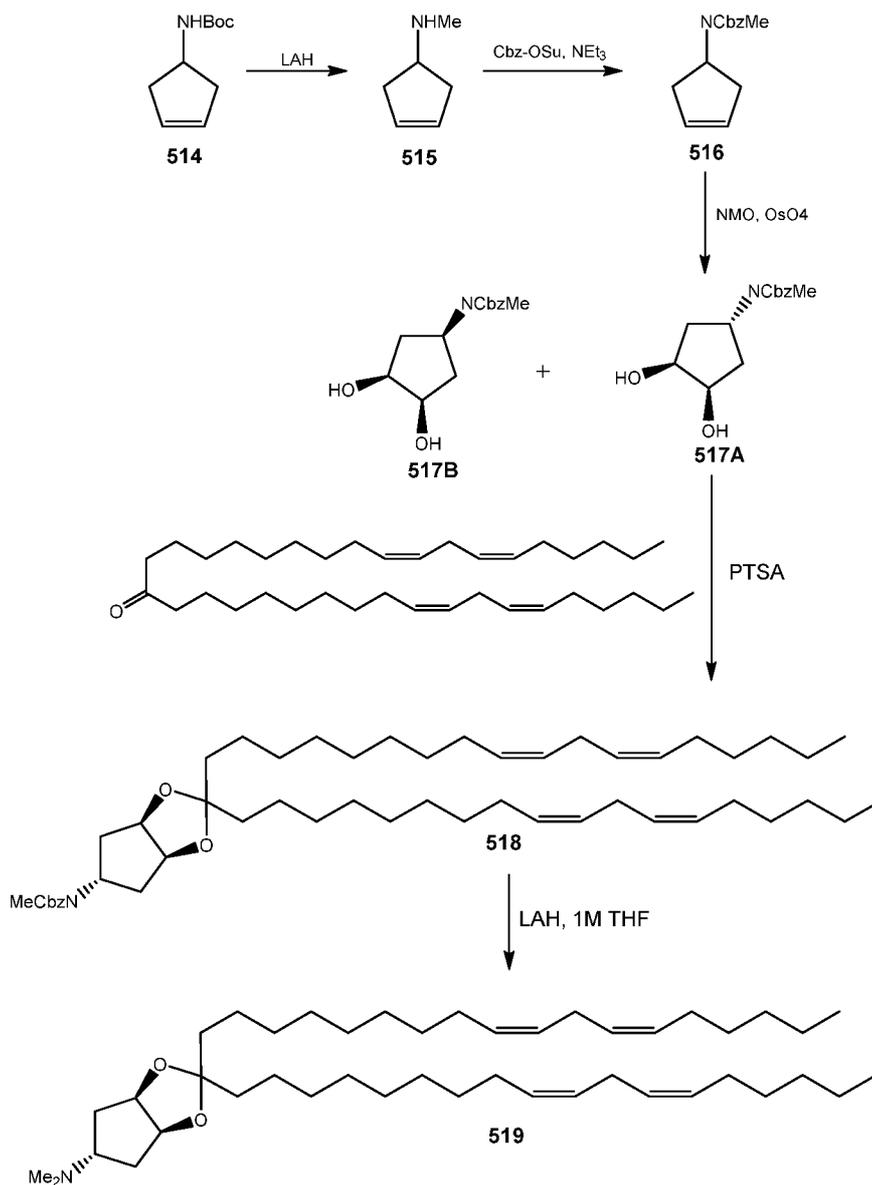
В качестве альтернативы, исходное вещество кетона 1 может быть получено в соответствии со схемой 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 могут быть приобретены или получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники. Реакция 6 и 7 приводит к получению кетона 1. Превращение кетона 1 в соответствующие липиды формулы А происходит, как описано на схеме 1.

#### Синтез МС3:

Получение DLin-M-C3-DMA (т. е. (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата) осуществляли следующим образом. Раствор (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ола (0,53 г), гидрохлорида 4-N, N-диметиламиномасляной кислоты (0,51 г), 4-N, N-диметиламинопиридина (0,61 г) и гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной соляной кислотой с последующим разбавлением водным раствором бикарбоната натрия. Органические фракции сушили над безводным сульфатом магния, фильтровали и удаляли растворитель на роторном испарителе. Остаток пропускали через колонку с силикагелем (20 г) с использованием градиента элюирования 1-5% метанола/дихлорметана. Фракции, содержащие очищенный продукт, объединяли и удаляли растворитель с получением бесцветного масла (0,54 г).

#### Синтез ALNY-100:

Синтез кетала 519 [ALNY-100] проводили по следующей схеме 3:



#### Синтез 515:

К перемешиваемой суспензии LiAlH<sub>4</sub> (3,74 г, 0,09852 моль) в 200 мл безводного ТГФ в двухгорлой круглодонной колбе (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моль) в 70 мл ТГФ при 0°С в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и затем кипятили с обратным холодильником в течение 4 часов. За ходом реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции (по данным ТСХ) смесь охлаждали до 0°С и гасили, осторожно добавляя насыщенный раствор Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали ТГФ. Фильтрат и промывочные растворы смешивали и разбавляли 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl, и перемешивали в течение 20 минут при комнатной температуре. Летучие вещества удаляли под вакуумом с получением гидрохлоридной соли 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г. <sup>1</sup>H-ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ=9,34 (ушир., 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

#### Синтез 516:

К перемешиваемому раствору соединения 515 в 100 мл сухого ДХМ в двухгорлой круглодонной колбе на 250 мл добавляли  $\text{NEt}_3$  (37,2 мл, 0,2669 моль) и охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимид (20 г, 0,08007 моль) в 50 мл сухого ДХМ оставляли реакционную смесь нагреваться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч по данным ТСХ) смесь последовательно промывали 1 н. раствором  $\text{HCl}$  ( $1 \times 100$  мл) и насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $1 \times 50$  мл). Затем органический слой сушили над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и выпаривали растворитель с получением неочищенного вещества, которое очищали с помощью колоночной хроматографии на силикагеле с получением 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц):  $\delta=7,36-7,27(\text{m}, 5\text{H})$ ,  $5,69(\text{s}, 2\text{H})$ ,  $5,12(\text{s}, 2\text{H})$ ,  $4,96(\text{uшир.}, 1\text{H})$ ,  $2,74(\text{s}, 3\text{H})$ ,  $2,60(\text{m}, 2\text{H})$ ,  $2,30-2,25(\text{m}, 2\text{H})$ . ЖХ-МС  $[\text{M}+\text{H}]^-$  -232,3 (96,94%).

Синтез 517А и 517В:

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в одногорлой круглодонной колбе на 500 мл и добавляли к нему N-метилморфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), затем 4,2 мл 7,6% раствора  $\text{OsO}_4$  (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~ 3 ч) смесь гасили путем добавления твердого  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  и перемешивали полученную смесь в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли ДХМ (300 мл) и промывали водой ( $2 \times 100$  мл), затем насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $1 \times 50$  мл), водой ( $1 \times 30$  мл) и, наконец, рассолом ( $1 \times 50$  мл). Органическую фазу высушивали над безводным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  и удаляли растворитель в вакууме. В результате хроматографической очистки неочищенного вещества на колонке с силикагелем получали смесь диастереомеров, которые разделяли с помощью препаративной ВЭЖХ. Выход: - 6 г неочищенного вещества.

517А - Пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%).  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{DMSO}$ , 400 МГц):  $\delta=7,39-7,31(\text{m}, 5\text{H})$ ,  $5,04(\text{s}, 2\text{H})$ ,  $4,78-4,73(\text{m}, 1\text{H})$ ,  $4,48-4,47(\text{d}, 2\text{H})$ ,  $3,94-3,93(\text{m}, 2\text{H})$ ,  $2,71(\text{s}, 3\text{H})$ ,  $1,72-1,67(\text{m}, 4\text{H})$ . ЖХ-МС -  $[\text{M}+\text{H}]^-$ -266,3,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -283,5 присутствует, ВЭЖХ-97,86%. Стереохимия подтверждена с помощью рентгеноструктурного анализа.

Синтез 518:

С помощью способа, аналогичного описанному для синтеза соединения 505, получали соединение 518 (1,2 г, 41%) в виде бесцветного масла.  $^1\text{H}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ , 400 МГц):  $\delta=7,35-7,33(\text{m}, 4\text{H})$ ,  $7,30-7,27(\text{m}, 1\text{H})$ ,  $5,37-5,27(\text{m}, 8\text{H})$ ,  $5,12(\text{s}, 2\text{H})$ ,  $4,75(\text{m}, 1\text{H})$ ,  $4,58-4,57(\text{m}, 2\text{H})$ ,  $2,78-2,74(\text{m}, 7\text{H})$ ,  $2,06-2,00(\text{m}, 8\text{H})$ ,  $1,96-1,91(\text{m}, 2\text{H})$ ,  $1,62(\text{m}, 4\text{H})$ ,  $1,48(\text{m}, 2\text{H})$ ,  $1,37-1,25(\text{br m}, 36\text{H})$ ,  $0,87(\text{m}, 6\text{H})$ . ВЭЖХ-98,65%.

Общая процедура синтеза соединения 519:

Раствор соединения 518 (1 экв.) в гексане (15 мл) добавляли по каплям к ледяному раствору алюмогидрида лития в ТГФ (1 М, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при  $40^\circ\text{C}$  в течение 0,5 ч, затем снова охлаждали на ледяной бане. Смесь осторожно гидролизовали насыщенным водным раствором  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , затем фильтровали через целит и восстанавливали до масла. С помощью колоночной хроматографии получали чистое 519 (1,3 г, 68%), которое было получено в виде бесцветного масла.  $^{13}\text{C}$  ЯМР=130,2,

130,1 (x2), 127,9 (x3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (x2), 29,7, 29,6 (x2), 29,5 (x3), 29,3 (x2), 27,2 (x3), 25,6, 24,5, 23,3, 226, 14,1; МС с электроспрей-ионизацией (+ve): Молекулярная масса для C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>NO<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup> расщ. 654,6, найдено 654,6.

Составы, полученные с помощью либо стандартного способа, либо способа без экструзии, можно охарактеризовать аналогичным образом. Например, составы, как правило, характеризуют при помощи визуального осмотра. Они должны представлять собой беловатые полупрозрачные растворы, не содержащие агрегатов или осадка. Размер частиц и распределение частиц по размерам липида-наночастиц могут быть измерены путем рассеяния света с использованием, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Малверн, США). Размер частиц должен составлять приблизительно 20-300 нм, например, 40-100 нм. Распределение частиц по размерам должно быть одномодальным. Общую концентрацию дцРНК в составе, а также захваченную фракцию оценивают методом исключения красителя. Образец состава дцРНК может быть инкубирован с РНК-связывающим красителем, таким как Ribogreen (Molecular Probes), в присутствии или в отсутствие поверхностно-активного вещества, разрушающего состав, например, 0,5% Triton-X100. Общее содержание дцРНК в составе можно определить по сигналу от образца, содержащего поверхностно-активное вещество, относительно стандартной кривой. Захваченную фракцию определяют путем вычитания содержания «свободной» дцРНК (измеренного по сигналу в отсутствие поверхностно-активного вещества) из общего содержания дцРНК. Процент захваченной дцРНК обычно составляет >85%. Для состава SNALP размер частиц составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон, как правило, составляет от приблизительно 50 нм до приблизительно 110 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 100 нм или от приблизительно 80 нм до приблизительно 90 нм.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, желатиновые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Могут быть желательны загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие добавки или связующие. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального применения представляют собой составы, в которых дцРНК, представленные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или более усилителями проникновения, поверхностно-активными и хелатирующими агентами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или сложные эфиры или их соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли включают хенодезоксихоловую кислоту (CDCA) и урсодезоксихенодесоксихоловую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихоловую кислоту, глухолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихоловую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихоловую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные

кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации усилителей проникновения, например, жирные кислоты/соли в комбинации с желчными кислотами/солями. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновая кислота и UDCA. Дополнительные усилители проникновения включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. дцРНК, представленные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в гранулированной форме, включая высушенные распылением частицы, или в комплексе с образованием микрочастиц или наночастиц. Образующие комплексы с дцРНК агенты включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксиэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; производные полииминов с DEAE, пуллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие агенты включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинметилэтилен Р (TDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D, L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной кислоты с гликолевой кислотой (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы для перорального применения для дцРНК и их получение подробно описаны в патенте США № 6887906, публикации заявки на патент США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхимального (в головной мозг), интратекального, интравитреального, субретинального, транссклерального, субконъюнктивального, ретробульбарного, интракамерального, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, не ограничиваясь перечисленным, усилители проникновения, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, не ограничиваясь перечисленным, растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции могут быть получены из множества компонентов, которые включают, не ограничиваясь перечисленным, предварительно образованные жидкости,

самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества.

Фармацевтические составы, представленные в настоящем изобретении, которые могут быть удобно представлены в стандартной лекарственной форме, могут быть получены в соответствии с традиционными методиками, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим носителем (носителями) или вспомогательным веществом (вспомогательными веществами). Как правило, составы приготавливают посредством равномерного приведения активных ингредиентов в тесный контакт с жидкими носителями или мелкоизмельченными твердыми носителями, или с обоими из них, а затем, если необходимо, придания продукту формы.

Композиции, представленные в настоящем изобретении, могут быть составлены в любую из многих возможных лекарственных форм, таких как, не ограничиваясь перечисленным, таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции также могут быть составлены в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Суспензия может также содержать стабилизаторы.

#### *D. Дополнительные составы*

##### *i. Эмульсии*

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии обычно представляют собой гетерогенные системы в виде одной жидкости, диспергированной в другой в форме капель, обычно превышающих диаметр 0,1 мкм (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 245; Block в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 2, стр. 335; Higuchi *et al.*, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, стр. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно смешанные и диспергированные друг в друге. Как правило, эмульсии могут представлять собой эмульсии либо типа «вода-в-масле» (w/o), либо «масло-в-воде» (o/w). Когда водная фаза мелко раздроблена и диспергирована на мелкие капли в объемной масляной фазе, полученную композицию называют эмульсией типа «вода-в-масле» (w/o). В качестве альтернативы, когда масляная фаза мелко раздроблена и диспергирована на мелкие капли в объемной водной фазе, полученную композицию называют эмульсией типа «масло-в-воде» (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты в дополнение к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может

присутствовать в виде раствора в водной фазе, масляной фазе, либо само по себе в виде отдельной фазы. Фармацевтические вспомогательные вещества, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, также при необходимости могут присутствовать в эмульсиях. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой гетерогенные эмульсии, которые содержат более двух фаз, такие как, например, эмульсии типа «масло-в-воде-в-масле» (o/w/o) и «вода-в-масле-в-воде» (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые бинарные эмульсии. Гетерогенные эмульсии, в которых индивидуальные масляные капли эмульсии типа o/w заключают в себе мелкие водяные капли, представляют собой эмульсию типа w/o/w. Аналогичным образом, система масляных капель, заключенных в капли воды, стабилизированные в масляной непрерывной фазе, обеспечивает эмульсию типа o/w/o.

Эмульсии характеризуются незначительной термодинамической стабильностью или ее отсутствием. Часто, диспергированная или непрерывная фаза эмульсии хорошо диспергирована во внешней или непрерывной фазе и поддерживается в этой форме с помощью эмульгаторов или вязкости состава. Любая из фаз эмульсии может представлять собой полутвердое вещество или твердое вещество, как в случае основ мазей и кремов эмульсионного типа. Другие средства стабилизации эмульсий предусматривают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы можно в широком смысле подразделить 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., том 1, стр. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как поверхностно-активные агенты, нашли широкое применение при получении эмульсий и были рассмотрены в литературе (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 285; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, том 1, стр. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидрофильно-липофильным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом при распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества могут быть классифицированы на различные классы на основе природы 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., том 1, стр. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые в эмульсионных составах, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбирующие основы обладают липофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий типа w/o, но, тем не менее, сохранять их полутвердую консистенцию, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин. Мелкодисперсные твердые вещества используют в качестве хороших эмульгаторов, особенно в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, неразбухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилтристеарат.

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включено в составы эмульсий и способствует свойствам эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, жирные сложные эфиры, увлажнители, гидрофильные коллоидные вещества, консерванты и антиоксиданты (Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 335; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199).

Гидрофильные коллоидные вещества или гидроколлоидные вещества включают встречающиеся в природе камеди и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновая кислота, каррагинан, гуаровая камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлоза и карбоксипропилцеллюлоза) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или разбухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования сильных межповерхностных пленок вокруг капель дисперсной фазы и путем увеличения вязкости внешней фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут хорошо поддерживать рост микроорганизмов, эти составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включаемые в эмульсионные составы, включают метилпарабен, пропилпарабен, четвертичные соли аммония, хлорид бензалкония, сложные эфиры п-гидроксибензойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также часто добавляют в эмульсионные составы для предотвращения порчи состава. Применяемые антиоксиданты могут представлять собой ловушки свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол или восстановители, такие как

аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и синергисты антиоксидантов, такие как лимонная кислота, виннокаменная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов дерматологическим, пероральным и парентеральным путями и способы их изготовления были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199). Эмульсионные составы для пероральной доставки широко используются из-за простоты составления, а также эффективности с точки зрения абсорбции 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, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 245; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 199). Слабительные средства на основе минерального масла, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жиров находятся среди материалов, которые часто вводят перорально в виде эмульсий типа o/w.

#### *ii. Микроэмульсии*

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения композиции иРНК и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система из воды, масла и амфифильного вещества, 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., том 1, стр. 245). Как правило, микроэмульсии представляют собой системы, которые получают, сначала диспергируя масло в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавляя достаточное количество четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи, с получением прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также описаны как термодинамически стабильные, изотропно прозрачные дисперсии двух несмешивающихся жидкостей, которые стабилизированы межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, стр. 185-215). Микроэмульсии часто получают с помощью комбинации от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, дополнительное поверхностно-активное вещество и электролит. То, является ли микроэмульсия микроэмульсией типа «вода-в-масле» (w/o) или «масло-в-воде» (o/w), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической укладки полярных голов и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's *Pharmaceutical Sciences*, Mack

Publishing Co., Easton, Pa., 1985, стр. 271).

Был широко исследован феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и он обеспечил обширную информацию специалисту в данной области о том, как составлять микроэмульсии (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 245; Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., том 1, стр. 335). По сравнению с обычными эмульсиями микроэмульсии обеспечивают преимущество солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств в составе в виде термодинамически стабильных капель, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые для получения микроэмульсий, включают, не ограничиваясь перечисленным, ионогенные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, олеиловые эфиры полиоксиэтилена, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерин монолаурат (ML310), тетраглицерин моноолеат (MO310), гексаглицерин моноолеат (PO310), гексаглицерин пентаолеат (PO500), декаглицерин монокапрат (MCA750), декаглицерин моноолеат (MO750), декаглицерин секвиолеат (SO750), декаглицерин декаолеат (DAO750), отдельно или в комбинации с дополнительными поверхностно-активными веществами. Дополнительное поверхностно-активное вещество, обычно спирт с короткой цепью, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения поверхностной текучести посредством проникновения в пленку поверхностно-активного вещества и последующего образования разупорядоченной пленки вследствие пустоты, между молекулами поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без использования дополнительных поверхностно-активных веществ, и бесспиртовые самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы известны в данной области техники. Водная фаза, как правило, может представлять собой, не ограничиваясь перечисленным, воду, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать, не ограничиваясь перечисленным, такие материалы, как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, моно, ди и три-глицериды средней длины цепи (C8-C12), полиоксиэтилированные глицериловые сложные эфиры жирных кислот, жирные спирты, полиглицеролированные глицериды, насыщенные полиглицеролированные C8-C10 глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации лекарственного средства и усиленной абсорбции лекарственных средств. Было высказано предложение, что микроэмульсии на основе липидов (как o/w, так и w/o) повышают пероральную биодоступность лекарственных средств, 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). Микроэмульсии обеспечивают преимущества улучшенной солюбилизации лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного усиления абсорбции лекарственного средства вследствие индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести и проницаемости мембраны, простоты получения, простоты перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, увеличенной клинической эффективности и сниженной токсичности (см., например, патенты США № 6191105, 7063860, 7070802, 7157099; Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Но *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может обеспечивать особые преимущества при получении составов термолabileльных лекарственных средств, пептидов или иРНК. Микроэмульсии также являются эффективными в отношении трансдермальной доставки активных компонентов как в косметических, так и в фармацевтических целях. Ожидается, что микроэмульсионные композиции и составы согласно настоящему изобретению будут способствовать увеличенной системной абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также увеличат локальное клеточное поглощение иРНК и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии согласно настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитан моностеарат (Grill 3), Labrasol и усилители проникновения для улучшения свойств состава и для усиления абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Усилители проникновения, используемые в микроэмульсиях согласно настоящему изобретению, могут быть классифицированы как принадлежащие одной из пяти широких категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчной кислоты, хелатирующие агенты и нехелатирующие неповерхностно-активные вещества (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92). Каждый из этих классов обсуждался выше.

### *iii. Усилители проникновения*

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении используются различные усилители проникновения для осуществления эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности, иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно только растворимые в липидах или липофильные лекарственные средства без труда проходят через клеточные мембраны. Было обнаружено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрану, через которую необходимо пройти, обработать усилителем проникновения. Помимо способствованию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны, усилители проникновения также усиливают проницаемость липофильных лекарственных средств.

Усиливающие проникновение средства могут быть классифицированы как принадлежащие одной из пяти широких категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие агенты и нехелатирующие неповерхностно-активные вещества (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92). Каждый из вышеупомянутых классов усилителей проникновения более подробно описан ниже.

*Поверхностно-активные вещества:* В связи с настоящим изобретением поверхностно-активные вещества (или «поверхностно-активные агенты») представляют собой химические соединения, которые при растворении в водном растворе уменьшают поверхностное натяжение раствора или межповерхностное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего абсорбция иРНК через слизистую оболочку усиливается. В дополнение к солям желчных кислот и жирным кислотам, эти усилители проникновения включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92); и перфторхимические эмульсии, такие как FC-43. Takahashi *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

*Жирные кислоты:* Различные жирные кислоты и их производные, которые выступают в качестве усилителей 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-моноолеил-гас-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C<sub>1-20</sub> алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т. е. олеат, лаурат, капрат, мирилат, 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, стр. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

*Соли желчных кислот:* Физиологическая роль желчи включает способствование диспергированию и всасыванию липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, глава 38 в: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, стр. 934-935). Различные природные соли желчных кислот и их синтетические производные выступают 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 (дезоксисхолат натрия), глюхолевую кислоту (глюхолат натрия), глихолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксисхолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксисхолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксисхолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, 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:* Хелатирующие агенты, используемые в связи с настоящим изобретением, могут быть определены как соединения, которые удаляют ионы металлов из раствора путем образования с ними комплексов, в результате чего улучшается абсорбция иРНК через слизистую оболочку. Что касается их применения в качестве усилителей проникновения в настоящем изобретении, хелатирующие агенты обладают дополнительным преимуществом, заключающимся также в том, что они также служат ингибиторами ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентного иона металла для катализа и, таким образом, ингибируются хелатирующими агентами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие агенты включают, не ограничиваясь перечисленным, динатрий этилендиаминтатраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетоннов (енамины) (см., например, Katdare, A. *et al.*, *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, стр. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al.*, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

*Нехелатирующие неповерхностно-активные вещества:* В контексте настоящего документа нехелатирующие неповерхностно-активные соединения, усиливающие проникновение, можно определить как соединения, которые демонстрируют незначительную активность в качестве хелатирующих агентов или в качестве поверхностно-активных веществ, но тем не менее усиливают абсорбцию иРНК 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-алкенилазациклоалканона (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*,

1991, стр. 92); и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Агенты, которые усиливают поглощение иРНК на клеточном уровне, также могут быть добавлены к фармацевтическим и другим композициям согласно настоящему изобретению. Например, известно, что катионные липиды, такие как липофектин (Junichi *et al.*, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo *et al.*, заявка РСТ WO 97/30731), также усиливают клеточное поглощение дцРНК. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Швейцария), липосомный реагент для трансфекции DOTAP (Grenzacherstrasse, Швейцария), липосомный реагент для трансфекции DOSPER (Grenzacherstrasse, Швейцария) или Eugene (Grenzacherstrasse, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass<sup>a</sup> D1 (New England Biolabs; Ипсуич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invivogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США), среди прочего.

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот могут быть использованы другие агенты, включая гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

#### *iv. Носители*

Некоторые композиции согласно настоящему изобретению также имеют в своем составе соединения-носители. В контексте настоящего документа термин «соединение-носитель» может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которые являются инертными (т. е. не обладают биологической активностью сами по себе), но распознаются как нуклеиновая кислота посредством процессов *in vivo*, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или способствования ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, как правило, с избытком последнего вещества, может привести к значительному снижению количества нуклеиновой кислоты, попадающей в печень, почки или другие внециркуляторные резервуары, предположительно из-за конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, поступление частично фосфоротиоатной дцРНК в ткань печени может быть снижено при совместном введении с полиинозиновой кислотой, декстрансульфатом, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоциано-стильбен-2,2'-дисульфоновой кислотой (Miyao *et al.*, *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura *et al.*, *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

#### *v. Вспомогательные вещества*

В отличие от соединения-носителя фармацевтический носитель или вспомогательное вещество могут включать, например, фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любую другую фармакологически инертную среду-носитель для доставки одной или более нуклеиновых кислот животному. Вспомогательное вещество может быть жидким или твердым и выбрано с учетом запланированного способа введения, чтобы обеспечить требуемый объем, консистенцию и т. д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами отдельно взятой фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают, не ограничиваясь перечисленным, связующие средства (например, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидона 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 средства (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния, 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 средства (например, лаурилсульфат натрия и т. д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают в нежелательную реакцию с нуклеиновыми кислотами, также могут быть использованы для составления композиций согласно настоящему изобретению. Подходящие

фармацевтически приемлемые носители включают, не ограничиваясь перечисленным, 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 основаниях. Растворы могут также содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Могут быть использованы фармацевтически приемлемые органические или неорганические вспомогательные вещества, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают в нежелательную реакцию с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества включают, не ограничиваясь перечисленным, воду, солевые растворы, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т. п.

#### *vi. Другие компоненты*

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно содержащиеся в фармацевтических композициях, например, на уровнях, установленных для них в данной области техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные вещества, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или они могут содержать дополнительные вещества, используемые для физического составления различных лекарственных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно препятствовать биологической активности компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы могут быть стерилизованы и, при необходимости, смешаны со вспомогательными средствами, например, смазывающими средствами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, красителями, ароматизаторами и/или ароматическими веществами и т. п., которые не вступают в нежелательное взаимодействие с нуклеиновой кислотой (кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, включая, например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Суспензия может также содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, включают (а) одно или более соединений иРНК и (б) один или более биологических агентов, которые функционируют с помощью механизма, отличного от РНКи. Примеры таких биологических агентов включают агенты,

которые препятствуют взаимодействию СА2 и по меньшей мере одного партнера по связыванию СА2.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены с помощью стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или на подопытных 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 он может быть выражен как соотношение LD50/ED50. Обычно используют соединения, которые характеризуются высокими терапевтическими индексами.

Данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при составлении диапазона доз для применения у людей. Дозировка композиций, представленных в настоящем изобретении, обычно находится в диапазоне концентраций в кровотоке, которые включают ED50 с незначительной токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, представленных в настоящем изобретении, терапевтически эффективная доза первоначально может быть оценена с помощью анализов на клеточных культурах. Доза может быть составлена на животных моделях для достижения диапазона концентрации в плазме крови соединения или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, достижения сниженной 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 применимых доз у людей. Уровни в плазме крови могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, обсуждаемому выше, иРНК, представленные в настоящем изобретении, могут быть введены в комбинации с другими известными агентами, эффективными для лечения заболеваний или нарушений, связанных с экспрессией СА2 (например, глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой). В любом случае врач, осуществляющий введение, может корректировать количество и время введения иРНК на основании результатов, наблюдаемых с применением стандартных показателей эффективности, известных из уровня техники или описанных в настоящем документе.

## **VII. Способы лечения нарушений, связанных с экспрессией СА2**

Настоящее изобретение относится к применению иРНК, нацеленной на СА2, для ингибирования экспрессии СА2 и/или для лечения заболевания, нарушения или патологического процесса, связанного с экспрессией СА2 (например, глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой).

В некоторых аспектах предложен способ лечения нарушения, связанного с

экспрессией CA2, где способ включает введение иРНК (например, дцРНК), раскрытой в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления иРНК ингибирует (снижает) экспрессию CA2.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное, которое служит в качестве модели нарушения, связанного с экспрессией CA2, например, глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой.

*А. Глаукома или состояния, ассоциированные с глаукомой*

В некоторых вариантах осуществления нарушение, связанное с экспрессией CA2, представляет собой глаукому или состояния, ассоциированные с глаукомой. Неограничивающие примеры глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой, которые поддаются лечению способами, описанными в настоящем документе, включают глаукому, открытоугольную глаукому, закрытоугольную глаукому, воспаление глаза, системное воспаление, передний увеит, острый некроз сетчатки, синдром Штурге-Вебера, синдром Аксенфельда-Ригера, синдром Марфана, гомоцистинурию, синдром Вейля-Маркезани и аутоиммунные заболевания, такие как ювенильный ревматоидный артрит и анкилозирующий спондилит Мари-Штрюмпеля.

Клинические и патологические признаки глаукомы или состояний, ассоциированных с глаукомой, включают, не ограничиваясь перечисленным, внутриглазное давление, потерю зрения, снижение остроты зрения (например, характеризующееся плавающими пятнами, нечеткостью вокруг краев или в центре поля зрения (например, скотомой), воспаление глаза и/или повреждение зрительного нерва.

В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта с глаукомой или состояниями, ассоциированными с глаукомой, составляет менее 18 лет. В некоторых вариантах осуществления субъект с глаукомой или состояниями, ассоциированными с глаукомой, представляет собой взрослого. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или был идентифицирован как имеющий повышенные уровни мРНК или белка CA2 по сравнению с референсным уровнем (например, уровень CA2, который превышает референсный уровень).

В некоторых вариантах осуществления глаукому или состояния, ассоциированные с глаукомой, диагностируют с помощью анализа образца, полученного от субъекта (например, образца ресничного эпителия). В некоторых вариантах осуществления образец анализируют способом, выбранным из одного или более из флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), иммуногистохимии, иммуноанализа CA2, электронной микроскопии, лазерной микродиссекции и масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления глаукому или состояния, ассоциированные с глаукомой, диагностируют с помощью любого подходящего диагностического теста или методики, например, тонометрии, пахиметрии, оценки сетчатки глаза, гониоскопии, ангиографии (например, флуоресцентной ангиографии или ангиографии с индоцианином зеленым), электроретинографии, ультразвукового исследования, оптической когерентной томографии (ОКТ), компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ), проверки цветового зрения,

проверки поля зрения, осмотра с помощью щелевой лампы, офтальмоскопии и физикального обследования (например, для оценки остроты зрения (например, с помощью фундоскопии или оптической когерентной томографии (ОКТ)).

*В. Комбинированная терапия*

В некоторых вариантах осуществления иРНК (например, дцРНК), раскрытую в настоящем документе, вводят в комбинации со второй терапией (например, одним или более дополнительными видами терапии), которая, как известно, является эффективной для лечения нарушения, связанного с экспрессией СА2 (например, глаукомы), или симптома такого нарушения. иРНК может быть введена до, после или одновременно со второй терапией. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят перед второй терапией. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят одновременно со второй терапией.

Вторая терапия может представлять собой дополнительный терапевтический агент. иРНК и дополнительный терапевтический агент могут быть введены в комбинации в одной и той же композиции или дополнительный терапевтический агент может быть введен как часть отдельной композиции.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой терапевтический агент, отличный от иРНК, который является эффективным для лечения нарушения или симптомов нарушения.

В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят в сочетании с терапией.

Иллюстративные виды комбинированной терапии включают, не ограничиваясь перечисленным, лекарственный препарат для снижения внутриглазного давления, лазерное лечение, хирургическое вмешательство или трабекулэктомию. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент включает аналог простагландина, бета-блокатор, агонист альфа-адренергических рецепторов, ингибитор карбоангидразы или агент против СА2.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой аналог простагландина. В некоторых вариантах осуществления аналог простагландина включает биматопрост (Lumigan®), латанопрост (Xalatan®), талфупрост (Zioptan™), латанопростина бунод (Vyzulta™) или травопрост (Travatan Z®).

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой бета-блокатор. В некоторых вариантах осуществления бета-блокатор включает бетаксолол (Betoptic S®) или тимолол (Betimol®, Timoptic).

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист альфа-адренергических рецепторов. В некоторых вариантах осуществления агонист альфа-адренергических рецепторов включает бримонидин (Alphagan®P) или апраклонидин (Iopidine®).

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор карбоангидразы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор карбоангидразы включает дорзоламид (Trusopt®), бринзоламид (Azopt®),

ацетазоламид (Diamox) или метазоламид (Neptazane®).

В некоторых вариантах осуществления агент против СА2 представляет собой молекулу антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой моноклональное антитело.

*С. Дозы, пути и сроки введения*

Субъекту (например, субъекту-человеку, например, пациенту) может быть введено терапевтическое количество иРНК. Терапевтическое количество может составлять, например, 0,05-50 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления иРНК включена в состав для доставки в орган-мишень, например, в глаз.

В некоторых вариантах осуществления иРНК представлена в виде липидного состава, например, состава LNP, описанного в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления терапевтическое количество составляет 0,05-5 мг/кг дцРНК. В некоторых вариантах осуществления липидный состав, например, состав LNP, вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления иРНК находится в форме конъюгата с GalNAc, например, описанного в настоящем документе. В некоторых таких вариантах осуществления терапевтическое количество составляет 0,5-50 мг дцРНК. В некоторых вариантах осуществления, например, конъюгат с GalNAc вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления иРНК находится в форме конъюгата с C16, например, описанного в настоящем документе.

В отдельных вариантах осуществления субъектам может быть введено терапевтическое количество дцРНК, такое как от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 200 мг/кг. В других вариантах осуществления субъектам может быть введено терапевтическое количество дцРНК, такое как от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 500 мг/кг. В других вариантах осуществления субъектам может быть введено терапевтическое количество дцРНК, составляющее приблизительно 500 мг/кг или более.

В некоторых вариантах осуществления введение повторяют, например, на регулярной основе, например, ежедневно, один раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, шести месяцев или дольше. После проведения начальной схемы лечения лечение можно осуществлять менее часто. Например, после введения один раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц, в течение шести месяцев или года или дольше.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК вводят в двух или более дозах. В некоторых вариантах осуществления число или количество последующих доз зависит от достижения желаемого эффекта, например, (a) подавления или снижения внутриглазного давления; (b) ингибирования или снижения экспрессии или активности СА2; (c) снижения количества водянистой влаги; (d) подавления или снижения повреждения зрительного нерва; или (e) подавления или снижения гибели ганглиозных

клеток сетчатки, или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, уменьшения или предупреждения одного или более симптомов, ассоциированных с нарушением.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК вводят согласно графику. Например, агент на основе иРНК может быть введен один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления график включает введение через регулярные промежутки времени, например, один раз в час, один раз в четыре часа, один раз в шесть часов, один раз в восемь часов, один раз в двенадцать часов, каждый день, один раз в 2 дня, один раз в 3 дня, один раз в 4 дня, один раз в 5 дней, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК вводят с частотой, необходимой для достижения требуемого эффекта.

В некоторых вариантах осуществления график включает частые введения, за которыми следует более длительный период времени, в течение которого агент не вводят. Например, график может включать начальный набор доз, которые вводят за относительно короткий период времени (например, приблизительно один раз в 6 часов, приблизительно один раз в 12 часов, приблизительно один раз в 24 часа, приблизительно один раз в 48 часов или приблизительно один раз в 72 часа), за которым следует более длительный период времени (например, приблизительно 1 неделя, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель или приблизительно 8 недель), в течение которого агент на основе иРНК не вводят. В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК изначально вводят один раз в час и позже вводят с более длительным интервалом (например, ежедневно, еженедельно, один раз в две недели или ежемесячно). В некоторых вариантах осуществления агент на основе иРНК изначально вводят ежедневно и позже вводят с более длительным интервалом (например, еженедельно, один раз в две недели или ежемесячно). В отдельных вариантах осуществления более длительный интервал увеличивается с течением времени или определяется на основании достижения требуемого эффекта.

Перед введением полной дозы иРНК пациентам может быть введена меньшая доза, такая как 5% инфузионная доза, и может быть осуществлено наблюдение пациентов на предмет побочных действий, такие как аллергическая реакция, или повышенных уровней липидов или кровяного давления. В другом примере за пациентом может быть осуществлено наблюдение на предмет нежелательных эффектов.

### **VIII. Способы модулирования экспрессии CA2**

В некоторых аспектах настоящего изобретения предложен способ модулирования (например, ингибирования или активации) экспрессии CA2, например, в клетке, в ткани или в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань находится *ex vivo*, *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань находится в глазу (например, представляет собой клетку ресничного эпителия, клетку зрительного нерва, клетку трабекулярной сети, клетку канала Шлемма (например, включая

эндотелиальную клетку), клетку юкстаканаликулярной ткани, клетку ресничной мышцы, клетку сетчатки, астроцит, перицит, клетку Мюллера, ганглиозную клетку (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальную клетку, фоторецепторную клетку, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральные вены или ткань сосудистой оболочки, например, сосуд сосудистой оболочки). В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань находится в организме субъекта (например, млекопитающего, такого как, например, человек). В некоторых вариантах осуществления субъект (например, человек) подвержен риску или у него диагностировано нарушение, связанное с экспрессией СА2, описанное в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клетки в контакт с иРНК, описанной в настоящем документе, в количестве, эффективном для снижения экспрессии СА2 в клетке. В некоторых вариантах осуществления приведение клетки в контакт с агентом на основе РНКи включает приведение клетки в контакт с агентом на основе РНКи *in vitro* или приведение клетки в контакт с агентом на основе РНКи *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, осуществляющий способ, приводит агент на основе РНКи в физический контакт с клеткой, или агент на основе РНКи может быть помещен в ситуацию, которая позволит или заставит его впоследствии прийти в контакт с клеткой. Приведение в контакт с клеткой *in vitro* может быть осуществлено, например, путем инкубирования клетки с агентом на основе РНКи. Приведение в контакт с клеткой *in vivo* может быть осуществлено, например, путем инъекции агента на основе РНКи в ткань, где расположена клетка, или вблизи этой ткани, или путем инъекции агента на основе РНКи в другую область, например, ткань глаза. Например, агент на основе РНКи может содержать или быть связан с лигандом, например, липофильным фрагментом или фрагментами, как описано ниже и дополнительно подробно описано, например, в РСТ/US2019/031170, которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме, включая выдержки из нее, описывающие липофильные фрагменты, которые направляют или иным образом стабилизируют агент на основе РНКи в представляющей интерес области. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетка также может быть приведена в контакт с агентом на основе РНКи *in vitro* и впоследствии трансплантирована субъекту.

Экспрессия СА2 может быть оценена по уровню экспрессии мРНК СА2, белка СА2 или уровню другого параметра, функционально связанного с уровнем экспрессии СА2. В некоторых вариантах осуществления экспрессия СА2 ингибируется на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. В некоторых вариантах осуществления иРНК характеризуется  $IC_{50}$  в диапазоне 0,001-0,01 нМ, 0,001-0,10 нМ, 0,001-

1,0 нМ, 0,001-10 нМ, 0,01-0,05 нМ, 0,01-0,50 нМ, 0,02-0,60 нМ, 0,01-1,0 нМ, 0,01-1,5 нМ, 0,01-10 нМ. Значение  $IC_{50}$  может быть нормировано относительно соответствующего контрольного значения, например  $IC_{50}$  ненацеливающей иРНК.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение в клетку или ткань иРНК, описанной в настоящем документе, и выдерживание клетки или ткани в течение времени, достаточного для обеспечения деградации мРНК-транскрипта СА2, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии СА2 в клетке или ткани.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, описанной в настоящем документе, например, композиции, содержащей иРНК, которая связывает СА2, млекопитающему таким образом, что экспрессия СА2-мишени снижается, например, в течение увеличенной продолжительности времени, например, по меньшей мере двух, трех, четырех дней или более, например, одной недели, двух недель, трех недель или четырех недель, или более. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии СА2 может быть обнаружено в течение 1 часа, 2 часов, 4 часов, 8 часов, 12 часов или 24 часов после первого введения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, описанной в настоящем документе, млекопитающему таким образом, что экспрессия СА2-мишени повышается, например, на по меньшей мере 10% по сравнению с необработанным животным. В некоторых вариантах осуществления активация СА2 имеет место в течение увеличенной продолжительности времени, например, по меньшей мере двух, трех, четырех дней или более, например, одной недели, двух недель, трех недель или четырех недель, или более. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что иРНК может активировать экспрессию СА2 путем стабилизации мРНК-транскрипта СА2, взаимодействия с промотором в геноме или ингибирования ингибитора экспрессии СА2.

иРНК, подходящие для способов и композиций, представленных в настоящем изобретении, специфично нацелены на РНК (первичные или подвергшиеся процессингу) СА2. Композиции и способы ингибирования экспрессии СА2 с помощью иРНК могут быть получены и осуществлены, как описано в других местах настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта СА2 субъекта, например млекопитающего, например человека, подлежащего лечению. Композиция может быть введена с помощью любых подходящих средств, известных из уровня техники, включая, не ограничиваясь перечисленным, введение в глаз (например, внутриглазное), местное и внутривенное введение.

В отдельных вариантах осуществления композицию вводят внутриглазным способом (например, путем интравитреального введения, например, интравитреальной инъекции; транссклерального введения, например, транссклеральной инъекции; субконъюнктивального введения, например, субконъюнктивальной инъекции; ретробульбарного введения, например, ретробульбарной инъекции; интракамерального

введения, например, интракамеральной инъекции, или субретинального введения, например, субретинальной инъекции. В других вариантах осуществления композицию вводят местно. В других вариантах осуществления композицию вводят путем внутривенной инфузии или инъекции.

В отдельных вариантах осуществления композицию вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых таких вариантах осуществления композиция содержит миРНК, включенную в липидный состав (например, состав LNP, такой как состав LNP11), для внутривенной инфузии.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя методы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом осуществлении или тестировании иРНК и способов, представленных в настоящем изобретении, подходящие методы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие источники, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном объеме. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, имеет преимущественную силу. Кроме того, материалы, методы и примеры являются исключительно иллюстративными и не имеют ограничительного характера.

#### **Конкретные варианты осуществления**

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии карбоангидразы 2 (CA2), где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, части кодирующей цепи CA2 человека, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части некодирующей цепи CA2 человека, так что смысловая цепь комплементарна указанным по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии карбоангидразы 2 (CA2), где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, части кодирующей цепи CA2 человека, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части некодирующей цепи CA2 человека, так что смысловая цепь

комплементарна указанным по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи, где указанный агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь СА2 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления некодирующая цепь СА2 человека содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии СА2 содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна указанным по меньшей мере 15 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии СА2 содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, или 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна указанным по меньшей мере 17 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, с 0, или 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна указанным по меньшей мере 19 смежным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 смежный нуклеотид, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна указанному по меньшей мере 21 смежному нуклеотиду в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 смежный нуклеотид, с 0, или 1, 2, или 3 ошибками спаривания, соответствующей части нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления указанная часть смысловой цепи агента на основе дцРНК представляет собой часть в смысловой цепи из любой из таблиц 3-10. В некоторых вариантах осуществления указанная часть антисмысловой цепи агента на основе дцРНК представляет собой часть в антисмысловой цепи из любой из таблиц 3-10.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 17 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует антисмысловой

последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 смежный нуклеотид, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе дцРНК содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 21 смежный нуклеотид, с 0, 1, 2 или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе дцРНК имеет длину по меньшей мере 23 нуклеотида, например, длину 23-30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из смысловой цепи и антисмысловой цепи агента на основе дцРНК конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с одним или более положениями в двухцепочечной области агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован посредством линкера или носителя.

В некоторых вариантах осуществления липофильность липофильного фрагмента, измеренная с помощью  $\log K_{ow}$ , превышает 0.

В некоторых вариантах осуществления гидрофобность двухцепочечного агента на основе РНКи, измеренная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы крови двухцепочечного агента на основе РНКи, превышает 0,2.

В одном варианте осуществления анализ связывания с белками плазмы крови представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием белка сывороточного альбумина человека.

В частном варианте осуществления агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи агента на основе дцРНК являются немодифицированными нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи агента на основе дцРНК содержат модификацию.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов агента на основе дцРНК выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситимидинового (dT) нуклеотида, 2'-O-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, незамкнутого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом

нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогексит-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи агента на основе дцРНК включают модификации, отличные от 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, незамкнутых нуклеиновых кислот (UNA) или глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит ненуклеотидный спейсер (где необязательно ненуклеотидный спейсер содержит С3-С6 алкил) между двумя из смежных нуклеотидов смысловой цепи или между двумя из смежных нуклеотидов антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления каждая цепь агента на основе дцРНК имеет длину не более 30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь агента на основе дцРНК содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 1 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна цепь агента на основе дцРНК содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область агента на основе дцРНК имеет длину 15-30 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область агента на основе дцРНК имеет длину 17-23 пары нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область агента на основе дцРНК имеет длину 17-25 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область агента на основе дцРНК имеет длину 23-27 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область агента на основе дцРНК имеет длину 19-21 пару нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 21-23 пары нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления положения в двухцепочечной области исключают область сайта расщепления смысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления каждая цепь агента на основе дцРНК имеет 19-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь агента на основе дцРНК имеет 19-23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь агента на основе дцРНК имеет 21-23 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце антисмысловой цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце смысловой цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце антисмысловой цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце смысловой цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления 5'- и 3'-конец одной цепи агента на основе дцРНК содержит фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В некоторых вариантах осуществления 5'- и 3'-конец антисмысловой цепи агента на основе дцРНК содержит фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В некоторых вариантах осуществления пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь агента на основе дцРНК имеет в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая цепь имеет в общей сложности 23 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи агента на основе дцРНК посредством линкера или носителя. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением двух концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением трех концевых положений с каждого конца по меньшей мере одной цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения исключают область сайта расщепления смысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 9-12, считая с 5'-конца смысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все

положения, за исключением положений 11-13, считая с 3'-конца смысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления внутренние положения исключают область сайта расщепления антисмысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 12-14, считая с 5'-конца антисмысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13 на смысловой цепи агента на основе дцРНК, считая с 3'-конца, и положений 12-14 на антисмысловой цепи агента на основе дцРНК, считая с 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления липофильные фрагменты 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 с 5'-конца каждой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления липофильные фрагменты 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 с 5'-конца каждой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления 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 агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 20 или положением 15 смысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 16 антисмысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с положением 6, считая с 5'-конца смысловой цепи агента на основе дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент выбран из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты,

адамantanуксусной кислоты, 1-пиренмасляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилксигексианола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О3-(олеил)литохолевой кислоты, О3-(олеил)холеновой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

В некоторых вариантах осуществления 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.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С6-С18 углеводородную цепь.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную С16 углеводородную цепь.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении (положениях) или двухцепочечной области.

В некоторых вариантах осуществления 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 сериноловой основной цепи или диэтаноламиновой основной цепи.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с агентом на основе двухцепочечной иРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-простой тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент конъюгирован с азотистым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

В некоторых вариантах осуществления липофильный фрагмент 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.

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи агента на основе дцРНК защищен посредством концевой кэпа, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, где указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила,

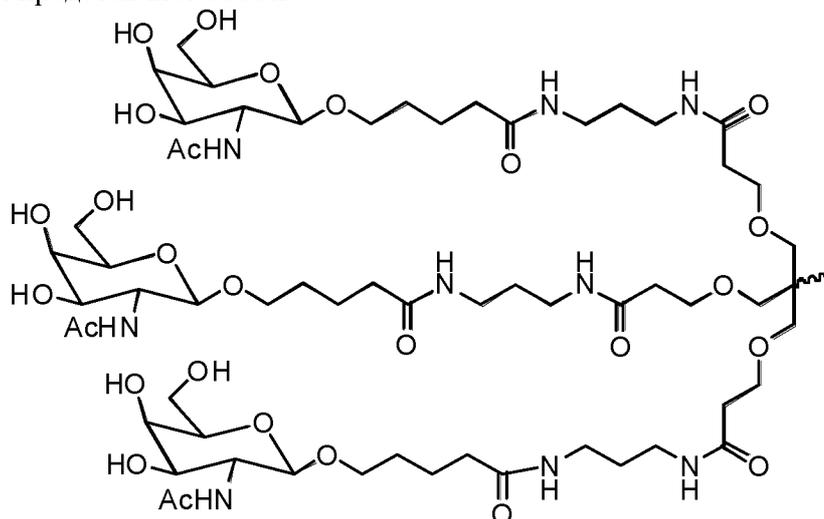
изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит нацеливающий лиганд, например, лиганд, который нацелен на ткань глаза или ткань печени. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован со смысловой цепью агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом или 5'-концом смысловой цепи агента на основе дцРНК. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи агента на основе дцРНК.

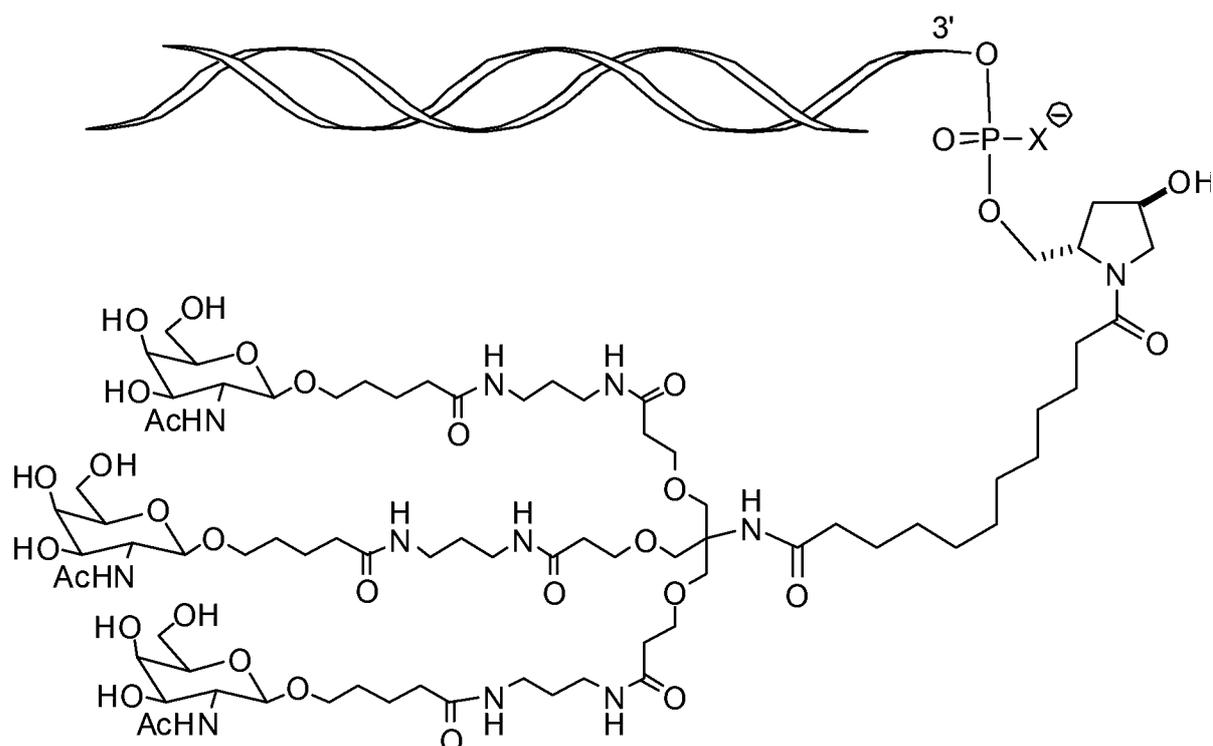
В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит лиганд, который нацелен на ткань глаза, где ткань глаза представляет собой ресничный эпителий, зрительный нерв, трабекулярную сеть, юкстаканаликулярную ткань, ганглий (например, включая ганглий сетчатки), эписклеральные вены или канал Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку).

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд агента на основе дцРНК содержит N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд агента на основе дцРНК представляет собой один или более конъюгатов GalNAc или одно или более производных GalNAc. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты GalNAc или одно или более производных GalNAc присоединены посредством одновалентного линкера или двухвалентного, трехвалентного или четырехвалентного разветвленного линкера.

В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд агента на основе дцРНК представляет собой



В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК конъюгирован с лигандом, как показано на следующем схематическом изображении



где X представляет собой O или S.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Sp-конфигурации; концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rp-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rp-, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой, второй и третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Sp-конфигурации; концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, где

атом фосфора указанной связи находится в Rр-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rр-, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Sp-конфигурации; концевую хиральную модификацию, присутствующую при третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rр-конфигурации; концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится в Rр-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rр-, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Sp-конфигурации; концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, где атом фосфора указанных связей находится в Rр-конфигурации; и концевую хиральную модификацию, присутствующую при первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, где атом фосфора указанной связи находится либо в Rр-, либо в Sp-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления агент на основе дцРНК дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена клетка, содержащая агент на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления клетка, содержащая агент на основе дцРНК, представляет собой клетку глаза человека, например, (клетку ресничного эпителия, клетку зрительного нерва, клетку трабекулярной сети, клетку канала Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку), клетку юкстаканаликулярной ткани, клетку ресничной мышцы, клетку сетчатки, астроцит, перицит, клетку Мюллера, ганглиозную клетку (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальную клетку, фоторецепторную клетку, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральные вены или ткань сосудистой оболочки, например, сосуд сосудистой оболочки), имеющую сниженный уровень мРНК СА2 или уровень белка СА2 по сравнению с в остальном аналогичной необработанной клеткой, где, необязательно,

указанный уровень снижен на по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

В некоторых вариантах осуществления клетка человека, содержащая агент на основе дцРНК, получена с помощью способа, включающего приведение клетки человека в контакт с агентом на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии СА2, содержащая агент на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления.

В частном варианте осуществления настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая агент на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления и липидный состав.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, включающий:

(а) приведение указанной клетки в контакт с агентом на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления или фармацевтической композицией, содержащей агент на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления; и

(b) выдерживание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для обеспечения деградации мРНК-транскрипта СА2, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии СА2 в клетке.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, включающий:

(а) приведение указанной клетки в контакт с агентом на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления или фармацевтической композицией, содержащей агент на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления; и

(b) выдерживание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК СА2, белка СА2 или как мРНК, так и белка СА2, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии СА2 в клетке.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, где клетка находится в организме субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, где клетка находится в организме субъекта-человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, где уровень мРНК СА2 ингибируется на по меньшей мере 50%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, где уровень белка СА2 ингибируется на по меньшей мере 50%.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, где ингибирование экспрессии СА2 снижает уровень белка СА2 в биологическом образце (например, образце ресничного эпителия), полученном от субъекта, на по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке, где у субъекта было диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, например, глаукома.

В некоторых вариантах осуществления способ ингибирования экспрессии СА2 в клетке или ткани глаза включает

(а) приведение указанной клетки или ткани в контакт с агентом на основе дцРНК, который связывает СА2; и

(b) выдерживание клетки или ткани, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК СА2, белка СА2 или как мРНК, так и белка СА2, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии СА2 в клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань глаза включает клетку ресничного эпителия, клетку зрительного нерва, клетку трабекулярной сети, клетку канала Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку), клетку юстаканаликулярной ткани, клетку ресничной мышцы, клетку сетчатки, астроцит, перицит, клетку Мюллера, ганглиозную клетку (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальную клетку, фоторецепторную клетку, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральные вены или ткань сосудистой оболочки, например, сосуд сосудистой оболочки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента на основе дцРНК согласно любому из предыдущих вариантов осуществления или содержащей его фармацевтической композиции, с осуществлением, таким образом, лечения указанного нарушения. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где СА2-ассоциированное нарушение представляет собой глаукому или состояние, ассоциированное с глаукомой.

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где лечение включает облегчение по меньшей мере одного признака или симптома нарушения. В частных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где лечение включает предупреждение прогрессирования нарушения. В некоторых вариантах осуществления лечение включает одно или более из (а) подавления или снижения внутриглазного давления; (b) ингибирования или снижения экспрессии или активности СА2; (c) снижения количества водянистой влаги; (d) подавления или снижения

повреждения зрительного нерва; (e) подавления или снижения гибели ганглиозных клеток сетчатки; (f) лекарственного препарата для снижения внутриглазного давления; (g) лазерного лечения; (h) хирургического вмешательства; (i) или трабекулэктомии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностирована глаукома, где по меньшей мере один признак или симптом глаукомы включает показатель одного или более из внутриглазного давления, потери зрения, повреждения зрительного нерва, воспаления глаза, остроты зрения или наличия, уровня или активности СА2 (например, гена СА2, мРНК СА2 или белка СА2).

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где лечение приводит к среднему снижению относительно исходного уровня мРНК СА2 на по меньшей мере 30% в клетке ресничного эпителия, клетке зрительного нерва, клетке трабекулярной сети, клетке канала Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку), клетке юстаканаликулярной ткани, клетке ресничной мышцы, пигментном эпителии сетчатки (RPE), клетке сетчатки, астроците, периците, клетке Мюллера, ганглиозной клетке (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальной клетке, фоторецепторной клетке, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральных венах или ткани сосудистой оболочки, например, сосуде сосудистой оболочки.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где лечение приводит к среднему снижению относительно исходного уровня мРНК СА2 на по меньшей мере 60% в клетке ресничного эпителия, клетке зрительного нерва, клетке трабекулярной сети, клетке канала Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку), клетке юстаканаликулярной ткани, клетке ресничной мышцы, пигментном эпителии сетчатки (RPE), клетке сетчатки, астроците, периците, клетке Мюллера, ганглиозной клетке (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальной клетке, фоторецепторной клетке, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральных венах или ткани сосудистой оболочки, например, сосуде сосудистой оболочки.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где лечение приводит к среднему снижению относительно исходного уровня мРНК СА2 на по меньшей мере 90% в клетке ресничного эпителия, клетке зрительного нерва, клетке трабекулярной сети, клетке канала Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку), клетке юстаканаликулярной ткани, клетке ресничной мышцы, пигментном эпителии сетчатки (RPE), клетке сетчатки, астроците, периците, клетке Мюллера, ганглиозной клетке (например, включая ганглиозную клетку сетчатки), эндотелиальной клетке, фоторецепторной клетке, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая

эндотелиальные клетки и сосудистые гладкомышечные клетки), эписклеральных венах или ткани сосудистой оболочки, например, сосуда сосудистой оболочки.

В других вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где после лечения у субъекта наблюдается по меньшей мере 8-недельная продолжительность нокдауна после однократной дозы дцРНК, оцениваемая по белку СА2 в ресничном эпителии.

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где лечение приводит к по меньшей мере 12-недельной продолжительности нокдауна после однократной дозы дцРНК, оцениваемой по белку СА2 в ресничном эпителии.

В частных вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где лечение приводит к по меньшей мере 16-недельной продолжительности нокдауна после однократной дозы дцРНК, оцениваемой по белку СА2 в ресничном эпителии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где агент на основе дцРНК вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где агент на основе дцРНК вводят субъекту внутриглазным способом, внутривенно или местно. В некоторых вариантах осуществления внутриглазное введение включает интравитреальное введение (например, интравитреальную инъекцию); транссклеральное введение (например, транссклеральную инъекцию); субконъюнктивальное введение (например, субконъюнктивальную инъекцию); ретробульбарное введение (например, ретробульбарную инъекцию); интракамеральное введение (например, интракамеральную инъекцию) или субретинальное введение (например, субретинальную инъекцию).

В некоторых вариантах осуществления способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, дополнительно включает измерение уровня СА2 (например, гена СА2, мРНК СА2 или белка СА2) у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления измерение уровня СА2 у субъекта включает измерение уровня гена СА2, белка СА2 или мРНК СА2 в биологическом образце, полученном от субъекта (например, образце ресничного эпителия). В некоторых вариантах осуществления измерение уровня СА2 (например, гена СА2, мРНК СА2 или белка СА2) у субъекта проводят до лечения агентом на основе дцРНК или фармацевтической композицией. В других вариантах осуществления измерение уровня СА2 (например, гена СА2, мРНК СА2 или белка СА2) у субъекта проводят после лечения агентом на основе

дцРНК или фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления после определения того, что уровень СА2 (например, гена СА2, мРНК СА2 или белка СА2) у субъекта превышает референсный уровень, субъекту вводят агент на основе дцРНК или фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня СА2 (например, гена СА2, мРНК СА2 или белка СА2) у субъекта проводят после лечения агентом на основе дцРНК или фармацевтической композицией.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, дополнительно включающий проведение анализа крови, диагностической визуализации, измерения давления или биопсии ресничного эпителия.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта, у которого диагностировано СА2-ассоциированное нарушение, где способ дополнительно включает введение указанному субъекту дополнительного агента и/или проведение терапии, подходящих для лечения или предупреждения СА2-ассоциированного нарушения. В некоторых вариантах осуществления указанный дополнительный агент и/или терапия включает один или более из аналога простагландина, бета-блокатора, агониста альфа-адренергических рецепторов, ингибитора карбоангидразы или агента против СА2.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. миРНК к СА2**

Последовательности нуклеиновой кислоты, приведенные в настоящем документе, представлены с применением стандартной номенклатуры. См. сокращения в таблице 2.

### **Таблица 2. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые при представлении последовательности нуклеиновой кислоты**

Следует исходить из того, что эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

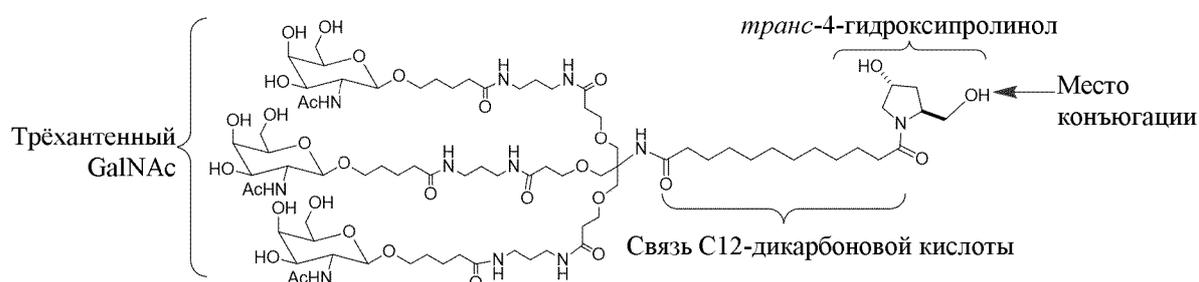
Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3'-фосфоротиоат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-Фтораденозин-3'-фосфоротиоат
(Ahd)	2'-О-гексадецил-аденозин-3'-фосфат
(Ahds)	2'-О-гексадецил-аденозин-3'-фосфоротиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
(A2p)	аденозин-2'-фосфат
(A2ps)	аденозин-2'-фосфоротиоат

C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфоротиоат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
(C2p)	цитидин-2'-фосфат
(C2ps)	цитидин-2'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфоротиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
(Ghd)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфат
(Ghds)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфоротиоат
(G2p)	гуанозин-2'-фосфат
(G2ps)	гуанозин-2'-фосфоротиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tb	бета-L-тимидин-3'-фосфат
Tbs	бета-L-тимидин-3'-фосфоротиоат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
Tgn	S-изомер тимидин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
Agn	S-изомер аденозин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
Cgn	S-изомер цитидин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
Ggn	S-изомер гуанозин-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
Ts	5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Ub	бета-L-уридин-3'-фосфат

Ubs	бета-L-уридин-3'-фосфоротиоат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфоротиоат
Us	уридин-3'-фосфоротиоат
(U2p)	уридин-2'-фосфат
(U2ps)	уридин-2'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
VP	Винилфосфонат
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
dA	2'-дезоксаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксаденозин-3'-фосфоротиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфоротиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфоротиоат
dT	2'-дезокситимидин
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфоротиоат
dU	2'-дезоксиуридин
s	фосфоротиоатная связь
L96 <sup>1</sup>	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил]-4- гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил)3

(Aeo)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат
(Aeos)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфоротиоат
(Geo)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфоротиоат
(Teo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
(m5Ceo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфоротиоат

<sup>1</sup>Химическая структура L96 является следующей:



## Методики экспериментов

### Биоинформатика

#### Транскрипты

Получали миРНК, нацеленные на СА2 человека, «карбонгидразу 2» (человек: NCBI refseqID NM\_000067.3; NCBI GeneID: 760). мРНК NM\_000067.3 REFSEQ человека, версия 1, имеет длину 1562 основания. Пары олигонуклеотидов получали с применением биоинформатических методов и ранжировали, и иллюстративные пары олигонуклеотидов показаны в таблицах 3 и 4, таблицах 7 и 8 и таблицах 9 и 10. Модифицированные последовательности представлены в таблицах 5, 6, 8 и 10. Немодифицированные последовательности представлены в таблицах 3, 4, 7 и 9. Олигонуклеотиды в таблицах 3, 5 и 9 конструировали для модификации посредством С16, а олигонуклеотиды в таблицах 4 и 6 конструировали для модификации посредством GalNAc.

Следует исходить из того, что по всему тексту заявки название дуплекса без десятичного числа эквивалентно названию дуплекса с десятичным числом, которое просто означает номер партии дуплекса. Например, AD-1560600 эквивалентен AD-1560600.1.

#### Синтез миРНК

миРНК синтезировали и отжигали стандартными способами, известными из уровня техники.

Вкратце, последовательности миРНК синтезировали в масштабе 1 мкмоль на синтезаторе Mermade 192 (Bioautomation) с использованием фосфорамидитной химии, опосредованной твердой подложкой. Твердая подложка представляла собой стекло с

контролируемым размером пор (500 Å), загруженное специально разработанным лигандом GalNAc, или универсальную твердую подложку (AM biochemical). Вспомогательные реагенты для синтеза, 2'-F и 2'-O-метил-РНК и дезоксифосфорамидиты, были получены от Thermo-Fisher (Милуоки, Висконсин) и HONGENE (Китай). 2'-F, 2'-O-метил, GNA (гликолевые нуклеиновые кислоты), 5'-фосфат и другие модификации вводили с помощью соответствующих фосфорамидитов. Синтез одиночных цепей, конъюгированных на 3'-конце с GalNAc, проводили на модифицированной GalNAc подложке CPG. Специально разработанную универсальную твердую подложку CPG использовали для синтеза антисмысловых одиночных цепей. Время сочетания для всех фосфорамидитов (100 мМ в ацетонитриле) составляло 5 минут с использованием 5-этилтио-1Н-тетразола (ETT) в качестве активатора (0,6 М в ацетонитриле). Фосфоротиоатные связи получали с применением 50 мМ раствора 3-((диметиламинометилиден)амино)-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученного от Chemgenes (Уилмингтон, Массачусетс, США)) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1 об./об.). Время окисления составляло 3 минуты. Все последовательности синтезировали с окончательным удалением группы DMT («удаление DMT»).

После завершения твердофазного синтеза олигорибонуклеотиды отщепляли от твердой подложки и снимали защиту в запечатанных 96-луночных планшетах с использованием 200 мкл водных метиламиновых реагентов при 60°C в течение 20 минут. Для последовательностей, содержащих 2'-рибо остатки (2'-ОН), защищенных трет-бутилдиметилсилильной группой (TBDMS), проводили удаление защитной группы на второй стадии с применением реагента TEA.3HF (триэтиламина тригидрофторида). В раствор для удаления защитной группы метиламина добавляли 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) и 300 мкл реагента TEA.3HF и инкубировали раствор в течение еще 20 минут при 60 °С. В конце стадии отщепления и удаления защитной группы оставляли планшет для синтеза для нагревания до комнатной температуры и осаждали путем добавления 1 мл смеси ацетонитрил:этанол (9:1). Планшеты охлаждали при -80°C в течение 2 часов, супернатант осторожно декантировали с помощью многоканальной пипетки. Осадок олигонуклеотида ресуспендировали в 20 мМ буфере NaOAc и обессоливали с помощью 5 мл колонки для эксклюзионной хроматографии HiTrap (GE Healthcare) на системе очистки АКТА, оснащенной автодозатором A905 и коллектором фракций Frac 950. Обессоленные образцы собирали в 96-луночные планшеты. Образцы из каждой последовательности анализировали с помощью ЖХ-МС для подтверждения их принадлежности, УФ (260 нм) для количественного определения, и выбранный набор образцов анализировали с помощью ионообменной (ИEX) хроматографии для определения чистоты.

Отжиг отдельных цепей проводили на автоматизированном устройстве для манипуляций с жидкостями Tecan. Эквимолярную смесь смысловых и антисмысловых одиночных цепей объединяли и отжигали в 96-луночных планшетах. После объединения комплементарных одиночных цепей 96-луночный планшет плотно закрывали и нагревали

в печи при 100°C в течение 10 минут, и оставляли медленно нагреваться до комнатной температуры в течение периода 2-3 часов. Концентрацию каждого дуплекса нормировали до 10 мкМ в 1X PBS и затем подвергали скрининговым анализам *in vitro*.

**Таблица 3. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК к СА2 для модификации посредством С16**

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_0000 67.3	Антисмысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_000067.3
AD-1560600	AGAUCGGUGC CGAUUCCUGC A	7	32-52	UGCAGGAAUCGGC ACCGAUCUGG	142	30-52
AD-1560617	CGCGACCAUGU CCCAUCACUA	8	69-89	UAGUGAUGGGAC AUGGUCGCGCU	143	67-89
AD-1560622	GUACGGCAAAC ACAACGGACA	9	93-113	UGUCCGUUGUGU UUGCCGUACCC	144	91-113
AD-1560628	CAAACACAACG GACCUGAGCA	10	99-119	UGCUCAGGUCCGU UGUGUUUGCC	145	97-119
AD-1560638	GGACCUAGAGC ACUGGCAUAA A	11	109-129	UUUAUGCCAGUGC UCAGGUCCGU	146	107-129
AD-1560644	GAGCACUGGC AUAAGGACUU A	12	115-135	UAAGUCCUUAUGC CAGUGCUCAG	147	113-135
AD-1560655	GUUGACAUCG ACACUCAUACA	13	166-186	UGUAUGAGUGUC GAUGUCAACAG	148	164-186
AD-1560665	ACACUCAUACA GCCAAGUAUA	14	176-196	UAUACUUGGCUG UAUGAGUGUCG	149	174-196
AD-1560672	UACAGCCAAGU AUGACCCUUA	15	183-203	UAAGGGUCAUACU UGGCUGUAUG	150	181-203
AD-1560678	CAAGUAUGACC CUUCCCUGAA	16	189-209	UUCAGGGAAGGG UCAUACUUGGC	151	187-209

AD- 1560684	UGUCUGUUUC CUAUGAUCAA A	17	215-235	UUUGAUCAUAGG AAACAGACAGG	152	213-235
AD- 1560693	CCUAUGAUCAA GCAACUCCA	18	224-244	UGGAAGUUGCUU GAUCAUAGGAA	153	222-244
AD- 1560701	CAAGCAACUUC CCUGAGGAUA	19	232-252	UAUCCUCAGGGAA GUUGCUUGAU	154	230-252
AD- 1560711	CCCUGAGGAUC CUCAACAAUA	20	242-262	UAUUGUUGAGGA UCCUCAGGGAA	155	240-262
AD- 1560720	UCCUCAACAAU GGUCAUGCUA	21	251-271	UAGCAUGACCAUU GUUGAGGAUC	156	249-271
AD- 1560726	ACAAUGGUCA UGC UUUAAC A	22	257-277	UGUUGAAAGCAU GACCAUUGUUG	157	255-277
AD- 1560735	AUGCUUCAA CGUGGAGUUU A	23	266-286	UAAACUCCACGUU GAAAGCAUGA	158	264-286
AD- 1560745	AACGUGGAGU UUGAUGACUC A	24	274-294	UGAGUCAUCAAC UCCACGUUGA	159	272-294
AD- 1560752	UGAUGACUCU CAGGACAAAGA	25	285-305	UCUUUGUCCUGA GAGUCAUCAA	160	283-305
AD- 1560759	UCUCAGGACAA AGCAGUGCUA	26	292-312	UAGCACUGCUUUG UCCUGAGAGU	161	290-312
AD- 1560765	GACAAAGCAG UGCUC AAGGG A	27	298-318	UCCCUUGAGCACU GCUUUGUCCU	162	296-318
AD- 1560777	UGGCACUUAC AGAUUGAUUC A	28	330-350	UGAAUCAAUUCUGU AAGUGCCAUC	163	328-350
AD- 1560783	UUACAGAUUG AUUCAGUUUC	29	336-356	UGAAACUGAAUCA AUCUGUAAGU	164	334-356

	A					
AD-1560792	AUUCAGUUUC ACUUUCACUG A	30	346-366	UCAGUGAAAGUGA AACUGAAUCA	165	344-366
AD-1560798	UCACUUGAUG GACAAGGUUC A	31	370-390	UGAACCUUGUCCA UCAAGUGAAC	166	368-390
AD-1560804	GAUGGACAAG GUUCAGAGCA A	32	376-396	UUGCUCUGAACCU UGUCCAUCA	167	374-396
AD-1560810	CAAGGUUCAG AGCAUACUGU A	33	382-402	UACAGUAUGCUCU GAACCUUGUC	168	380-402
AD-1560816	UCAGAGCAUAC UGUGGAUAAA	34	388-408	UUUAUCCACAGUA UGCUCUGAAC	169	386-408
AD-1560837	AAGAAUAUG CUGCAGAACUA	35	409-429	UAGUUCUGCAGCA UAUUUCUUUU	170	407-429
AD-1560845	UAUGCUGCAG AACUUCACUU A	36	415-435	UAAGUGAAGUUC UGCAGCAUAUU	171	413-435
AD-1560851	GCAGAACUUCA CUUGGUUCAA	37	421-441	UUGAACCAAGUGA AGUUCUGCAG	172	419-441
AD-1560843	CUUCACUUGG UUCACUGGAA A	38	817-837	UUUCCAGUGAACC AAGUGAAGUU	173	
AD-1560862	UUUGGGAAAG CUGUGCAGCA A	39	463-483	UUGCUGCACAGCU UUCCCAAAAU	174	461-483
AD-1560874	GUGCAGCAACC UGAUGGACUA	40	475-495	UAGUCCAUCAGGU UGCUGCACAG	175	473-495
AD-1560880	CAACCUGAUG GACUGGCCGU	41	481-501	UACGGCCAGUCCA UCAGGUUGCU	176	479-501

	A					
AD-1560892	CUGGCCGUUC UAGGUUUUU A	42	493-513	UAAAAUACCUAGA ACGGCCAGUC	177	491-513
AD-1560895	UGAAGGUUGG CAGCGCUAAAA	43	515-535	UUUUAGCGCUGCC AACCUUCAA	178	513-535
AD-1560904	GCAGCGCUAAA CCGGGCCUUA	44	524-544	UAAGGCCCGGUUU AGCGCUGCCA	179	522-544
AD-1560915	CCGGGCCUUCA GAAAGUUGUA	45	535-555	UACAACUUUCUGA AGGCCCGGUU	180	533-555
AD-1560921	CUUCAGAAAG UUGUUGAUGU A	46	541-561	UACAUCAACAACU UUCUGAAGGC	181	539-561
AD-1560930	GUUGUUGAUG UGCUGGAUUC A	47	550-570	UGAAUCCAGCACA UCAACAACUU	182	548-570
AD-1560941	GCUGGAUUC AUUAAAACAAA	48	561-581	UUUGUUUUAUG GAAUCCAGCAC	183	559-581
AD-1560948	UCCAUUAAAAC AAAGGGCAAA	49	568-588	UUUGCCCUUGU UUUAAUGGAAU	184	566-588
AD-1560954	AAAACAAAGG GCAAGAGUGC A	50	574-594	UGCACUCUUGCCC UUUGUUUUA	185	572-594
AD-1560963	GGCAAGAGUG CUGACUUCACA	51	583-603	UGUGAAGUCAGCA CUCUUGCCCU	186	581-603
AD-1560970	GUGCUGACUU CACUAACUUA	52	590-610	UGAAGUUAGUGA AGUCAGCACUC	187	588-610
AD-1560976	ACUUCACUAAC UUCGAUCCUA	53	596-616	UAGGAUCGAAGU UAGUGAAGUCA	188	594-616
AD-1560989	CGAUCCUCGU GGCCUCCUUA	54	609-629	UGAAGGAGGCCAC GAGGAUCGAA	189	607-629
AD-	UCGUGGCCUC	55	615-635	UAUUCAGGAAGGA	190	613-635

1560996	CUUCCUGAAU A			GGCCACGAGG		
AD- 1561002	CCUCCUUCCUG AAUCCUUGGA	56	621-641	UCCAAGGAUUCAG GAAGGAGGCC	191	619-641
AD- 1561009	CCUGAAUCCU UGGAUUACUG A	57	628-648	UCAGUAAUCCAAG GAUUCAGGAA	192	626-648
AD- 1561015	UCCUUGGAUU ACUGGACCUAA	58	634-654	UUAGGUCCAGUAA UCCAAGGAUU	193	632-654
AD- 1561031	CCUACCCAGGC UCACUGACCA	59	650-670	UGGUCAGUGAGCC UGGGUAGGUC	194	648-670
AD- 1561037	CCUCUUCUGG AAUGUGUGAC A	60	676-696	UGUCACACAUUCC AGAAGAGGAG	195	674-696
AD- 1561043	UGGAAUGUGU GACCUGGAUU A	61	683-703	UAAUCCAGGUCAC ACAUUCCAGA	196	681-703
AD- 1561050	UGUGACCUGG AUUGUGCUC A	62	690-710	UUGAGCACAUCC AGGUCACACA	197	688-710
AD- 1561056	CUGGAUUGUG CUCAAGGAACA	63	696-716	UGUCCUUGAGCA CAAUCCAGGU	198	694-716
AD- 1561066	CUCAAGGAACC CAUCAGCGUA	64	706-726	UACGCUGAUGGG UCCUUGAGCA	199	704-726
AD- 1561072	GAACCAUCAG CGUCAGCAGA	65	712-732	UCUGCUGACGCG AUGGGUCCU	200	710-732
AD- 1475424	AGAACUGAUG GUGGACAACU A	66	719-739	UAGUUGUCCACCA UCAGUUCUUC	201	717-739
AD- 1561092	CGAGCAGGUG UUGAAAUUCC A	67	732-752	UGGAAUUUCAACA CCUGCUCGCU	202	730-752

AD-1561100	GGUGUUGAAA UUCCGUAAACA	68	738-758	UGUUUACGGAU UUCAACACCUG	203	736-758
AD-1561106	GAAAUUCCGU AAACUUAACUA	69	744-764	UAGUUAAGUUUA CGGAUUUCAA	204	742-764
AD-1561112	CCGUAAACUUA ACUUCAAUGA	70	750-770	UCAUUGAAGUUAA GUUUACGGAA	205	748-770
AD-1561116	GAGGGUGAAC CCGAAGAACUA	71	772-792	UAGUUCUUCGGG UUCACCCUCCC	206	770-792
AD-1561122	GAACCCGAAGA ACUGAUGGUA	72	778-798	UACCAUCAGUUCU UCGGGUUCAC	207	776-798
AD-1561130	AUGGUGGACA ACUGGCGCCA	73	793-813	UGGCGCCAGUUG UCCACCAUCA	208	791-813
AD-1561146	CCAGCUCAGCC ACUGAAGAAA	74	811-831	UUUCUUCAGUGG CUGAGCUGGGC	209	809-831
AD-1561152	CAGCCACUGAA GAACAGGCAA	75	817-837	UUGCCUGUUCUUC AGUGGCUGAG	210	815-837
AD-1561158	CUGAAGAACA GGCAAUCAA	76	823-843	UUUGAUUUGCCU GUUCUUCAGUG	211	821-843
AD-1446763	UCACUGGAACA CCAAUAUGA	77	828-848	UCAUAUUUGGUG UUCCAGUGAAC	212	826-848
AD-1561168	GGCAAUCAA GCUUCCUUA	78	833-853	UGAAGGAAGCUU UGAUUUGCCUG	213	831-853
AD-1561175	CAAAGCUUCCU UCAAAUAAGA	79	840-860	UCUUAUUUGAAG GAAGCUUUGAU	214	838-860
AD-1561181	UUCCUCAA UAAGAUGGUC A	80	846-866	UGACCAUCUUAUU UGAAGGAAGC	215	844-866
AD-1561190	AUAAGAUGGU CCCAUAGUCUA	81	855-875	UAGACUAUGGGAC CAUCUUAUUU	216	853-875
AD-1561196	UGGUCCAU GUCUGUAUCC A	82	861-881	UGGAUACAGACUA UGGGACCAUC	217	859-881

AD-1561203	AUAGUCUGUA UCCAAAUAUA	83	868-888	UAUUUUUGGAU ACAGACUAUGG	218	866-888
AD-1561210	GUAUCCAAAU AAUGAAUCUU A	84	875-895	UAAGAUUCAUUA UUUGGAUACAG	219	873-895
AD-1561218	AUAAUGAAUC UUCGGGUGUU A	85	883-903	UAACACCCGAAGA UUCAUUUUUU	220	881-903
AD-1561225	AUCUUCGGGU GUUUCCCUUU A	86	890-910	UAAAGGGAAACAC CCGAAGAUUC	221	888-910
AD-1561231	GGGUGUUUCC CUUUAGCUAA A	87	896-916	UUUAGCUAAAGG GAAACACCCGA	222	894-916
AD-1561239	CCCUUUAGCU AAGCACAGAUA	88	904-924	UAUCUGUGCUUA GCUAAAGGGAA	223	902-924
AD-1561245	AGCUAAGCACA GAUCUACCUA	89	910-930	UAGGUAGAUCUG UGCUUAGCUAA	224	908-930
AD-1561254	CAGAUCUACCU UGGUGAUUUA	90	919-939	UAAAUCACCAAGG UAGAUCUGUG	225	917-939
AD-1561261	ACCUUGGUGA UUUGGACCCU A	91	926-946	UAGGGUCCAAAUC ACCAAGGUAG	226	924-946
AD-1561272	UUGGACCCUG GUUGCUUUGU A	92	937-957	UACAAAGCAACCA GGGUCCAAAU	227	935-957
AD-1561279	CUGGUUGCUU UGUGUCUAGU A	93	944-964	UACUAGACACAAA GCAACCAGGG	228	942-964
AD-1561285	GCUUUGUGUC UAGUUUUCUA A	94	950-970	UUAGAAAACUAGA CACAAAGCAA	229	948-970

AD- 1561294	CUAGUUUUCU AGACCCUUCAA	95	959-979	UUGAAGGGUCUA GAAAACUAGAC	230	957-979
AD- 1561300	UUCUAGACCC UUCAUCUCUU A	96	965-985	UAAGAGAUGAAG GGUCUAGAAAA	231	963-985
AD- 1561306	ACCCUUCAUCU CUUACUUGAA	97	971-991	UUCAAGUAAGAGA UGAAGGGUCU	232	969-991
AD- 1561313	AUCUCUUACU UGAUAGACUU A	98	978-998	UAAGUCUAUCAAG UAAGAGAUGA	233	976-998
AD- 1561319	UACUUGAUAG ACUUACUAAU A	99	984-1004	UAUUAGUAAGUC UAUCAAGUAAG	234	982- 1004
AD- 1561327	CUUACUAAUA AAAUGUGAAG A	100	995-1015	UCUUCACAUUUUA UUAGUAAGUC	235	993- 1015
AD- 1561336	AAAUGUGAA GACUAGACCAA	101	1004- 1024	UUGGUCUAGUCU UCACAUUUUAU	236	1002- 1024
AD- 1561342	UGAAGACUAG ACCAAUUGUCA	102	1010- 1030	UGACAAUUGGUCU AGUCUUCACA	237	1008- 1030
AD- 1561349	UAGACCAAUU GUCAUGCUUG A	103	1017- 1037	UCAAGCAUGACAA UUGGUCUAGU	238	1015- 1037
AD- 1561360	UCAUGCUUGA CACAACUGCUA	104	1028- 1048	UAGCAGUUGUGU CAAGCAUGACA	239	1026- 1048
AD- 1561366	UUGACACAACU GCUGUGGCUA	105	1034- 1054	UAGCCACAGCAGU UGUGUCAAGC	240	1032- 1054
AD- 1561378	CUGUGGCUGG UUGGUGCUUU A	106	1046- 1066	UAAAGCACCAACC AGCCACAGCA	241	1044- 1066
AD- 1561384	CUGGUUGGUG CUUUGUUUAU	107	1052- 1072	UAUAAACAAAGCA CCAACCAGCC	242	1050- 1072

	A					
AD-1561390	GGUGCUUUGU UUAUGGUAGU A	108	1058- 1078	UACUACCAUAAAC AAAGCACCAA	243	1056- 1078
AD-1561396	UUGUUUAUGG UAGUAGUUUU A	109	1064- 1084	UAAAACUACUACC AUAAACAAAG	244	1062- 1084
AD-1561402	UGGUAGUAGU UUUUCUGUAA A	110	1071- 1091	UUUACAGAAAAC UACUACCAUA	245	1069- 1091
AD-1561408	UAGUUUUUCU GUAACACAGAA	111	1077- 1097	UUCUGUGUUACA GAAAACUACU	246	1075- 1097
AD-1561414	UUCUGUAACA CAGAAUUAUAG A	112	1083- 1103	UCUAUAUUCUGU GUUACAGAAAA	247	1081- 1103
AD-1561422	CACAGAAUUA GGAUAAGAAA	113	1091- 1111	UUUCUUAUCCUUA AUUCUGUGUU	248	1089- 1111
AD-1561433	AGAAUAAAGU ACCUUGACUU A	114	1114- 1134	UAAGUCAAGGUAC UUUAUUCUUA	249	1112- 1134
AD-1561444	CUUGACUUUG UUCACAGCAUA	115	1126- 1146	UAUGCUGUGAACA AAGUCAAGGU	250	1124- 1146
AD-1561450	UUUGUUCACA GCAUGUAGGG A	116	1132- 1152	UCCCUACAUGCUG UGAACAAAGU	251	1130- 1152
AD-1561456	CACAGCAUGUA GGGUGAUGAA	117	1138- 1158	UUCAUCACCCUAC AUGCUGUGAA	252	1136- 1158
AD-1561465	UAGGGUGAUG AGCACUCACAA	118	1147- 1167	UUGUGAGUGCUC AUCACCCUACA	253	1145- 1167
AD-1561471	GAUGAGCACU CACAAUUGUU A	119	1153- 1173	UAACAAUUGUGAG UGCUCUACAC	254	1151- 1173

AD- 1561478	ACUCACAAUUG UUGACUAAAA	120	1160- 1180	UUUUAGUCAACAA UUGUGAGUGC	255	1158- 1180
AD- 1561489	UUGACUAAAA UGCUGCUUUU A	121	1171- 1191	UAAAAGCAGCAUU UUAGUCAACA	256	1169- 1191
AD- 1561498	AUGCUGCUUU UAAAACAUAG A	122	1180- 1200	UCUAUGUUUUAA AAGCAGCAUUU	257	1178- 1200
AD- 1561504	CUUUUAAAAC AUAGGAAAGU A	123	1186- 1206	UACUUUCCUAUGU UUUAAAAGCA	258	1184- 1206
AD- 1561513	CAUAGGAAAG UAGAAUGGUU A	124	1195- 1215	UAACCAUUCUACU UUCCUAUGUU	259	1193- 1215
AD- 1561521	AGUAGAAUGG UUGAGUGCAA A	125	1203- 1223	UUUGCACUCAACC AUUCUACUUU	260	1201- 1223
AD- 1561527	AUGGUUGAGU GCAAUCCAUA	126	1209- 1229	UAUGGAUUUGCAC UCAACCAUUC	261	1207- 1229
AD- 1561534	AGUGCAAUCC AUAGCACAAA	127	1216- 1236	UUUGUGCUAUGG AUUUGCACUCA	262	1214- 1236
AD- 1561542	UCCAUAGCACA AGAUAAAUA	128	1224- 1244	UAAUUUAUCUUG UGCUAUGGAUU	263	1222- 1244
AD- 1561551	CAAGAUAAAU UGAGCUAGUU A	129	1233- 1253	UAACUAGCUCAAU UUAUCUUGUG	264	1231- 1253
AD- 1561562	GAGCUAGUUA AGGCAAUCAA	130	1244- 1264	UUGAUUUGCCUU AACUAGCUCAA	265	1242- 1264
AD- 1561570	UAAGGCAAU CAGGUAAAUA A	131	1252- 1272	UAUUUUACCUGA UUUGCCUUAAC	266	1250- 1272
AD-	AGGUAAAUA	132	1263-	UGAAUCAUGACUA	267	1261-

1561581	GUCAUGAUUC A		1283	UUUUACCUGA		1283
AD- 1561591	GUCAUGAUUC UAUGUAAUGU A	133	1273- 1293	UACAUUACAUAGA AUCAUGACUA	268	1271- 1293
AD- 1561601	UAUGUAAUGU AAACCAGAAAA	134	1283- 1303	UUUUCUGGUUUA CAUUACAUAGA	269	1281- 1303
AD- 1561613	UCAUGAUUUC AAGAUGUUAU A	135	1313- 1333	UAUAACAUCUUGA AAUCAUGAAC	270	1311- 1333
AD- 1561651	CUUUUGAAUU ACAGAGAUAU A	136	1411- 1431	UAUAUCUCUGUAA UUCAAAAGUC	271	1409- 1431
AD- 1561679	UUAGAGUUGU GAUACAGAGU A	137	1463- 1483	UACUCUGUAUCAC AACUCUAAUU	272	1461- 1483
AD- 1561686	UACAGAGUAU AUUUCCAUUC A	138	1475- 1495	UGAAUGGAAUA UACUCUGUAUC	273	1473- 1495
AD- 1561694	AUAUUCCAU UCAGACAAUAA	139	1483- 1503	UUAUUGUCUGAA UGGAAUAUAC	274	1481- 1503
AD- 1561703	UUCAGACAAU AUAUCAUAACA	140	1492- 1512	UGUUAUGAUUA UUGUCUGAAUG	275	1490- 1512
AD- 1447598	UUGUGAUACA GAGUAUUAUU A	141	1835- 1855	UAAAUAUACUCUG UAUCACAACU	276	1833- 1855

**Таблица 4. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК к СА2 для модификации посредством GalNAc**

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон н в NM_000 067.3	Антисмысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_0000 67.3
-------------------	---	------------	---------------------------	---	------------	-------------------------

AD-1559459	AGAUCGGUGC CGAUUCCUGC U	277	32-52	AGCAGGAAUCGGC ACCGAUCUGG	412	30-52
AD-1559476	CGCGACCAUGU CCCAUCACUU	278	69-89	AAGUGAUGGGAC AUGGUCGCGCU	413	67-89
AD-1559481	GUACGGCAAAC ACAACGGACU	279	93-113	AGUCCGUUGUGU UUGCCGUACCC	414	91-113
AD-1559487	CAAACACAACG GACCUGAGCU	280	99-119	AGCUCAGGUCCGU UGUGUUUGCC	415	97-119
AD-1559497	GGACCUGAGC ACUGGCAUAA U	281	109-129	AUUAUGCCAGUG CUCAGGUCCGU	416	107-129
AD-1559503	GAGCACUGGC AUAAGGACUU U	282	115-135	AAAGUCCUUAUGC CAGUGCUCAG	417	113-135
AD-1559514	GUUGACAUCG ACACUCAUACU	283	166-186	AGUAUGAGUGUC GAUGUCAACAG	418	164-186
AD-1559524	ACACUCAUACA GCCAAGUAUU	284	176-196	AAUACUUGGCUG UAUGAGUGUCG	419	174-196
AD-1559531	UACAGCCAAGU AUGACCCUUU	285	183-203	AAAGGGUCAUACU UGGCUGUAUG	420	181-203
AD-1559537	CAAGUAUGACC CUUCCCUGAU	286	189-209	AUCAGGGAAGGG UCAUACUUGGC	421	187-209
AD-1559543	UGUCUGUUUC CUAUGAUCAA U	287	215-235	AUUGAUCAUAGG AAACAGACAGG	422	213-235
AD-1559552	CCUAUGAUCAA GCAACUCCU	288	224-244	AGGAAGUUGCUU GAUCAUAGGAA	423	222-244
AD-1559560	CAAGCAACUUC CCUGAGGAUU	289	232-252	AAUCCUCAGGGAA GUUGCUUGAU	424	230-252
AD-1559570	CCCUGAGGAUC CUCAACAAUU	290	242-262	AAUUGUUGAGGA UCCUCAGGGAA	425	240-262

AD-1559579	UCCUCAACAAU GGUCAUGCUU	291	251-271	AAGCAUGACCAUU GUUGAGGAUC	426	249-271
AD-1559585	ACAAUGGUCA UGC UUUAAC U	292	257-277	AGUUGAAAGCAU GACCAUUGUUG	427	255-277
AD-1559594	AUGCUUUCAA CGUGGAGUUU U	293	266-286	AAAACUCCACGUU GAAAGCAUGA	428	264-286
AD-1559602	AACGUGGAGU UUGAUGACUC U	294	274-294	AGAGUCAUCAAAC UCCACGUUGA	429	272-294
AD-1559613	UGAUGACUCU CAGGACAAAG U	295	285-305	ACUUUGUCCUGA GAGUCAUCAA	430	283-305
AD-1559620	UCUCAGGACAA AGCAGUGCUU	296	292-312	AAGCACUGCUUU GUCCUGAGAGU	431	290-312
AD-1559626	GACAAAGCAG UGCUCAAGGG U	297	298-318	ACCCUUGAGCACU GCUUUGUCCU	432	296-318
AD-1559638	UGGCACUUAC AGAUUGAUUC U	298	330-350	AGAAUCAAUUCUG UAAGUGCCAUC	433	328-350
AD-1559644	UUACAGAUUG AUUCAGUUUC U	299	336-356	AGAAACUGAAUCA AUCUGUAAGU	434	334-356
AD-1559654	AUUCAGUUUC ACUUUCACUG U	300	346-366	ACAGUGAAAGUG AAACUGAAUCA	435	344-366
AD-1559660	UCACUUGAUG GACAAGGUUC U	301	370-390	AGAACCUUGUCCA UCAAGUGAAC	436	368-390
AD-	GAUGGACAAG	302	376-396	AUGCUCUGAACCU	437	374-396

1559666	GUUCAGAGCA U			UGUCCAUCA		
AD- 1559672	CAAGGUUCAG AGCAUACUGU U	303	382-402	AACAGUAUGCUCU GAACCUUGUC	438	380-402
AD- 1559678	UCAGAGCAUAC UGUGGAUAAU	304	388-408	AUUAUCCACAGUA UGCUCUGAAC	439	386-408
AD- 1559699	AAGAAUAUG CUGCAGAACU U	305	409-429	AAGUUCUGCAGCA UAUUUCUUUU	440	407-429
AD- 1559705	UAUGCUGCAG AACUUCACUU U	306	415-435	AAAGUGAAGUUC UGCAGCAUAUU	441	413-435
AD- 1559711	GCAGAACUUCA CUUGGUUCAU	307	421-441	AUGAACCAAGUGA AGUUCUGCAG	442	419-441
AD- 1559717	CUUCACUUGG UUCACUGGAA U	308	427-447	AUCCAGUGAACC AAGUGAAGUU	443	425-447
AD- 1559728	UCACUGGAACA CCAAUAUGU	309	438-458	ACAUUUUGGUG UCCAGUGAAC	444	436-458
AD- 1559735	UUUGGGAAAG CUGUGCAGCA U	310	463-483	AUGCUGCACAGCU UCCCCAAAU	445	461-483
AD- 1559747	GUGCAGCAACC UGAUGGACUU	311	475-495	AAGUCCAUCAGGU UGCUGCACAG	446	473-495
AD- 1559753	CAACCUGAUG GACUGGCCGU U	312	481-501	AACGGCCAGUCCA UCAGGUUGCU	447	479-501
AD- 1559765	CUGGCCGUUC UAGGUUUUU U	313	493-513	AAAAUACCUAGA ACGGCCAGUC	448	491-513
AD-	UGAAGGUUGG	314	515-535	AUUUAGCGCUGCC	449	513-535

1559768	CAGCGCUAAAU			AACCUUCAA		
AD- 1559777	GCAGCGCUAAA CCGGGCCUUU	315	524-544	AAAGGCCCGGUU UAGCGCUGCCA	450	522-544
AD- 1559788	CCGGGCCUUCA GAAAGUUGUU	316	535-555	AACAACUUUCUGA AGGCCCGGUU	451	533-555
AD- 1559794	CUUCAGAAAG UUGUUGAUGU U	317	541-561	AACAUCAACAACU UUCUGAAGGC	452	539-561
AD- 1559803	GUUGUUGAUG UGCUGGAUUC U	318	550-570	AGAAUCCAGCACA UCAACAACUU	453	548-570
AD- 1559814	GCUGGAUUCC AUUAAAACAA U	319	561-581	AUUGUUUUAUG GAAUCCAGCAC	454	559-581
AD- 1559821	UCCAUUAAAAC AAAGGGCAAU	320	568-588	AUUGCCCUUUGU UUUAAUGGAAU	455	566-588
AD- 1559827	AAAACAAAGG GCAAGAGUGC U	321	574-594	AGCACUCUUGCCC UUUGUUUUAA	456	572-594
AD- 1559836	GGCAAGAGUG CUGACUUCAC U	322	583-603	AGUGAAGUCAGCA CUCUUGCCCU	457	581-603
AD- 1559843	GUGCUGACUU CACUAACUUCU	323	590-610	AGAAGUUAGUGA AGUCAGCACUC	458	588-610
AD- 1559849	ACUUCACUAAC UUCGAUCCUU	324	596-616	AAGGAUCGAAGU UAGUGAAGUCA	459	594-616
AD- 1559862	CGAUCCUCGU GGCCUCCUUC U	325	609-629	AGAAGGAGGCCAC GAGGAUCGAA	460	607-629
AD- 1559868	UCGUGGCCUC CUUCCUGAAU U	326	615-635	AAUUCAGGAAGG AGGCCACGAGG	461	613-635

AD-1559874	CCUCCUUCCUG AAUCCUUGGU	327	621-641	ACCAAGGAUUCAG GAAGGAGGCC	462	619-641
AD-1559881	CCUGAAUCCU UGGAUUACUG U	328	628-648	ACAGUAAUCCAAG GAUUCAGGAA	463	626-648
AD-1559887	UCCUUGGAUU ACUGGACCUA U	329	634-654	AUAGGUCCAGUAA UCCAAGGAUU	464	632-654
AD-1559903	CCUACCCAGGC UCACUGACCU	330	650-670	AGGUCAGUGAGCC UGGGUAGGUC	465	648-670
AD-1559909	CCUCUUCUGG AAUGUGUGAC U	331	676-696	AGUCACACAUUCC AGAAGAGGAG	466	674-696
AD-1559916	UGGAAUGUGU GACCUGGAUU U	332	683-703	AAAUCCAGGUCAC ACAUUCCAGA	467	681-703
AD-1559923	UGUGACCUGG AUUGUGCUCU U	333	690-710	AUGAGCACA AUCC AGGUCACACA	468	688-710
AD-1559929	CUGGAUUGUG CUCAAGGAACU	334	696-716	AGUUCCUUGAGC ACAAUCCAGGU	469	694-716
AD-1559939	CUCAAGGAACC CAUCAGCGUU	335	706-726	AACGCUGAUGGG UUCCUUGAGCA	470	704-726
AD-1559945	GAACCCAUCAG CGUCAGCAGU	336	712-732	ACUGCUGACGCUG AUGGGUUCU	471	710-732
AD-1559965	CGAGCAGGUG UUGAAAUUCC U	337	732-752	AGGAAUUUCAACA CCUGCUCGCU	472	730-752
AD-1559971	GGUGUUGAAA UUCCGUAAAC U	338	738-758	AGUUUACGGAAU UUCAACACCUG	473	736-758
AD-	GAAAUUCCGU	339	744-764	AAGUUAAGUUUA	474	742-764

1559977	AAACUUAACU U			CGGAAUUUCAA		
AD- 1559983	CCGUAAACUUA ACUUCA AUGU	340	750-770	ACAUUGAAGUUA AGUUUACGGAA	475	748-770
AD- 1559987	GAGGGUGAAC CCGAAGAACUU	341	772-792	AAGUUCUUCGGG UUCACCCUCCC	476	770-792
AD- 1559993	GAACCCGAAGA ACUGAUGGUU	342	778-798	AACCAUCAGUUCU UCGGGUUCAC	477	776-798
AD- 1560001	AGAACUGAUG GUGGACAACU U	343	786-806	AAGUUGUCCACCA UCAGUUCUUC	478	784-806
AD- 1560008	AUGGUGGACA ACUGGCGCCCU	344	793-813	AGGGCGCCAGUU GUCCACCAUCA	479	791-813
AD- 1560024	CCAGCUCAGCC ACUGAAGAAU	345	811-831	AUUCUUCAGUGG CUGAGCUGGGC	480	809-831
AD- 1560030	CAGCCACUGAA GAACAGGCAU	346	817-837	AUGCCUGUUCUU CAGUGGCUGAG	481	815-837
AD- 1560036	CUGAAGAACA GGCAAUAUCAA U	347	823-843	AUUGAUUUGCCU GUUCUUCAGUG	482	821-843
AD- 1560046	GGCAAUAUCAA GCUUCCUUCU	348	833-853	AGAAGGAAGCUU UGAUUUGCCUG	483	831-853
AD- 1560053	CAAAGCUUCCU UCAAAUAAGU	349	840-860	ACUUAUUUGAAG GAAGCUUUGAU	484	838-860
AD- 1560059	UUCCUUCAAA UAAGAUGGUC U	350	846-866	AGACCAUCUUAUU UGAAGGAAGC	485	844-866
AD- 1560068	AUAAGAUGGU CCCAUAGUCU U	351	855-875	AAGACUAUGGGAC CAUCUUAUUU	486	853-875
AD- 1560074	UGGUCCCAUA GUCUGUAUCC	352	861-881	AGGAUACAGACUA UGGGACCAUC	487	859-881

	U					
AD-1560081	AUAGUCUGUA UCCAAAUAUU U	353	868-888	AAUUUUUUGGAU ACAGACUAUGG	488	866-888
AD-1560088	GUAUCCAAAU AAUGAAUCUU U	354	875-895	AAAGAUUCAUUA UUUGGAUACAG	489	873-895
AD-1560096	AUAAUGAAUC UUCGGGUGUU U	355	883-903	AAACACCCGAAGA UUCAUUUUUU	490	881-903
AD-1560103	AUCUUCGGGU GUUUCCCUUU U	356	890-910	AAAAGGGAAACAC CCGAAGAUUC	491	888-910
AD-1560109	GGGUGUUUCC CUUUAGCUAA U	357	896-916	AUUAGCUAAAGG GAAACACCCGA	492	894-916
AD-1560117	CCCUUUAGCU AAGCACAGAU U	358	904-924	AAUCUGUGCUUA GCUAAAGGGAA	493	902-924
AD-1560123	AGCUAAGCACA GAUCUACCUU	359	910-930	AAGGUAGAUCUG UGCUUAGCUAA	494	908-930
AD-1560132	CAGAUCUACCU UGGUGAUUUU	360	919-939	AAAUCACCAAGG UAGAUCUGUG	495	917-939
AD-1560139	ACCUUGGUGA UUUGGACCCU U	361	926-946	AAGGGUCCAAAUC ACCAAGGUAG	496	924-946
AD-1560150	UUGGACCCUG GUUGCUUUGU U	362	937-957	AACAAAGCAACCA GGGUCCAAAU	497	935-957
AD-1560157	CUGGUUGCUU UGUGUCUAGU U	363	944-964	AACUAGACACAAA GCAACCAGGG	498	942-964

AD-1560163	GCUUUGUGUC UAGUUUUCUA U	364	950-970	AUAGAAAACUAGA CACAAAGCAA	499	948-970
AD-1560172	CUAGUUUUCU AGACCCUUCAU	365	959-979	AUGAAGGGUCUA GAAAACUAGAC	500	957-979
AD-1560178	UUCUAGACCC UUCAUCUCUU U	366	965-985	AAAGAGAUGAAG GGUCUAGAAAA	501	963-985
AD-1560184	ACCCUUCAUCU CUUACUUGAU	367	971-991	AUCAAGUAAGAGA UGAAGGGUCU	502	969-991
AD-1560191	AUCUCUUACU UGAUAGACUU U	368	978-998	AAAGUCUAUCAAG UAAGAGAUGA	503	976-998
AD-1560197	UACUUGAUAG ACUUACUAAU U	369	984-1004	AAUUAGUAAGUC UAUCAAGUAAG	504	982-1004
AD-1560205	CUUACUAAUA AAAUGUGAAG U	370	995-1015	ACUUCACAUUUUA UUAGUAAGUC	505	993-1015
AD-1560214	AAAUGUGAA GACUAGACCAU	371	1004-1024	AUGGUCUAGUCU UCACAUUUUAU	506	1002-1024
AD-1560220	UGAAGACUAG ACCAAUUGUC U	372	1010-1030	AGACAAUUGGUC UAGUCUUCACA	507	1008-1030
AD-1560227	UAGACCAAUU GUCAUGCUUG U	373	1017-1037	ACAAGCAUGACAA UUGGUCUAGU	508	1015-1037
AD-1560238	UCAUGCUUGA CACAACUGCUU	374	1028-1048	AAGCAGUUGUGU CAAGCAUGACA	509	1026-1048
AD-1560244	UUGACACAACU GCUGUGGCUU	375	1034-1054	AAGCCACAGCAGU UGUGUCAAGC	510	1032-1054
AD-	CUGUGGCUGG	376	1046-	AAAAGCACCAACC	511	1044-1066

1560256	UUGGUGCUUU U		1066	AGCCACAGCA		
AD- 1560262	CUGGUUGGUG CUUUGUUUUAU U	377	1052- 1072	AAUAAACAAAGCA CCAACCAGCC	512	1050-1072
AD- 1560268	GGUGCUUUGU UUAUGGUAGU U	378	1058- 1078	AACUACCAUAAAC AAAGCACCAA	513	1056-1078
AD- 1560274	UUGUUUAUGG UAGUAGUUUU U	379	1064- 1084	AAAAACUACUACC AUAAACAAAG	514	1062-1084
AD- 1560280	UGGUAGUAGU UUUUCUGUAA U	380	1071- 1091	AUUACAGAAAAAC UACUACCAUA	515	1069-1091
AD- 1560286	UAGUUUUUCU GUAACACAGA U	381	1077- 1097	AUCUGUGUUACA GAAAAACUACU	516	1075-1097
AD- 1560292	UUCUGUAACA CAGAAUUAUAG U	382	1083- 1103	ACUAUAUUCUGU GUUACAGAAAA	517	1081-1103
AD- 1560300	CACAGAAUUA GGAUAAGAAU	383	1091- 1111	AUUCUUAUCCUA UAUUCUGUGUU	518	1089-1111
AD- 1560311	AGAAUAAAGU ACCUUGACUU U	384	1114- 1134	AAAGUCAAGGUAC UUUAUUCUUA	519	1112-1134
AD- 1560323	CUUGACUUUG UUCACAGCAU U	385	1126- 1146	AAUGCUGUGAACA AAGUCAAGGU	520	1124-1146
AD- 1560329	UUUGUUCACA GCAUGUAGGG U	386	1132- 1152	ACCCUACAUGCUG UGAACAAAGU	521	1130-1152
AD-	CACAGCAUGUA	387	1138-	AUCAUCACCCUAC	522	1136-1158

1560335	GGGUGAUGAU		1158	AUGCUGUGAA		
AD- 1560344	UAGGGUGAUG AGCACUCACAU	388	1147- 1167	AUGUGAGUGCUC AUCACCCUACA	523	1145-1167
AD- 1560350	GAUGAGCACU CACAUUGUU U	389	1153- 1173	AAACAAUUGUGA GUGCUCaucac	524	1151-1173
AD- 1560357	ACUCACAAUUG UUGACUAAA	390	1160- 1180	AUUUAGUCAACAA UUGUGAGUGC	525	1158-1180
AD- 1560368	UUGACUAAAA UGCUGCUUUU U	391	1171- 1191	AAAAGCAGCAUU UUAGUCAACA	526	1169-1191
AD- 1560377	AUGCUGCUUU UAAAACAUAG U	392	1180- 1200	ACUAUGUUUUA AAGCAGCAUUU	527	1178-1200
AD- 1560383	CUUUUAAAAC AUAGGAAAGU U	393	1186- 1206	AACUUUCCUAUG UUUUAAAAGCA	528	1184-1206
AD- 1560392	CAUAGGAAAG UAGAAUGGUU U	394	1195- 1215	AAACCAUUCUACU UCCUAUGUU	529	1193-1215
AD- 1560400	AGUAGAAUGG UUGAGUGCAA U	395	1203- 1223	AUUGCACUCAACC AUUCUACUUU	530	1201-1223
AD- 1560406	AUGGUUGAGU GCAAUCCAUU	396	1209- 1229	AAUGGAUUUGCA CUCAACCAUUC	531	1207-1229
AD- 1560413	AGUGCAAUCC AUAGCACAAU	397	1216- 1236	AUUGUGCUAUGG AUUUGCACUCA	532	1214-1236
AD- 1560421	UCCAUAGCACA AGAUAUUUU	398	1224- 1244	AAAUUUAUCUUG UGCUAUGGAUU	533	1222-1244
AD- 1560430	CAAGAUAAAU UGAGCUAGUU U	399	1233- 1253	AAACUAGCUCAAU UUAUCUUGUG	534	1231-1253

AD- 1560441	GAGCUAGUUA AGGCAAUA U	400	1244- 1264	AUGAUUUGCCUU AACUAGCUCAA	535	1242-1264
AD- 1560449	UAAGGCAAU CAGGUAAAAU U	401	1252- 1272	AAUUUUACCUGA UUUGCCUUAAC	536	1250-1272
AD- 1560460	AGGUAAAAUA GUCAUGAUUC U	402	1263- 1283	AGAAUCAUGACUA UUUUACCUGA	537	1261-1283
AD- 1560470	GUCAUGAUUC UAUGUAAUGU U	403	1273- 1293	AACAUUACAUAGA AUCAUGACUA	538	1271-1293
AD- 1560480	UAUGUAAUGU AAACCAGAAU	404	1283- 1303	AUUUCUGGUUUA CAUUACAUAGA	539	1281-1303
AD- 1560492	UCAUGAUUUC AAGAUGUUAU U	405	1313- 1333	AAUAACAUCUUGA AAUCAUGAAC	540	1311-1333
AD- 1560528	CUUUUGAAUU ACAGAGAUAU U	406	1411- 1431	AAUAUCUCUGUA AUUCAAAGUC	541	1409-1431
AD- 1560556	UUAGAGUUGU GAUACAGAGU U	407	1463- 1483	AACUCUGUAUCAC AACUCUAAUU	542	1461-1483
AD- 1560562	UUGUGAUACA GAGUAUUAUU U	408	1469- 1489	AAAUAUACUCUG UAUCACAACU	543	1467-1489
AD- 1560568	UACAGAGUAU AUUCCAUC U	409	1475- 1495	AGAAUGGAAUA UACUCUGUAUC	544	1473-1495
AD- 1560576	AUAUUCCA UCAGACAAUA U	410	1483- 1503	AUAUUGUCUGAA UGGAAUAUAC	545	1481-1503

AD-1560585	UUCAGACAAU AUAUCAUAAC U	411	1492-1512	AGUUAUGAUUAU UUGUCUGAAUG	546	1490-1512
------------	-------------------------------	-----	-----------	-----------------------------	-----	-----------

**Таблица 5. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК к СА2 с модификацией С16**

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишень, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-1560600	asgsauc(Ghd)GfuGfCfCfgauuccugscsa	547	VPusGfscagGfaAfUfcggcAfcCfgaucusgsg	682	CCAGAUCCGGUGCCGAUUCUGCC	817
AD-1560617	csgscga(Chd)CfaUfGfUfcccaucacsusa	548	VPusAfsugAfUfGfgacaUfgGfucgcsu	683	AGCGCGACCAUGUCCCAUCACUG	818
AD-1560622	gsusacg(Ghd)CfaAfAfCfacaacggascsa	549	VPusGfsuccGfuUfgfuguuUfgCfcguacssc	684	GGGUACGGCAAACACAACGGACC	819
AD-1560628	csasaac(Ahd)CfaAfCfGfgaccugagscsa	550	VPusGfscucAfgGfUfccguUfgUfguuugscsc	685	GGCAAACACAACGGACCUGAGCA	820
AD-1560638	gsgsacc(Uhd)GfaGfCfAfcuggcauasasa	551	VPusUfsuauGfcCfAfgugcUfcAfgguccsgsu	686	ACGGACCUGAGCACUGGCAUAAAG	821
AD-1560644	gsasgca(Chd)UfgGfCfAfuaaggacususa	552	VPusAfsaguCfcUfUfaugcCfaGfugcucsgsg	687	CUGAGCACUGGCAUAAGGACUUC	822
AD-1560655	gsusuga(Chd)AfuCfGfAfcacucauascsa	553	VPusGfsuauGfaGfUfgucgAfuGfucaacsasg	688	CUGUUGACAUCGACACUCAUACA	823
AD-1560665	ascscacu(Chd)AfuAfCfAfgccaaguasusa	554	VPusAfsuacUfuGfGfcuguAfuGfaguguscsg	689	CGACACUCAUACAGCCAAGUAUG	824

AD-1560672	usascag(Chd)Cf aAfGfUfaugacc cususa	555	VPusAfsaggGfuCfAf uacuUfgGfcuguasus g	690	CAUACAGCCAAG UAUGACCCUUC	825
AD-1560678	csasagu(Ahd)Uf gAfCfCfcuuccu gsasa	556	VPusUfscagGfgAfAf ggguCfaUfacuugsgs c	691	GCCAAGUAUGA CCCUUCCCUGAA	826
AD-1560684	usgsucu(Ghd)U fuUfCfCfuauga ucasasa	557	VPusUfsugaUfcAfUf aggaAfaCfagacasgs g	692	CCUGUCUGUUU CCUAUGAUCAA G	827
AD-1560693	cscsuau(Ghd)Af uCfAfAfgcaacu ucscsa	558	VPusGfsgaaGfuUfG fcuugAfuCfauaggsa sa	693	UUCCUAUGAUC AAGCAACUUCCC	828
AD-1560701	csasagc(Ahd)Af cUfUfCfccugag gasusa	559	VPusAfsuccUfcAfGf ggaaGfuUfgcuugsas u	694	AUCAAGCAACU UCCCUGAGGAU C	829
AD-1560711	cscscug(Ahd)Gf gAfUfCfcucaac aasusa	560	VPusAfsuugUfuGfA fggauCfcUfcaggsas a	695	UUCCCUGAGGA UCCUCAACAAUG	830
AD-1560720	uscscuc(Ahd)Af cAfAfUfggucau gcsusa	561	VPusAfsagcaUfgAfCf cauuGfuUfgaggasus c	696	GAUCCUCAACAA UGGUCAUGCUU	831
AD-1560726	ascsaau(Ghd)G fuCfAfUfgcuuu caascsa	562	VPusGfsuugAfaAfGf caugAfcCfauugusus g	697	CAACAAUGGUC AUGCUUUCAAC G	832
AD-1560735	asusgcu(Uhd)U fcAfAfCfuggag uususa	563	VPusAfsaacUfcCfAf cguuGfaAfagcausgs a	698	UCAUGCUUUCA ACGUGGAGUUU G	833
AD-1560745	asascgu(Ghd)G faGfUfUfugaug acuscsa	564	VPusGfsaguCfaUfCf aaacUfcCfacguusgs a	699	UCAACGUGGAG UUUGAUGACUC U	834
AD-1560752	usgsaug(Ahd)Cf uCfUfCfaggaca	565	VPusCfsuuuGfuCfCf ugagAfgUfcaucasas	700	UUUGAUGACUC UCAGGACAAAGC	835

	aasgsa		a			
AD-1560759	uscsuca(Ghd)G faCfAfAfacgagu gcsusa	566	VPusAfsfgcaCfuGfCf uuugUfcCfugagasgs u	701	ACUCUCAGGACA AAGCAGUGCUC	836
AD-1560765	gsascaa(Ahd)Gf cAfGfUfgcucaa ggsgsa	567	VPusCfscuUfgAfGf cacuGfcUfuugucscs u	702	AGGACAAAGCA GUGCUC AAGGG A	837
AD-1560777	usgsgca(Chd)Uf uAfCfAfgauuga uuscsa	568	VPusGfsaauCfaAfUf cuguAfaGfugccasus c	703	GAUGGCACUUA CAGAUUGAUUC A	838
AD-1560783	ususaca(Ghd)A fuUfGfAfuucag uuscsa	569	VPusGfsaaaCfuGfAf aucaAfuCfuguaasgs u	704	ACUUACAGAUU GAUUCAGUUUC A	839
AD-1560792	asusuca(Ghd)U fuUfCfAfcuuuc acusgsa	570	VPusCfsaguGfaAfAf gugaAfaCfugaauscs a	705	UGAUUCAGUUU CACUUUCACUG G	840
AD-1560798	uscsacu(Uhd)G faUfGfGfacaag guuscsa	571	VPusGfsaacCfuUfGf uccaUfcAfacugasas c	706	GUUCACUUGAU GGACAAGGUUC A	841
AD-1560804	gsasugg(Ahd)Cf aAfGfGfuucaga gcsasa	572	VPusUfsgcuCfuGfAf accuUfgUfccauscas a	707	UUGAUGGACAA GGUUCAGAGCA U	842
AD-1560810	csasagg(Uhd)U fcAfGfAfgcauac ugsusa	573	VPusAfsagUfaUfGf cucuGfaAfccuugsus c	708	GACAAGGUUCA GAGCAUACUGU G	843
AD-1560816	uscsaga(Ghd)Cf aUfAfCfugugga uasasa	574	VPusUfsuauCfcAfCf aguaUfgCfucugasas c	709	GUUCAGAGCAU ACUGUGGAUAA A	844
AD-1560837	asasgaa(Ahd)U faUfGfCfugcag aacsusa	575	VPusAfsguuCfuGfCf agcaUfaUfuucuu su	710	AAAAGAAUUAU GCUGCAGAACU U	845
AD-	usasugc(Uhd)G	576	VPusAfsaguGfaAfGf	711	AAUAUGCUGCA	846

1560845	fcAfGfAfacuuca cususa		uucuGfcAfgcauasus u		GAACUUCACUU G	
AD- 1560851	gscsaga(Ahd)Cf uUfCfAfcuuggu ucsasa	577	VPusUfsgaaCfcAfAf gugaAfgUfucugcsas g	712	CUGCAGAACUU CACUUGGUUCA C	847
AD- 1560843	csusuca(Chd)Uf uGfGfUfucacug gasasa	578	VPusUfsuccAfgUfGf aaccAfaGfugaagsus u	713	AACUUCACUUG GUUCACUGGAA C	848
AD- 1560862	ususugg(Ghd)A faAfGfCfugugca gcsasa	579	VPusUfsgcuGfcAfCf agcuUfuCfcaaasas u	714	AUUUUGGGAAA GCUGUGCAGCA A	849
AD- 1560874	gsusgca(Ghd)Cf aAfCfCfugaugg acsusa	580	VPusAfsugcCfaUfCf agguUfgCfugcacsas g	715	CUGUGCAGCAA CCUGAUGGACU G	850
AD- 1560880	csasacc(Uhd)Gf aUfGfGfacuggc cgsusa	581	VPusAfsccggCfcAfGf uccaUfcAfgguugscs u	716	AGCAACCUGAU GGACUGGCCGU U	851
AD- 1560892	csusggc(Chd)Gf uUfCfUfagguau uususa	582	VPusAfsaaaUfaCfCf uagaAfcGfgccagsus c	717	GACUGGCCGUU CUAGGUUUUUU U	852
AD- 1560895	usgsaag(Ghd)U fuGfGfCfagcgcu aasasa	583	VPusUfsuuaGfcGfCf ugccAfaCfcuucasas a	718	UUUGAAGGUUG GCAGCGCUAAAC	853
AD- 1560904	gscsagc(Ghd)Cf uAfAfAfcgggcc ususa	584	VPusAfsaggCfcCfGf guuuAfgCfugcscs a	719	UGGCAGCGCUA AACCGGGCCUUC	854
AD- 1560915	cscsggg(Chd)Cf uUfCfAfgaaagu ugsusa	585	VPusAfscaaCfuUfUf cugaAfgGfcccgsus u	720	AACCGGGCCUUC AGAAAGUUGUU	855
AD- 1560921	csusuca(Ghd)Af aAfGfUfuguuga ugsusa	586	VPusAfscauCfaAfCf aacuUfuCfugaagsgs c	721	GCCUUCAGAAA GUUGUUGAUGU G	856

AD-1560930	gsusugu(Uhd)G faUfGfUfgcugg auuscsa	587	VPusGfsaauCfcAfGf cacaUfcAfacaacsu u	722	AAGUUGUUGAU GUGCUGGAUUC C	857
AD-1560941	gscsugg(Ahd)Uf uCfCfAfuuaaaa casasa	588	VPusUfsuguUfuUfA fauggAfaUfccagcsas c	723	GUGCUGGAUUC CAUUAAAACAAA	858
AD-1560948	uscscAU(Uhd)Af aAfAfCfaaaggg casasa	589	VPusUfsugcCfcUfUf uguuUfuAfauggasa su	724	AUCCAUAUAAA ACAAAGGGCAA G	859
AD-1560954	asasaac(Ahd)Af aGfGfGfcaagag ugscsa	590	VPusGfscacUfcUfUf gcccUfuUfguuusasa a	725	UUAAAACAAAG GGCAAGAGUGC U	860
AD-1560963	gsgscaa(Ghd)Af gUfGfCfugacuu cascsa	591	VPusGfsugaAfgUfCf agcaCfuCfuugccscs u	726	AGGGCAAGAGU GCUGACUUCAC U	861
AD-1560970	gsusgcu(Ghd)A fcUfUfCfacuaac uuscsa	592	VPusGfsaagUfuAfG fugaaGfuCfagcacsu sc	727	GAGUGCUGACU UCACUAACUUC G	862
AD-1560976	ascsuuc(Ahd)Cf uAfAfCfuucgau ccsusa	593	VPusAfsuggaUfcGfAf aguuAfgUfgaaguscs a	728	UGACUUCACUA ACUUCGAUCCUC	863
AD-1560989	csgsauc(Chd)Uf cGfUfGfgccucc uuscsa	594	VPusGfsaagGfaGfG fccacGfaGfgaucgsas a	729	UUCGAUCCUCG UGGCCUCCUUC	864
AD-1560996	uscsgug(Ghd)Cf cUfCfCfuuccug aasusa	595	VPusAfsuucAfgGfAf aggaGfgCfcaggs g	730	CCUCGUGGCCUC CUUCCUGAAUC	865
AD-1561002	cscsucc(Uhd)Uf cCfUfGfauccu ugsgsa	596	VPusCfscaaGfgAfUf ucagGfaAfggaggs c	731	GGCCUCCUCCU GAAUCCUUGGA	866
AD-1561009	cscsuga(Ahd)Uf cCfUfUfggauua	597	VPusCfsaguAfaUfCf caagGfaUfucaggsas	732	UUCCUGAAUCC UUGGAUUACUG	867

	cusgsa		a		G	
AD-1561015	uscscuu(Ghd)G faUfUfAfcugga ccusasa	598	VPusUfsaggUfcCfAf guaaUfcCfaaggasus u	733	AAUCCUUGGAU UACUGGACCUA C	868
AD-1561031	cscsuac(Chd)Cf aGfGfCfucacug acscsa	599	VPusGfsgucAfgUfGf agccUfgGfguaggsus c	734	GACCUACCCAGG CUCACUGACCA	869
AD-1561037	cscsucu(Uhd)Cf uGfGfAfaugugu gascsa	600	VPusGfsucaCfaCfAf uuccAfgAfaaggsas g	735	CUCCUCUUCUG GAAUGUGUGAC C	870
AD-1561043	usgsgaa(Uhd)G fuGfUfGfaccug gaususa	601	VPusAfsaucCfaGfGf ucacAfcAfuuccasgs a	736	UCUGGAAUGUG UGACCUGGAUU G	871
AD-1561050	usgsuga(Chd)Cf uGfGfAfuugugc ucsasa	602	VPusUfsgagCfaCfAf auccAfgGfucacascs a	737	UGUGUGACCUG GAUUGUGCUCA A	872
AD-1561056	csusgga(Uhd)U fgUfGfCfucaagg aascsa	603	VPusGfsuucCfuUfG fagcaCfaAfuccagsgs u	738	ACCUGGAUUGU GCUCAAGGAACC	873
AD-1561066	csuscaa(Ghd)Gf aAfCfCfcaucagc gsusa	604	VPusAfscgcUfgAfUf ggguUfcCfuugagscs a	739	UGCUCAAGGAA CCCAUCAGCGUC	874
AD-1561072	gsasacc(Chd)Af uCfAfGfGfcugag casgsa	605	VPusCfsugcUfgAfCf gcugAfuGfgguucscs u	740	AGGAACCCAUCA GCGUCAGCAGC	875
AD-1475424	asgsaac(Uhd)G faUfGfGfuggac aacsusa	606	VPusAfsguuGfuCfCf accaUfcAfguucusus c	741	GAAGAACUGAU GGUGGACAACU G	876
AD-1561092	csgsagc(Ahd)Gf gUfGfUfugaaau ucscsa	607	VPusGfsgaaUfuUfCf aacaCfcUfgcucgscs u	742	AGCGAGCAGGU GUUGAAAUUCC G	877
AD-	gsgsugu(Uhd)G	608	VPusGfsuuuAfcGfG	743	CAGGUGUUGAA	878

1561100	faAfAfUfuccgua aasca		fauuUfcAfacaccsu sg		AUCCGUAAAC U	
AD- 1561106	gsasaau(Uhd)C fcGfUfAfaacuu aacsusa	609	VPusAfsguuAfaGfU fuuacGfgAfauuucsa sa	744	UUGAAAUUCCG UAAACUUAACU U	879
AD- 1561112	cscsgua(Ahd)Af cUfUfAfacuuca ausgsa	610	VPusCfsauuGfaAfGf uuaaGfuUfuacggsa sa	745	UCCGUAAACU UAACUCAAUG G	880
AD- 1561116	gsasggg(Uhd)G faAfCfCfcgaaga acsusa	611	VPusAfsguuCfuUfCf ggguUfcAfccucscsc	746	GGGAGGGUGAA CCCGAAGAACUG	881
AD- 1561122	gsasacc(Chd)Gf aAfGfAfacugau ggsusa	612	VPusAfsccaUfcAfGf uucuUfcGfgguucsas c	747	GUGAACCCGAA GAACUGAUGGU G	882
AD- 1561130	asusggu(Ghd)G faCfAfAfcuggcg ccscsa	613	VPusGfsggcGfcCfAf guugUfcCfaccauscs a	748	UGAUGGUGGAC AACUGGCGCCCA	883
AD- 1561146	cscsagc(Uhd)Cf aGfCfCfacugaa gasasa	614	VPusUfsucuUfcAfGf uggcUfgAfgcuggsgs c	749	GCCCAGCUCAGC CACUGAAGAAC	884
AD- 1561152	csasgcc(Ahd)Cf uGfAfAfgaacag gcsasa	615	VPusUfsgccUfgUfUf cuucAfgUfggcugsas g	750	CUCAGCCACUGA AGAACAGGCAA	885
AD- 1561158	csusgaa(Ghd)Af aCfAfGfgcaau casasa	616	VPusUfsugaUfuUfG fccugUfuCfuucagsu sg	751	CACUGAAGAACA GGCAAUAUCAA	886
AD- 1446763	uscsacu(Ghd)G faAfCfAfccaaau ausgsa	617	VPusCfsauaUfuUfG fguguUfcCfagugasa sc	752	GUUCACUGGAA CACCAAUAUG G	887
AD- 1561168	gsgscaa(Ahd)Uf cAfAfAfgcuucc uuscsa	618	VPusGfsaagGfaAfGf cuuuGfaUfuugccsus g	753	CAGGCAAUAUCAA AGCUUCCUUCA	888

AD-1561175	csasaag(Chd)Uf uCfCfUfucaaau aasgsa	619	VPusCfsuuaUfuUfG faaggAfaGfcuuugsa su	754	AUCAAAGCUUCC UUCAAAUAAGA	889
AD-1561181	ususccu(Uhd)Cf aAfAfUfaagaug guscsa	620	VPusGfsaccAfuCfUf uaauUfgAfaggaasgs c	755	GCUUCCUCAA AUAAGAUGGUC C	890
AD-1561190	asusaag(Ahd)U fgGfUfCfcgauag ucsusa	621	VPusAfsagacUfaUfGf ggacCfaUfcuuausus u	756	AAAUAGAUGG UCCCAUAGUCU G	891
AD-1561196	usgsguc(Chd)Cf aUfAfGfucugua ucscsa	622	VPusGfsgauAfcAfGf acuaUfgGfgaccasus c	757	GAUGGUCCAU AGUCUGUAUCC A	892
AD-1561203	asusagu(Chd)U fgUfAfUfccaaa uaasusa	623	VPusAfsuuaUfuUfG fgauaCfaGfacuausg sg	758	CCAUAGUCUGU AUCCAAUAUU G	893
AD-1561210	gsusauc(Chd)Af aAfUfAfaugaau cususa	624	VPusAfsagaUfuCfAf uuauUfuGfgauacsa sg	759	CUGUAUCCAAA UAAUGAAUCUU C	894
AD-1561218	asusaau(Ghd)A faUfCfUfucggg ugususa	625	VPusAfsacaCfcCfGf aagaUfuCfauuau su	760	AAAUAAUGAAU CUUCGGGUGUU U	895
AD-1561225	asuscuu(Chd)G fgGfUfGfuuucc cuususa	626	VPusAfsaagGfgAfAf acacCfcGfaagausus c	761	GAAUCUUCGGG UGUUUCCCUUU A	896
AD-1561231	gsgsgug(Uhd)U fuCfCfCfuuuagc uasasa	627	VPusUfsuagCfuAfAf agggAfaAfcacccsgsa	762	UCGGGUGUUUC CCUUUAGCUAA G	897
AD-1561239	cscscuu(Uhd)Af gCfUfAfaagcaca gasusa	628	VPusAfsucuGfuGfCf uuagCfuAfaaggsas a	763	UUCCCUUAGC UAAGCACAGAU C	898
AD-1561245	asgscua(Ahd)Gf cAfCfAfgaucua	629	VPusAfsggUfgAfUf cuguGfcUfuagcusas	764	UUAGCUAAGCA CAGAUCUACCU	899

	ccsusa		a		U	
AD-1561254	csasgau(Chd)Uf aCfCfUfugguga uususa	630	VPusAfsaauCfaCfCf aaggUfaGfaucugsus g	765	CACAGAUCUACC UUGGUGAUUUG	900
AD-1561261	ascscuu(Ghd)G fuGfAfUfuugga cccsusa	631	VPusAfsgggUfcCfAf aaucAfcCfaaggusas g	766	CUACCUUGGUG AUUUGGACCCU G	901
AD-1561272	ususgga(Chd)Cf cUfGfGfuugcuu ugsusa	632	VPusAfscaaAfgCfAf accaGfgGfuccaasas u	767	AUUUGGACCCU GGUUGCUUUGU G	902
AD-1561279	csusggu(Uhd)G fcUfUfUfguguc uagsusa	633	VPusAfsduaGfaCfAf caaaGfcAfaccagsgs g	768	CCUGGUUGCU UUGUGUCUAGU U	903
AD-1561285	gscsuuu(Ghd)U fgUfCfUfaguuu ucusasa	634	VPusUfsagaAfaAfCf uagaCfaCfaaagcsas a	769	UUGCUUUGUGU CUAGUUUUCUA G	904
AD-1561294	csusagu(Uhd)U fuCfUfAfgaccu ucsasa	635	VPusUfsgaaGfgGfU fcuagAfaAfacuagsa sc	770	GUCUAGUUUUC UAGACCCUUCA U	905
AD-1561300	ususdua(Ghd)A fcCfCfUfucaucu cususa	636	VPusAfsagaGfaUfGf aaggGfuCfuagaasas a	771	UUUUCUAGACC CUUCAUCUCUU A	906
AD-1561306	ascscuu(Uhd)Cf aUfCfUfcuuacu ugsasa	637	VPusUfscaaGfuAfAf gagaUfgAfagguscs u	772	AGACCCUUCAUC UCUUACUUGAU	907
AD-1561313	asuscuc(Uhd)U faCfUfUfgauag acususa	638	VPusAfsaguCfuAfUf caagUfaAfgagausgs a	773	UCAUCUCUAC UUGAUAGACUU A	908
AD-1561319	usascuu(Ghd)A fuAfGfAfcuuac uaasusa	639	VPusAfsuuaGfuAfAf gucuAfuCfaaguasas g	774	CUUACUUGAUA GACUUACUAAU A	909
AD-	csusuac(Uhd)Af	640	VPusCfsuucAfcAfUf	775	GACUUACUAAU	910

1561327	aUfAfAfaaugug aasgsa		uuuaUfuAfguaagsu sc		AAAAUGUGAAG A	
AD- 1561336	asasaau(Ghd)U fgAfAfGfacuaga ccsasa	641	VPusUfsgguCfuAfGf ucuuCfaCfauuuusas u	776	AUAAAAUGUGA AGACUAGACCAA	911
AD- 1561342	usgsaag(Ahd)Cf uAfGfAfccaauu guscasa	642	VPusGfsacaAfuUfGf gucuAfgUfcuucasc a	777	UGUGAAGACUA GACCAAUUGUC A	912
AD- 1561349	usasgac(Chd)Af aUfUfGfucaugc uusgsa	643	VPusCfsaagCfaUfGf acaaUfuGfgucuasgs u	778	ACUAGACCAAU UGUCAUGCUUG A	913
AD- 1561360	uscсаug(Chd)Uf uGfAfCfacaacu gcsusa	644	VPusAfsгcaGfuUfGf ugucAfaGfcaugasc a	779	UGUCAUGCUUG ACACAACUGCUG	914
AD- 1561366	ususgac(Ahd)Cf aAfCfUfgcugug gcsusa	645	VPusAfsгccAfcAfGf caguUfgUfgucaasgs c	780	GCUUGACACAAC UGCUGUGGCUG	915
AD- 1561378	csusgug(Ghd)Cf uGfGfUfuggugc uususa	646	VPusAfsaagCfaCfCf aaccAfgCfcacagsc a	781	UGCUGUGGCUG GUUGGUGCUUU G	916
AD- 1561384	csusggu(Uhd)G fgUfGfCfuugu uuasusa	647	VPusAfsuaaAfcAfAf agcaCfCfaccagscsc c	782	GGCUGGUUGGU GCUUUGUUUAU G	917
AD- 1561390	gsgsugc(Uhd)U fuGfUfUfuaugg uagsusa	648	VPusAfsсuaCfcAfUf aaacAfaAfgcaccsas a	783	UUGGUGCUUUG UUUAUGGUAGU A	918
AD- 1561396	ususguu(Uhd)A fuGfGfUfaguag uuususa	649	VPusAfsaaaCfuAfCf uaccAfuAfaacaasas g	784	CUUUGUUUAUG GUAGUAGUUUU U	919
AD- 1561402	usgsgua(Ghd)U faGfUfUfuuucu guasasa	650	VPusUfsuacAfgAfAf aaacUfaCfuaccasus a	785	UAUGGUAGUAG UUUUUCUGUAA C	920

AD-1561408	usasguu(Uhd)U fuCfUfGfuaaca cagsasa	651	VPusUfscugUfgUfU facagAfaAfaacuasc s u	786	AGUAGUUUUUC UGUAACACAGA A	921
AD-1561414	ususcug(Uhd)A faCfAfCfagaaua uasgsa	652	VPusCfsuauAfuUfCf ugugUfuAfcagaas as a	787	UUUUCUGUAAC ACAGAAUUAUAG G	922
AD-1561422	csascag(Ahd)Af uAfUfAfggauaa gasasa	653	VPusUfsucuUfaUfCf cuauAfuUfcugugs sus u	788	AACACAGAAUUAU AGGAUAAGAAA	923
AD-1561433	asgsaau(Ahd)Af aGfUfAfccuuga cususa	654	VPusAfsaguCfaAfGf guacUfuUfauucus u sa	789	UAAGAAUAAAG UACCUUGACUU U	924
AD-1561444	csusuga(Chd)Uf uUfGfUfucacag casusa	655	VPusAfsugcUfgUfGf aacaAfaGfucaags gs u	790	ACCUUGACUUU GUUCACAGCAU G	925
AD-1561450	ususugu(Uhd)C faCfAfGfcaugua ggsgsa	656	VPusCfscuAfcAfUf gcugUfgAfacaaas gs u	791	ACUUUGUUCAC AGCAUGUAGGG U	926
AD-1561456	csascag(Chd)Af uGfUfAfggguga ugsasa	657	VPusUfscuAfcAfCf cuacAfuGfcugugs as a	792	UUCACAGCAUG UAGGGUGAUGA G	927
AD-1561465	usasggg(Uhd)G faUfGfAfgcacuc acsasa	658	VPusUfsgugAfgUfG fcucaUfcAfccuasc s a	793	UGUAGGGUGAU GAGCACUCACAA	928
AD-1561471	gsasuga(Ghd)Cf aCfUfCfacaauu gususa	659	VPusAfsacaAfuUfGf ugagUfgCfucauc sas c	794	GUGAUGAGCAC UCACAAUUGUU G	929
AD-1561478	ascsuca(Chd)Af aUfUfGfuugacu aasasa	660	VPusUfsuuaGfuCfA facaUfuGfugagus g sc	795	GCACUCACAAUU GUUGACUAAAA	930
AD-1561489	ususgac(Uhd)A faAfAfUfgcugcu	661	VPusAfsaaaGfcAfGf cauuUfuAfgucaasc s	796	UGUUGACUAAA AUGCUGCUUUU	931

	uususa		a		A	
AD-1561498	asusgcu(Ghd)Cf uUfUfUfaaaaca uasgsa	662	VPusCfsuauGfuUfU fuaaaAfgCfagcausu su	797	AAAUGCUGCUU UUAACAUAAG G	932
AD-1561504	csusuuu(Ahd)A faAfCfAfuaggaa agsusa	663	VPusAfsuuUfcCfUf auguUfUfuaaaagscs a	798	UGCUUUUAAAA CAUAGGAAAGU A	933
AD-1561513	csasuag(Ghd)Af aAfGfUfagaaug gususa	664	VPusAfsaccAfuUfcf uacuUfuCfcuaugsus u	799	AACAUAGGAAA GUAGAAUGGUU G	934
AD-1561521	asgsuag(Ahd)Af uGfGfUfugagug casasa	665	VPusUfsugcAfcUfcf aaccAfuUfcuacus u	800	AAAGUAGAAUG GUUGAGUGCAA A	935
AD-1561527	asusggu(Uhd)G faGfUfGfcaau ccasusa	666	VPusAfsuggAfuUfU fgcacUfcAfaccausus c	801	GAAUGGUUGAG UGCAAUCCA A	936
AD-1561534	asgsugc(Ahd)Af aUfcCfauagca casasa	667	VPusUfsuguGfcUfA fuggaUfuUfgcacusc sa	802	UGAGUGCAAU CCAUAGCACAAG	937
AD-1561542	uscscAu(Ahd)Gf cAfCfAfaagauaa aususa	668	VPusAfsauuUfaUfcf uuguGfcUfauggasu su	803	AAUCCAUAAGCAC AAGAUAAAUUG	938
AD-1561551	csasaga(Uhd)Af aAfUfUfagacua gususa	669	VPusAfsacuAfgCfUf caauUfuAfucuugsus g	804	CACAAGAUAAU UGAGCUAGUUA	939
AD-1561562	gsasgcu(Ahd)Gf uUfAfAfggcaaa ucsasa	670	VPusUfsgauUfuGfC fcuuaAfcUfagcucsa sa	805	UUGAGCUAGUU AAGGCAAUCA G	940
AD-1561570	usasagg(Chd)Af aAfUfcfagguaa aasusa	671	VPusAfsuuuUfaCfCf ugauUfuGfccuusa sc	806	GUUAAGGCAAA UCAGGUAAA A	941
AD-	asgsgua(Ahd)Af	672	VPusGfsaauCfaUfGf	807	UCAGGUAAA A	942

1561581	aUfAfGfucauga uuscsa		acuaUfuUfuaccusgs a		AGUCAUGAUUC U	
AD- 1561591	gsuscAu(Ghd)A fuUfCfUfaugua augSusa	673	VPusAfscauUfaCfAf uagaAfuCfaugacsus a	808	UAGUCAUGAUU CUAUGUAAUGU A	943
AD- 1561601	usasugu(Ahd)A fuGfUfAfaacca gaasasa	674	VPusUfsuucUfgGfU fuuacAfuUfacauasg sa	809	UCUAUGUAAUG UAAACCAGAAAA	944
AD- 1561613	uscsaug(Ahd)U fuUfCfAfagaug uuasusa	675	VPusAfsuaaCfaUfCf uugaAfaUfcaugasas c	810	GUUCAUGAUUU CAAGAUGUUAU A	945
AD- 1561651	csusuuu(Ghd)A faUfUfAfcagag auasusa	676	VPusAfsuauCfuCfUf guaaUfuCfaaaagsus c	811	GACUUUUGAAU UACAGAGAUAU A	946
AD- 1561679	ususaga(Ghd)U fuGfUfGfauaca gagsusa	677	VPusAfsucUfgUfAf ucacAfaCfucuaasus u	812	AAUUAGAGUUG UGAUACAGAGU A	947
AD- 1561686	usascag(Ahd)Gf uAfUfAfuuucca uuscsa	678	VPusGfsaauGfgAfAf auauAfcUfcuguasus c	813	GAUACAGAGUA UAUUUCCAUC A	948
AD- 1561694	asusauu(Uhd)C fcAfUfUfcagaca ausasa	679	VPusUfsauuGfuCfU fgaaUGfgAfaauausa sc	814	GUAUAAUUCCA UUCAGACAAUA U	949
AD- 1561703	ususcag(Ahd)Cf aAfUfAfuaucau aascsa	680	VPusGfsuuaUfgAfU fauauUfgUfcugaasu sg	815	CAUUCAGACAA UAUAUCAUAAC U	950
AD- 1447598	ususgug(Ahd)U faCfAfGfaguau auususa	681	VPusAfsaauAfuAfCf ucugUfaUfcacaascs u	816	AGUUGUGAUAC AGAGUAUAUUU C	951

**Таблица 6. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК к СА2 с модификацией GalNAc**

Название дуплекса	Смысловая последовательность	SEQ ID	Антисмысловая последовательность	SEQ ID	Последовательность мРНК-	SEQ ID
-------------------	------------------------------	--------	----------------------------------	--------	--------------------------	--------

	ЛЬНОСТЬ от 5' к 3'	NO:	ТЬ от 5' к 3'	NO:	МИШЕНЬ, от 5' к 3'	NO:
AD- 1559459	asgsaucgGfuG fCfCfgauuccug cuL96	952	asGfscagGfaAfUfcgg cAfcCfgaucusgsg	1087	CCAGAUCGGUG CCGAUUCCUGC C	817
AD- 1559476	csgscgacCfaUf GfUfcccaucac uuL96	953	asAfsugAfufGfGfga caUfgGfucgcsu	1088	AGCGCGACCAU GUCCCAUCACU G	818
AD- 1559481	gsusacggCfaAf AfCfacaacggac uL96	954	asGfsuccGfuUfGfug uuUfgCfcguacscsc	1089	GGGUACGGCAA ACACAACGGAC C	819
AD- 1559487	csasaacaCfaAf CfGfgaccugagc uL96	955	asGfscucAfgGfUfccg uUfgUfguuugscsc	1090	GGCAAACACAA CGGACCUGAGC A	820
AD- 1559497	gsgsaccuGfaGf CfAfcuggcaua auL96	956	asUfsuauGfcCfAfgu gcUfcAfgguccsgsu	1091	ACGGACCUGAG CACUGGCAUAA G	821
AD- 1559503	gsasgcacUfgGf CfAfuaaggacu uuL96	957	asAfsaguCfcUfUfau gcCfaGfugcucsasg	1092	CUGAGCACUGG CAUAAGGACUU C	822
AD- 1559514	gsusugacAfuCf GfAfcacucaua cuL96	958	asGfsuauGfaGfUfgu cgAfuGfucaacsasg	1093	CUGUUGACAUC GACACUCAUAC A	823
AD- 1559524	ascSacucAfuAf CfAfgccaagua uuL96	959	asAfsuacUfuGfGfcu guAfuGfaguguscsg	1094	CGACACUCAUA CAGCCAAGUAU G	824
AD- 1559531	usascagcCfaAf GfUfaugaccu uuL96	960	asAfsaggGfuCfAfuac uUfgGfcuguasusg	1095	CAUACAGCCAA GUAUGACCCUU C	825
AD- 1559537	csasaguaUfgAf CfCfcuuccuga uL96	961	asUfscagGfgAfAfggg uCfaUfacuugsgsc	1096	GCCAAGUAUGA CCCUUCCCUGA A	826

AD-1559543	usgsucugUfuUfCfCfuaugaucauL96	962	asUfsugaUfcAfUfaggaAfaCfagacasgsg	1097	CCUGUCUGUUU CCUAUGAUCAA G	827
AD-1559552	cscsuaugAfuCfAfAfgcaacuuccuL96	963	asGfsgaaGfuUfGfcuugAfuCfauaggsasa	1098	UUCCUAUGAUC AAGCAACUUCC C	828
AD-1559560	csasagcaAfcUfUfCfccugaggauuL96	964	asAfsuccUfcAfGfggaAfuUfGfcuugsasu	1099	AUCAAGCAACU UCCCUGAGGAU C	829
AD-1559570	cscscugaGfgAfUfCfcucaacaaauL96	965	asAfsuugUfuGfAfggaufCfcUfcaggsasa	1100	UUCCCUGAGGA UCCUCAACAAU G	830
AD-1559579	uscscucaAfcAfAfUfggucaugcuuL96	966	asAfsagcaUfgAfCfcauugfuUfgaggasusc	1101	GAUCCUCAACA AUGGUCAUGCU U	831
AD-1559585	ascsaauGfuCfAfUfgcuuucacuL96	967	asGfsuugAfaAfGfcaugAfcCfauugusug	1102	CAACAAUGGUC AUGCUUUCAAC G	832
AD-1559594	asusgcuUfcAfAfCfuggaguuuL96	968	asAfsaacUfcCfAfcguuGfaAfagcausgsa	1103	UCAUGCUUUCA ACGUGGAGUU UG	833
AD-1559602	asascgugGfaGfUfUfugaugacucuL96	969	asGfsaguCfaUfCfaaaufCfCfacguusgsa	1104	UCAACGUGGAG UUUGAUGACUC U	834
AD-1559613	usgsaugaCfuCfUfCfaggacaaaguL96	970	asCfsuuuGfuCfCfugagAfgUfcaucasasa	1105	UUUGAUGACUC UCAGGACAAAG C	835
AD-1559620	uscscucagGfaCfAfAfagcagugcuuL96	971	asAfsagcaCfuGfCfuugUfcCfugagasgsu	1106	ACUCUCAGGAC AAAGCAGUGCU C	836
AD-1559626	gsascaaaGfcAfGfUfgcucaagg	972	asCfscuuUfgAfGfcacuGfcUfuugucscsu	1107	AGGACAAAGCA GUGCUCAAGGG	837

	guL96				A	
AD-1559638	usgsgcacUfuAfCfAfgauugauucul96	973	asGfsaauCfaAfUfcuguAfaGfugccasusc	1108	GAUGGCACUUA CAGAUUGAUUC A	838
AD-1559644	ususacagAfuUfGfAfuucagauucul96	974	asGfsaaaCfuGfAfaucAfuCfuguaasgsu	1109	ACUUCACAGAUU GAUUCAGUUUC A	839
AD-1559654	asusucagUfuUfCfAfcuuucacugul96	975	asCfsaguGfaAfAfgugaAfaCfugaauscsa	1110	UGAUUCAGUU UCACUUUCACU GG	840
AD-1559660	uscsacuuGfaUfGfGfacaagguucul96	976	asGfsaacCfuUfGfuccaUfcAfagugasasc	1111	GUUCACUUGAU GGACAAGGUUC A	841
AD-1559666	gsasuggaCfaAfGfGfuucagagcaul96	977	asUfsgcuCfuGfAfaccauUfgUfccaucsasa	1112	UUGAUGGACAA GGUUCAGAGCA U	842
AD-1559672	csasagguUfcAfGfAfgcauacuguuL96	978	asAfsacagUfaUfGfcucuGfaAfcuugsusc	1113	GACAAGGUUCA GAGCAUACUGU G	843
AD-1559678	uscsagagCfaUfAfcfuguggauauL96	979	asUfsuauCfcAfCfaguauUfgCfucugasasc	1114	GUUCAGAGCAU ACUGUGGAUAA A	844
AD-1559699	asasgaaaUfaUfGfCfugcagaacuuL96	980	asAfsguuCfuGfCfagcaUfaUfuucuuusu	1115	AAAAGAAUUAU GCUGCAGAACU U	845
AD-1559705	usasugcuGfcAfGfAfacuucacuuL96	981	asAfsaguGfaAfGfucucuGfcAfgcauasusu	1116	AAUAUGCUGCA GAACUUCACUU G	846
AD-1559711	gscsagaaCfuUfCfAfcuugguucul96	982	asUfsgaaCfcAfAfgugaAfgUfucugcsasg	1117	CUGCAGAACUU CACUUGGUUCA C	847
AD-	csusucacUfuG	983	asUfsuccAfgUfGfaac	1118	AACUUCACUUG	848

1559717	fGfUfucacugga auL96		cAfaGfugaagsusu		GUUCACUGGAA C	
AD- 1559728	uscsacugGfaAf CfAfccaaauau guL96	984	asCfsauaUfuUfGfgu guUfcCfagugasasc	1119	GUUCACUGGAA CACCAAUAUG G	849
AD- 1559735	ususugggAfaA fGfCfugugcagc auL96	985	asUfsgcuGfcAfCfagc uUfuCfccaasasu	1120	AUUUUGGGAA AGCUGUGCAGC AA	850
AD- 1559747	gsusgcagCfaAf CfCfugauggac uuL96	986	asAfsrucCfaUfCfagg uUfgCfugcacsasg	1121	CUGUGCAGCAA CCUGAUGGACU G	851
AD- 1559753	csasaccuGfaUf GfGfacuggccg uuL96	987	asAfsccggCfcAfGfucc aUfcAfgguugscsu	1122	AGCAACCUGAU GGACUGGCCGU U	852
AD- 1559765	csusggccGfuUf CfUfagguauuu uuL96	988	asAfsaaaUfaCfCfuag aAfcGfgccagsusc	1123	GACUGGCCGUU CUAGGUUUUU UU	853
AD- 1559768	usgsaaggUfuG fGfCfagcgcuaa auL96	989	asUfsuuaGfcGfCfug ccAfaCfcuucasasa	1124	UUUGAAGGUU GGCAGCGCUAA AC	854
AD- 1559777	gscsagcgCfuAf AfAfccgggccuu uL96	990	asAfsaggCfcCfGfguu uAfgCfugcscsa	1125	UGGCAGCGCUA AACCGGGCCUU C	855
AD- 1559788	cscsgggcCfuUf CfAfgaaaguug uuL96	991	asAfscaaCfuUfUfcug aAfgGfcccgsusu	1126	AACCGGGCCUU CAGAAAGUUGU U	856
AD- 1559794	csusucagAfaAf GfUfuguugaug uuL96	992	asAfscauCfaAfCfaac uUfuCfugaagsgsc	1127	GCCUUCAGAAA GUUGUUGAUG UG	857
AD- 1559803	gsusuguuGfaU fGfUfgcuggau ucuL96	993	asGfsauaCfcAfGfcac aUfcAfacaacsusu	1128	AAGUUGUUGA UGUGCUGGAU UCC	858

AD-1559814	gscsuggaUfuCfCfAfuuaaaaca auL96	994	asUfsuguUfuUfAfauggAfaUfccagcsasc	1129	GUGCUGGAUU CCAUUAAAACA AA	859
AD-1559821	uscscuuAfaAfAfCfaaagggcaauL96	995	asUfsugcCfcUfUfuguuUfuAfauggasasu	1130	AUUGCAUUAAA ACAAAGGGCAA G	860
AD-1559827	asasaacaAfaGfGfGfcaagagugcuL96	996	asGfscacUfcUfUfgccUfuUfguuuusasa	1131	UUAAAACAAAG GGCAAGAGUGC U	861
AD-1559836	gsgscaagAfgUfGfCfugacuucacuL96	997	asGfsugaAfgUfCfagcaCfuCfuugccscsu	1132	AGGGCAAGAGU GCUGACUUCAC U	862
AD-1559843	gsusgcugAfcUfUfCfacaacuucacuL96	998	asGfsaagUfuAfgUfugaaGfuCfagcacsusc	1133	GAGUGCUGACU UCACUAACUUC G	863
AD-1559849	ascsuucaCfuAfAfCfuucgaucuuL96	999	asAfsuggaUfcGfAfauguAfgUfgaaguscsa	1134	UGACUUCACUA ACUUCGAUCCU C	864
AD-1559862	csgsauccUfcGfUfGfgccuccuucacuL96	1000	asGfsaagGfaGfGfccacGfaGfgaucgsasa	1135	UUCGAUCCUCG UGGCCUCCUUC C	865
AD-1559868	uscsguggCfcUfCfCfuuccugaaauL96	1001	asAfsuucAfgGfAfauggaGfgCfcacgasgsg	1136	CCUCGUGGCCU CCUUCUGAAU C	866
AD-1559874	cscsuccuUfcCfUfGfaaaccuugguL96	1002	asCfscaaGfgAfUfucaGfaAfggaggscsc	1137	GGCCUCCUUC UGAAUCCUUGG A	867
AD-1559881	cscsugaaUfcCfUfUfggauuacugul96	1003	asCfsaguAfaUfCfaaGfaUfucaggsasa	1138	UUCUGAAUCC UUGGAUUACU GG	868
AD-1559887	uscscuugGfaUfUfAfcuggaccu	1004	asUfsaggUfcCfAfguaaUfcCfaaggasusu	1139	AAUCCUUGGAU UACUGGACCUA	869

	auL96				C	
AD-1559903	cscsuaccCfaGf GfCfucacugacc uL96	1005	asGfsgucAfgUfGfag ccUfgGfguaggsusc	1140	GACCUACCCAG GCUCACUGACC A	870
AD-1559909	cscsucuuCfuGf GfAfauguguga cuL96	1006	asGfsucaCfaCfAfuuc cAfgAfagaggsasg	1141	CUCCUCUUCUG GAAUGUGUGA CC	871
AD-1559916	usgsgaaUfGfG fUfGfaccuggau uuL96	1007	asAfsaucCfaGfGfuca cAfcAfuuccasgsa	1142	UCUGGAAUGU GUGACCUGGAU UG	872
AD-1559923	usgsugacCfuGf GfAfuugugcuc auL96	1008	asUfsgagCfaCfAfauc cAfgGfucacacsa	1143	UGUGUGACCU GGAUUGUGCU CAA	873
AD-1559929	csusggauUfgU fGfCfucaaggaa cuL96	1009	asGfsuucCfuUfGfag caCfaAfuccagsgsu	1144	ACCUGGAUUGU GCUCAAGGAAC C	874
AD-1559939	csuscaagGfaAf CfCfcaucagcgu uL96	1010	asAfscgcUfgAfUfggg uUfcCfuugagscsa	1145	UGCUCAAGGAA CCCAUCAGCGU C	875
AD-1559945	gsasacccAfuCf AfGfGcugacgag uL96	1011	asCfsugcUfgAfCfGcu gAfuGfGguucscsu	1146	AGGAACCCAUC AGCGUCAGCAG C	876
AD-1559965	csgsagcaGfgUf GfUfugaaaauuc cuL96	1012	asGfsgaaUfuUfCfaa caCfcUfgcucgscsu	1147	AGCGAGCAGGU GUUGAAAUUCC G	877
AD-1559971	gsgsuguuGfaA fAfUfuccguaaa cuL96	1013	asGfsuuuAfcGfGfaa uuUfcAfacaccsusg	1148	CAGGUGUUGA AAUUCCGUAAA CU	878
AD-1559977	gsasaauuCfcGf UfAfaacuuaac uuL96	1014	asAfsguuAfaGfUfuu acGfgAfauuucsasa	1149	UUGAAAUUCCG UAAACUUAACU U	879
AD-	cscsguaaAfcUf	1015	asCfsauuGfaAfGfuu	1150	UUCCGUAAACU	880

1559983	UfAfacucaa guL96		aaGfuUfuacggsasa		UAACUCAAUG G	
AD- 1559987	gsasggguGfaAf CfCfcgaagaacu uL96	1016	asAfsuuCfuUfCf ggguUfcAfccucscsc	1151	GGGAGGGUGA ACCCGAAGAAC UG	881
AD- 1559993	gsasacccGfaAf GfAfacugaugg uuL96	1017	asAfsccaUfcAfGfuuc uUfcGfgguucsasc	1152	GUGAACCCGAA GAACUGAUGG UG	882
AD- 1560001	asgsaacuGfaU fGfGfuggacaac uuL96	1018	asAfsuuGfuCfCfacc aUfcAfguucususc	1153	GAAGAACUGAU GGUGGACAACU G	883
AD- 1560008	asusggugGfaCf AfAfcuggcgccc uL96	1019	asGfsggcGfcCfAfguu gUfcCfaccuscsa	1154	UGAUGGUGGA CAACUGGCGCC CA	884
AD- 1560024	cscsagcuCfaGf CfCfacugaagaa uL96	1020	asUfsucuUfcAfGfug gcUfgAfgcuggsgsc	1155	GCCCAGCUCAG CCACUGAAGAA C	885
AD- 1560030	csasgccaCfuGf AfAfgaacaggca uL96	1021	asUfsgccUfgUfUfcu ucAfgUfggcugsasg	1156	CUCAGCCACUG AAGAACAGGCA A	886
AD- 1560036	csusgaagAfaCf AfGfgcaaauc auL96	1022	asUfsugaUfuUfGfcc ugUfuCfuucagsusg	1157	CACUGAAGAAC AGGCAAUAUCAA A	887
AD- 1560046	gsgscaaaUfcAf AfAfgcuuccuu cuL96	1023	asGfsaagGfaAfGfcu uuGfaUfuugccsusg	1158	CAGGCAAUCA AAGCUUCCUUC A	888
AD- 1560053	csasaagcUfuCf CfUfucaaaauaa guL96	1024	asCfsuuaUfuUfGfaa ggAfaGfcuuugsasu	1159	AUCAAGCUUC CUUCAAAUAAG A	889
AD- 1560059	ususccuuCfaAf AfUfaagauggu cuL96	1025	asGfsaccAfuCfUfua uuUfgAfaggaasgsc	1160	GCUUCCUCAA AUAAGAUGGUC C	890

AD-1560068	asusaagaUfgG fUfCfccauaguc uuL96	1026	asAfsyacUfaUfGfgg acCfaUfcuuaususu	1161	AAAUAAGAUGG UCCCAUAGUCU G	891
AD-1560074	usgsguccCfaUf AfGfucuguauc cuL96	1027	asGfsgauAfcAfGfac uaUfgGfgaccasusc	1162	GAUGGUCCCAU AGUCUGUAUCC A	892
AD-1560081	asusagucUfgU fAfUfccaaauaa uuL96	1028	asAfsuuaUfuUfGfga uaCfaGfacuausgsg	1163	CCAUAGUCUGU AUCCAAAUAAU G	893
AD-1560088	gsusauccAfaAf UfAfaugaaucu uuL96	1029	asAfsagaUfuCfAfu auUfuGfgauacsasg	1164	CUGUAUCCAAA UAAUGAAUCUU C	894
AD-1560096	asusaaugAfaU fCfUfucgggugu uuL96	1030	asAfsacaCfcCfGfaag aUfuCfauuaususu	1165	AAAUAAUGAAU CUUCGGGUGU UU	895
AD-1560103	asuscuucGfgG fUfGfuuuccu uuuL96	1031	asAfsaagGfgAfAfa cCfcGfaagaususc	1166	GAAUCUUCGGG UGUUUCCCUU UA	896
AD-1560109	gsgsguguUfuC fCfCfuuuagcua auL96	1032	asUfsuagCfuAfAfa ggAfaAfcacccsgsa	1167	UCGGGUGUUU CCCUUUAGCUA AG	897
AD-1560117	cscscuuuAfgCf UfAfaagcacaga uuL96	1033	asAfsucuGfuGfCfu agCfuAfaaggsasa	1168	UUCCCUUAGC UAAGCACAGAU C	898
AD-1560123	asgscuaaGfcAf CfAfgaucuacc uuL96	1034	asAfsggUfgAfUfcug uGfcUfuagcusasa	1169	UUAGCUAAGCA CAGAUACCU U	899
AD-1560132	csasgaucUfaCf CfUfuggugauu uuL96	1035	asAfsaaUcfaCfCfaag gUfaGfaucugsusg	1170	CACAGAUAC CUUGGUGAUU UG	900
AD-1560139	ascscuugGfuG fAfUfuuggacc	1036	asAfsggUfcCfAfaa cAfcCfaaggsasg	1171	CUACCUUGGUG AUUUGGACCCU	901

	uuL96				G	
AD-1560150	ususggacCfcUf GfGfuugcuuug uuL96	1037	asAfscaaAfgCfAfac aGfgGfuccaasasu	1172	AUUUGGACCCU GGUUGCUUUG UG	902
AD-1560157	csusgguuGfcU fUfUfgugucua guuL96	1038	asAfsduaGfaCfAfaa aGfcAfacagsgsg	1173	CCCUGGUUGCU UUGUGUCUAG UU	903
AD-1560163	gscsuuugUfgU fCfUfaguuuuc uauL96	1039	asUfsagaAfaAfCfuag aCfaCfaaagcsasa	1174	UUGCUUUGUG UCUAGUUUUC UAG	904
AD-1560172	csusaguuUfuC fUfAfgaccuuc auL96	1040	asUfsgaaGfgGfUfcu agAfaAfacuagsasc	1175	GUCUAGUUUU CUAGACCCUUC AU	905
AD-1560178	ususcuaGfcCf CfUfucaucucu uuL96	1041	asAfsagaGfaUfGfaa ggGfuCfuagaasasa	1176	UUUUCUAGACC CUUCAUCUCUU A	906
AD-1560184	ascscuuCfaUf CfUfcuuacuug auL96	1042	asUfscaaGfuAfAfga gaUfgAfgagguscsu	1177	AGACCCUUCAU CUCUUACUUGA U	907
AD-1560191	asuscucuUfaCf UfUfgauagacu uuL96	1043	asAfsaguCfuAfUfcaa gUfaAfgagausgsa	1178	UCAUCUCUAC UUGAUAGACU UA	908
AD-1560197	usascuugAfuA fGfAfcuuacuaa uuL96	1044	asAfsuuaGfuAfAfgu cuAfuCfaaguasasg	1179	CUUACUUGAUA GACUUACUAAU A	909
AD-1560205	csusuacuAfaU fAfAfaaugugaa guL96	1045	asCfsuucAfcAfUfuu uaUfuAfguaagsusc	1180	GACUUACUAAU AAAAUGUGAAG A	910
AD-1560214	asasaugUfgA fAfGfacuagacc auL96	1046	asUfsgguCfuAfGfuc uuCfaCfauuuusas	1181	AUAAAAUGUGA AGACUAGACCA A	911
AD-	usgsaagaCfuAf	1047	asGfsacaAfuUfGfgu	1182	UGUGAAGACUA	912

1560220	GfAfccaaugu cuL96		cuAfgUfcuucascsa		GACCAAUUGUC A	
AD- 1560227	usasgaccAfaUf UfGfucaugcuu guL96	1048	asCfsaagCfaUfGfaca aUfuGfgucuasgsu	1183	ACUAGACCAAU UGUCAUGCUU GA	913
AD- 1560238	uscсаugcUfuG fAfCfacaacugc uuL96	1049	asAfsгcaGfuUfGfug ucAfaGfcaugascsa	1184	UGUCAUGCUU GACACAACUGC UG	914
AD- 1560244	ususgacaCfaAf CfUfgcuguggc uuL96	1050	asAfsгccAfcAfGfcag uUfgUfgucaasgsc	1185	GCUUGACACAA CUGCUGUGGCU G	915
AD- 1560256	csusguggCfuGf GfUfuggugcuu uuL96	1051	asAfsaagCfaCfCfaac cAfgCfcacagscsa	1186	UGCUGUGGCU GGUUGGUGCU UUG	916
AD- 1560262	csusgguuGfgU fGfCfuuuuuuu auuL96	1052	asAfsuaaAfcAfAfagc aCfcAfaccagscsc	1187	GGCUGGUUGG UGCuuUGUUU AUG	917
AD- 1560268	gsgsugcuUfuG fUfUfuauggua guuL96	1053	asAfscuaCfcAfUfaaa cAfaAfgcaccsasa	1188	UUGGUGCUUU GUUUAUGGUA GUA	918
AD- 1560274	ususguuuAfuG fGfUfaguaguu uuuL96	1054	asAfsaaaCfuAfCfuac cAfuAfaacaasag	1189	CUUUGUUUAU GGUAGUAGUU UUU	919
AD- 1560280	usgsuagUfaG fUfUfuucugu aaL96	1055	asUfsuacAfgAfAfaaa cUfaCfuaccasusa	1190	UAUGGUAGUA GUUUUUCUGU AAC	920
AD- 1560286	usasguuuUfuC fUfGfuaacacag auL96	1056	asUfscugUfgUfUfac agAfaAfaacuascsu	1191	AGUAGUUUUU CUGUAACACAG AA	921
AD- 1560292	ususcuguAfaCf AfCfagaauaua guL96	1057	asCfsuauAfuUfCfug ugUfuAfcagaasasa	1192	UUUUCUGU AAC ACAGAAUAUAG G	922

AD-1560300	csascagaAfuAf UfAfggaaaga auL96	1058	asUfsucuUfaUfCfcu auAfuUfcugugsusu	1193	AACACAGAAUA UAGGAUAAGAA A	923
AD-1560311	asgsaauaAfaG fUfAfccuugacu uuL96	1059	asAfsaguCfaAfGfgu acUfuUfauucususa	1194	UAAGAAUAAAG UACCUUGACUU U	924
AD-1560323	csusugacUfuU fGfUfucacagca uuL96	1060	asAfsugcUfgUfGfaa caAfaGfucaagsgsu	1195	ACCUUGACUUU GUUCACAGCAU G	925
AD-1560329	ususuguuCfaC fAfGfcauguagg guL96	1061	asCfscuuAfcAfUfgcu gUfgAfacaaasgsu	1196	ACUUUGUUCAC AGCAUGUAGGG U	926
AD-1560335	csascagcAfuGf UfAfgggugaug auL96	1062	asUfscauCfaCfCfcua cAfuGfcugugsasa	1197	UUCACAGCAUG UAGGGUGAUG AG	927
AD-1560344	usasggguGfaU fGfAfgcacucac auL96	1063	asUfsgugAfgUfGfcu caUfcAfccuascsa	1198	UGUAGGGUGA UGAGCACUCAC AA	928
AD-1560350	gsasugagCfaCf UfCfacaauugu uuL96	1064	asAfsacaAfuUfGfug agUfgCfucaucsasc	1199	GUGAUGAGCAC UCACAAUUGUU G	929
AD-1560357	ascsucacAfaUf UfGfuugacuaa auL96	1065	asUfsuuaGfuCfAfac aaUfuGfugagusgsc	1200	GCACUCACAAU UGUUGACUAAA A	930
AD-1560368	ususgacuAfaAf AfUfgcugcuuu uuL96	1066	asAfsaaaGfcAfGfcau uUfuAfgucaascsa	1201	UGUUGACUAAA AUGCUGCUUU UA	931
AD-1560377	asusgcugCfuUf UfUfaaaacaua guL96	1067	asCfsuuaGfuUfUfua aaAfgCfagcaususu	1202	AAAUGCUGCUU UAAAAACAUAG G	932
AD-1560383	csusuuaAfaA fCfAfuaggaaag	1068	asAfsuuUfcCfUfau guUfuUfaaaagscsa	1203	UGCUIIUAAAA CAUAGGAAAGU	933

	uuL96				A	
AD-1560392	csasuaggAfaAf GfUfagaauggu uuL96	1069	asAfsaccAfuUfCfuac uUfuCfcuaugsusu	1204	AACAUAGGAAA GUAGAAUGGU UG	934
AD-1560400	asgsuagaAfuG fGfUfugagugc aauL96	1070	asUfsugcAfcUfCfaac cAfuUfcuacususu	1205	AAAGUAGAAUG GUUGAGUGCA AA	935
AD-1560406	asusgguuGfaG fUfGfcaaaucca uuL96	1071	asAfsuggAfuUfUfgc acUfcAfaccaususc	1206	GAAUGGUUGA GUGCAAUCCA UA	936
AD-1560413	asgsugcaAfaUf CfCfauagcaciaa uL96	1072	asUfsuguGfcUfAfug gaUfuUfgcacuscsa	1207	UGAGUGCAAU CCAUAGCACAA G	937
AD-1560421	uscscuaGfcAf CfAfangauaaa uuL96	1073	asAfsauuUfaUfCfu guGfcUfauggasusu	1208	AAUCCAUAGCA CAAGAUAAA G	938
AD-1560430	csasagauAfaAf UfUfgagcuagu uuL96	1074	asAfsacuAfgCfUfcaa uUfuAfucuuugsug	1209	CACAAGAUAAA UUGAGCUAGU UA	939
AD-1560441	gsasgcuaGfuU fAfAfggcaaauc auL96	1075	asUfsgauUfuGfCfcu uaAfcUfagcucsasa	1210	UUGAGCUAGU UAAGGCAAUUC AG	940
AD-1560449	usasaggcAfaAf UfCfagguaaaa uuL96	1076	asAfsuuuUfaCfCfug auUfuGfccuuasasc	1211	GUUAAGGCAAA UCAGGUAAAAU A	941
AD-1560460	asgsuuaaAfaU fAfGfucaugau ucuL96	1077	asGfsaauCfaUfGfac uaUfuUfuaccusgsa	1212	UCAGGUAAAAU AGUCAUGAUUC U	942
AD-1560470	gsuscaugAfuU fCfUfauguaau guuL96	1078	asAfscauUfaCfAfuag aAfuCfaugacsusa	1213	UAGUCAUGAU UCUAUGUAAU GUA	943
AD-	usasuguaAfuG	1079	asUfsuucUfgGfUfu	1214	UCUAUGUAAU	944

1560480	fUfAfaaccagaa auL96		acAfuUfacauasgsa		GUAAACCAGAA AA	
AD- 1560492	uscsaugaUfuU fCfAfagauguua uuL96	1080	asAfsuaaCfaUfCfu gaAfaUfcaugasasc	1215	GUUCAUGAUU UCAAGAUGUUA UA	945
AD- 1560528	csusuugAfaU fUfAfcagagaua uuL96	1081	asAfsuauCfuCfUfg aaUfuCfaaaagsusc	1216	GACUUUUGAA UUACAGAGAU UA	946
AD- 1560556	ususagagUfuG fUfGfauacaga guuL96	1082	asAfcscucUfgUfAfu cAfaCfucuaasusu	1217	AAUUAGAGUU GUGAUACAGAG UA	947
AD- 1560562	ususgugaUfaC fAfGfaguauau uuuL96	1083	asAfsaauAfuAfCfuc ugUfaUfcacaascsu	1218	AGUUGUGAU CAGAGUAUAUU UC	948
AD- 1560568	usascagaGfuAf UfAfuuuccauu cuL96	1084	asGfsaauGfgAfAfau auAfcUfcuguasusc	1219	GAUACAGAGUA UAUUCCAUC A	949
AD- 1560576	asusauuuCfcAf UfUfcagacaau auL96	1085	asUfsauuGfuCfUfg auGfgAfaauasusc	1220	GUAUAUUCCA UUCAGACAAUA U	950
AD- 1560585	ususcagaCfaAf UfAfuaucuaa cuL96	1086	asGfsuuaUfgAfUfau auUfgUfcugaasusc	1221	CAUUCAGACAA UAUAUCAUAAC U	951

**Таблица 7. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК к СА2**

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_000067.3	Антисмысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_000067.3
AD-1784188.1	UGUUUCCUAU GAUCAAGCAA A	1222	219-239	UUUGCUTGAU CAUAGGAAAC AGA	1533	217-239

AD-1784189.1	UGACUUCACU AACUUCGAUC A	1223	594-614	UGAUCGAAG UUAGUGAAG UCAGC	1534	592-614
AD-1784190.1	CAAAGCUUCC UUCAAAUAAG A	1224	840-860	UCUUUUUUG AAGGAAGCUU UGAU	1535	838-860
AD-1784191.1	UCAAGCUUC CUUCAAAUAA A	1225	839-859	UUUATUTGAA GGAAGCUUU GAUU	1536	837-859
AD-1784192.1	GUCUGUAUCC AAAUAAUGAA A	1226	871-891	UUUCAUUAU UUGGAUACA GACUA	1537	869-891
AD-1784193.1	GUCUGUAUCC AAAUAAUGAA A	1226	871-891	UUUCAUTAUU UGGAUACAGA CUA	1538	869-891
AD-1784194.1	AUUCCGUAAA CUUAACUUCA A	1227	747-767	UUGAAGTUAA GUUUACGGA AUUU	1539	745-767
AD-1784195.1	UCCUAUGAUC AAGCAACUUC A	1228	223-243	UGAAGUTGCU UGAUCAUAG GAAA	1540	221-243
AD-1784196.1	GUUUCUAUG AUCAAGCAAC A	1229	220-240	UGUUGCTUGA UCAUAGGAAA CAG	1541	218-240
AD-1784197.1	AUGCUGCUUU UAAAACAUAG A	1230	1180-1200	UCUATGTUUU AAAAGCAGCA UUU	1542	1178-1200
AD-1784198.1	CAUUCAGACA AUUAUCAUA A	1231	1490-1510	UUAUGATAUA UUGUCUGAA UGGA	1543	1488-1510
AD-1784199.1	GACUUCACUA ACUUCGAUCC	1232	595-615	UGGAUCGAA GUUAGUGAA	1544	593-615

	A			GUCAG		
AD-1784200.1	CCAUUCAGAC AAUAUAUCAU A	1233	1489-1509	UAUGAUUA UUGUCUGAA UGGAA	1545	1487-1509
AD-1784201.1	UCUGUAUCCA AAUAAUGAAU A	1234	872-892	UAUUCATUAU UUGGAUACA GACU	1546	870-892
AD-1784202.1	AAUCAAGCU UCCUCAAU A	1235	837-857	UAUUTGAAGG AAGCUUUGA UUUG	1547	835-857
AD-1784203.1	AUUCAGACAA UAUAUCAUAA A	1236	1491-1511	UUUATGAUUA AUUGUCUGA AUGG	1548	1489-1511
AD-1784204.1	CCGUAACUU AACUCAAUG A	1237	750-770	UCAUUGAAG UUAAGUUUA CGGAA	1549	748-770
AD-1784205.1	CCGUAACUU AACUCAAUG A	1237	750-770	UCAUTGAAGU UAAGUUUAC GGAA	1550	748-770
AD-1784206.1	GUGCUGACUU CACUAACUUC A	1238	590-610	UGAAGUTAGU GAAGUCAGCA CUC	1551	588-610
AD-1784207.1	AAGCUCCUU CAAUAAGAU A	1239	842-862	UAUCUUAUU UGAAGGAAGC UUUG	1552	840-862
AD-1784208.1	AAGCUCCUU CAAUAAGAU A	1239	842-862	UAUCTUAUUU GAAGGAAGCU UUG	1553	840-862
AD-1784209.1	AAAUCCGUA AACUUAACUU A	1240	745-765	UAAGUUAAG UUUACGGAA UUUCA	1554	743-765
AD-	CUGUCUGUU	1241	214-234	UUGATCAUAG	1555	212-234

1784210.1	UCCUAUGAUC AA			GAAACAGACA GGG		
AD- 1784211.1	GUAUCCAAAU AAUGAAUCUU A	1242	875-895	UAAGAUUCAU UAUUUGGAU ACAG	1556	873-895
AD- 1784212.1	GUAUCCAAAU AAUGAAUCUU A	1242	875-895	UAAGAUTCAU UAUUUGGAU ACAG	1557	873-895
AD- 1784213.1	CUGACUUCAC UAACUUCGAU A	1243	593-613	UAUCGAAGU UAGUGAAGU CAGCA	1558	591-613
AD- 1784214.1	GCUUCCUUCA AAUAAGAUGG A	1244	844-864	UCCAUCUUUAU UUGAAGGAA GCUU	1559	842-864
AD- 1784215.1	GCUUCCUUCA AAUAAGAUGG A	1244	844-864	UCCATCTUAU UUGAAGGAA GCUU	1560	842-864
AD- 1784216.1	AAAUCAAAGC UUCCUUCAAA A	1245	836-856	UUUUGAAGG AAGCUUUGA UUUGC	1561	834-856
AD- 1784217.1	AGCUUCCUUC AAAUAAGAUG A	1246	843-863	UCAUCUUUUU UGAAGGAAGC UUU	1562	841-863
AD- 1784218.1	UGCUGCUUU UAAAACAUAG GA	1247	1181-1201	UCCUAUGUU UUAAAAGCAG CAUU	1563	1179-1201
AD- 1784219.1	AGGCAAUACA AAGCUUCCUU A	1248	832-852	UAAGGAAGCU UUGAUUUGC CUGU	1564	830-852
AD- 1784220.1	AGGCAAUACA AAGCUUCCUU A	1248	832-852	UAAGGAAGCU UUGAUUUGC CUGU	1564	830-852

AD-1784221.1	GGCAAUCAA AGCUUCCUUC A	1249	833-853	UGAAGGAAGC UUUGAUUUG CCUG	1565	831-853
AD-1784222.1	AAAGCUUCCU UCAAAUAAGA A	1250	841-861	UUCUUUUUU GAAGGAAGCU UUGA	1566	839-861
AD-1784223.1	AAAGCUUCCU UCAAAUAAGA A	1250	841-861	UUCUTATUUG AAGGAAGCUU UGA	1567	839-861
AD-1784224.1	UAAAAUGCUG CUUUUAAAAC A	1251	1176-1196	UGUUUUAAA AGCAGCAUUU UAGU	1568	1174-1196
AD-1784225.1	AAGAAUAAAG UACCUUGACU A	1252	1113-1133	UAGUCAAGG UACUUUAUUC UUUA	1569	1111-1133
AD-1784226.1	AGAAUAAAGU ACCUUGACUU A	1253	1114-1134	UAAGUCAAGG UACUUUAUUC UUA	1570	1112-1134
AD-1784227.1	AGAAUAAAGU ACCUUGACUU A	1253	1114-1134	UAAGTCAAGG UACUUUAUUC UUA	1571	1112-1134
AD-1784228.1	GUCUGUUUCC UAUGAUCAAG A	1254	216-236	UCUUGATCAU AGGAAACAGA CAG	1572	214-236
AD-1784229.1	UCCGUAAACU UAACUUCAAU A	1255	749-769	UAUUGAAGU UAAGUUUAC GGAAU	1573	747-769
AD-1784230.1	CCUCUUCUGG AAUGUGUGAC A	1256	676-696	UGUCACACAU UCCAGAAGAG GAG	1574	674-696
AD-1784231.1	UAUCCAAUA AUGAAUCUUC	1257	876-896	UGAAGATUCA UUAUUUGGA	1575	874-896

	A			UACA		
AD-1784232.1	UCUGUUUCCU AUGAUCAAGC A	1258	217-237	UGCUTGAUCA UAGGAAACAG ACA	1576	215-237
AD-1784233.1	GUUGACAUCG ACACUCAUAC A	1259	166-186	UGUATGAGU GUCGAUGUCA ACAG	1577	164-186
AD-1784234.1	AAGUACCUUG ACUUUGUUCA A	1260	1120-1140	UUGAACAAAG UCAAGGUACU UUA	1578	1118-1140
AD-1784235.1	AAGUACCUUG ACUUUGUUCA A	1260	1120-1140	UUGAACAAAG UCAAGGUACU UUA	1578	1118-1140
AD-1784236.1	CAGAUCUACC UUGGUGAUU UA	1261	919-939	UAAATCACCA AGGUAGAUC UGUG	1579	917-939
AD-1784237.1	CUGGAUUGU GCUCAAGGAA CA	1262	696-716	UGUUCCTUGA GCACAAUCCA GGU	1580	694-716
AD-1784238.1	UGCUIIUAAA ACAUAGGAAA A	1263	1184-1204	UUUUCCTAUG UUUUIAAAAGC AGC	1581	1182-1204
AD-1784239.1	UGCUGACUUC ACUAAUUCG A	1264	591-611	UCGAAGUUA GUGAAGUCA GCACU	1582	589-611
AD-1784240.1	UGCUGACUUC ACUAAUUCG A	1264	591-611	UCGAAGTUAG UGAAGUCAGC ACU	1583	589-611
AD-1784241.1	GAAAUUCCGU AAACUUAACU A	1265	744-764	UAGUUAAGU UUACGGAAU UUCAA	1584	742-764
AD-	GAAAUUCCGU	1265	744-764	UAGUTAAGUU	1585	742-764

1784242.1	AAACUUAACU A			UACGGAAUU UCAA		
AD- 1784243.1	UAAGGCAAU CAGGUAAAAU A	1266	1252-1272	UAUUUUACCU GAUUUGCCU UAAC	1586	1250-1272
AD- 1784244.1	UAAGGCAAU CAGGUAAAAU A	1266	1252-1272	UAUUTUACCU GAUUUGCCU UAAC	1587	1250-1272
AD- 1784245.1	GUUCUAGGU AUUUUUUUG AAA	1267	499-519	UUUCAAAAAA AUACCUAGAA CGG	1588	497-519
AD- 1784246.1	AAGAUAAAU GAGCUAGUUA A	1268	1234-1254	UUAACUAGCU CAUUUUAUCU UGU	1589	1232-1254
AD- 1784247.1	UUAGCUAAGC ACAGAUCUAC A	1269	908-928	UGUAGATCUG UGCUUAGCUA AAG	1590	906-928
AD- 1784248.1	CUUCACUAAC UUCGAUCCUC A	1270	597-617	UGAGGATCGA AGUUAGUGA AGUC	1591	595-617
AD- 1784249.1	AAUUCCGUAA ACUUAACUUC A	1271	746-766	UGAAGUTAAG UUUACGGAA UUUC	1592	744-766
AD- 1784250.1	CUGCUUUUAA AACAUAGGAA A	1272	1183-1203	UUUCCUAUG UUUUAAAAGC AGCA	1593	1181-1203
AD- 1784251.1	CUGUUGACAU CGACACUCAU A	1273	164-184	UAUGAGTGUC GAUGUCAACA GGG	1594	162-184
AD- 1784252.1	UUCACUAACU UCGAUCCUCG A	1274	598-618	UCGAGGAUCG AAGUUAGUG AAGU	1595	596-618

AD- 1784253.1	GCUAAGCACA GAUCUACCUU A	1275	911-931	UAAGGUAGA UCUGUGCUU AGCUA	1596	909-931
AD- 1784254.1	UAAAGUACCU UGACUUUGU UA	1276	1118-1138	UAACAAAGUC AAGGUACUU UAUU	1597	1116-1138
AD- 1784255.1	AAA AUGCUGC UUUUAAAACA A	1277	1177-1197	UUGUTUTAAA AGCAGCAUUU UAG	1598	1175-1197
AD- 1784256.1	G CUGCUUUUA AAACAUAGGA A	1278	1182-1202	U UCCUAUGU UUUAAAAGCA GCAU	1599	1180-1202
AD- 1784257.1	G CUGCUUUUA AAACAUAGGA A	1278	1182-1202	UUCCTATGUU UUAAAAGCAG CAU	1600	1180-1202
AD- 1784258.1	UCAUGAUUCU AUGUAAUGU AA	1279	1274-1294	UUACAUUACA UAGAAUCAUG ACU	1601	1272-1294
AD- 1784259.1	UCAUGAUUCU AUGUAAUGU AA	1279	1274-1294	UUACAUTACA UAGAAUCAUG ACU	1602	1272-1294
AD- 1784260.1	AGUGCUGACU UCACUAACUU A	1280	589-609	UAAGUUAGU GAAGUCAGCA CUCU	1603	587-609
AD- 1784261.1	CUAAGCACAG AUCUACCUUG A	1281	912-932	UCAAGGTAGA UCUGUGCUU AGCU	1604	910-932
AD- 1784262.1	CACUAACUUC GAUCCUCGUG A	1282	600-620	UCACGAGGAU CGAAGUUAG UGAA	1605	598-620
AD- 1784263.1	CUGAAGAACA GGCAAAUCAA	1283	823-843	UUUGAUTUGC CUGUUCUUCA	1606	821-843

	A			GUG		
AD-1784264.1	AAAGUACCUU GACUUUGUUC A	1284	1119-1139	UGAACAAAGU CAAGGUACUU UAU	1607	1117-1139
AD-1784265.1	GCUUUGUUU AUGGUAGUA GUA	1285	1061-1081	UACUACTACC AUAACAAAG CAC	1608	1059-1081
AD-1784266.1	CAUGAUUCUA UGUAAUGUA AA	1286	1275-1295	UUUACATUAC AUAGAAUCAU GAC	1609	1273-1295
AD-1784267.1	CGUUCUAGGU AUUUUUUUG AA	1287	498-518	UUCAAAAAA UACCUAGAAC GGC	1610	496-518
AD-1784268.1	UUCUAGGUA UUUUUUUGA AGA	1288	500-520	UCUUCAAAA AAUACCUAGA ACG	1611	498-520
AD-1784269.1	UCCUCCUGA AUCCUUGGAU A	1289	623-643	UAUCCAAGGA UUCAGGAAG GAGG	1612	621-643
AD-1784270.1	UCCUCCUGA AUCCUUGGAU A	1289	623-643	UAUCCAAGGA UUCAGGAAG GAGG	1612	621-643
AD-1784271.1	GACUAAAUG CUGCUIIUAA A	1290	1173-1193	UUUAAAAGCA GCAUUUUAG UCAA	1613	1171-1193
AD-1784272.1	GACUAAAUG CUGCUIIUAA A	1290	1173-1193	UUUAAAAGCA GCAUUUUAG UCAA	1613	1171-1193
AD-1784273.1	AACAGGCAA UCAAGCUUC A	1291	829-849	UGAAGCTUUG AUUUGCCUG UUCU	1614	827-849
AD-	CCUCCUGAA	1292	624-644	UAAUCCAAGG	1615	622-644

1784274.1	UCCUUGGAUU A			AUUCAGGAAG GAG		
AD- 1784275.1	UGAUGACUCU CAGGACAAAG A	1293	285-305	UCUUTGTCCU GAGAGUCAUC AAA	1616	283-305
AD- 1784276.1	UGGAGUUUG AUGACUCUCA GA	1294	278-298	UCUGAGAGUC AUCAAACUCC ACG	1617	276-298
AD- 1784277.1	AUCCAAAUAA UGAAUCUUCG A	1295	877-897	UCGAAGAUUC AUUAUUUGG AUAC	1618	875-897
AD- 1784278.1	AUCCAAAUAA UGAAUCUUCG A	1295	877-897	UCGAAGAUUC AUUAUUUGG AUAC	1618	875-897
AD- 1784279.1	UUGACUUUG UUCACAGCAU GA	1296	1127-1147	UCAUGCTGUG AACAAAGUCA AGG	1619	1125-1147
AD- 1784280.1	AGAUCUACCU UGGUGAUUU GA	1297	920-940	UCAAAUCACC AAGGUAGAUC UGU	1620	918-940
AD- 1784281.1	AUGGUAGUA GUUUUUCUG UAA	1298	1070-1090	UUACAGAAAA ACUACUACCA UAA	1621	1068-1090
AD- 1784282.1	AUGGUAGUA GUUUUUCUG UAA	1298	1070-1090	UUACAGAAAA ACUACUACCA UAA	1621	1068-1090
AD- 1784283.1	CCUUGACUUU GUUCACAGCA A	1299	1125-1145	UUGCTGTGAA CAAAGUCAAG GUA	1622	1123-1145
AD- 1784284.1	CCUGGAUUGU GCUCAAGGAA A	1300	695-715	UUUCCUTGAG CACAAUCCAG GUC	1623	693-715

AD- 1784285.1	GAGCUAGUUA AGGCAAUA A	1301	1244-1264	UUGATUTGCC UUAACUAGCU CAA	1624	1242-1264
AD- 1784286.1	ACUGAAGAAC AGGCAAUA A	1302	822-842	UUGATUTGCC UGUUCUUA GUGG	1625	820-842
AD- 1784287.1	UGAAGAACAG GCAAUCAA A	1303	824-844	UUUUGATUU GCCUGUUCUU CAGU	1626	822-844
AD- 1784288.1	CUCCUCUUCU GGAAUGUGU GA	1304	674-694	UCACACAUUC CAGAAGAGGA GGG	1627	672-694
AD- 1784289.1	CUCCUCUUCU GGAAUGUGU GA	1304	674-694	UCACACAUUC CAGAAGAGGA GGG	1627	672-694
AD- 1784290.1	GCUUUCAACG UGGAGUUUG AA	1305	268-288	UUCAACUCC ACGUUGAAAG CAU	1628	266-288
AD- 1784291.1	UGC UUUAAC GUGGAGUUU GA	1306	267-287	UCAAACUCCA CGUUGAAAGC AUG	1629	265-287
AD- 1784292.1	UGC UUUAAC GUGGAGUUU GA	1306	267-287	UCAAACTCCA CGUUGAAAGC AUG	1630	265-287
AD- 1784293.1	CAGGUA AAAU AGUCAUGAUU A	1307	1262-1282	UAAUCATGAC UAUUUUACCU GAU	1631	1260-1282
AD- 1784294.1	CUGUAUCCAA AUAAUGAAUC A	1308	873-893	UGAUTCAUUA UUUGGAUAC AGAC	1632	871-893
AD- 1784295.1	AAGGCAAUC AGGUAAAUA	1309	1253-1273	UUAUTUTACC UGAUUUGCC	1633	1251-1273

	A			UUAA		
AD-1784296.1	CCUCCUCCU GAAUCCUUGG A	1310	621-641	UCCAAGGAUU CAGGAAGGAG GCC	1634	619-641
AD-1784297.1	UUCCUUCAAA UAAGAUGGUC A	1311	846-866	UGACCATCUU AUUUGAAGG AAGC	1635	844-866
AD-1784298.1	UUGAAAUUCC GUAAACUAAA A	1312	742-762	UUUAAGTUUA CGGAAUUUCA ACA	1636	740-762
AD-1784299.1	ACACUCAUAC AGCCAAGUAU A	1313	176-196	UAUACUTGGC UGUAUGAGU GUCG	1637	174-196
AD-1784300.1	GCACAGAUCU ACCUUGGUGA A	1314	916-936	UUCACCAAGG UAGAUCUGU GCUU	1638	914-936
AD-1784301.1	CUUUCAACGU GGAGUUUGA UA	1315	269-289	UAUCAACUC CACGUUGAAA GCA	1639	267-289
AD-1784302.1	UAGCUAAGCA CAGAUCUACC A	1316	909-929	UGGUAGAUC UGUGCUUAG CUAAA	1640	907-929
AD-1784303.1	UUGUGAUACA GAGUAUAUU UA	1317	1469-1489	UAAAUAUACU CUGUAUCACA ACU	1641	1467-1489
AD-1784304.1	ACUCAUACAG CCAAGUAUGA A	1318	178-198	UUCAUACUUG GCUGUAUGA GUGU	1642	176-198
AD-1784305.1	AGUUAAGGCA AAUCAGGUAA A	1319	1249-1269	UUUACCTGAU UUGCCUUAAC UAG	1643	1247-1269
AD-	GUUGUGAUA	1320	1468-1488	UAAUAUACUC	1644	1466-1488

1784306.1	CAGAGUAUUA UA			UGUAUCACAA CUC		
AD- 1784307.1	GUUGUGAUA CAGAGUAUUA UA	1320	1468-1488	UAAUAUACUC UGUAUCACAA CUC	1644	1466-1488
AD- 1784308.1	UGACAUCGAC ACUCAUACAG A	1321	168-188	UCUGUAUGA GUGUCGAUG UCAAC	1645	166-188
AD- 1784309.1	AGAUAAAUUG AGCUAGUUA A	1322	1235-1255	UUUAAC TAGC UCAAUUAUC UUG	1646	1233-1255
AD- 1784310.1	UAGGUAUUU UUUUGAAGG UUA	1323	503-523	UAACCUCAA AAAAUACCU AGA	1647	501-523
AD- 1784311.1	UAGGUAUUU UUUUGAAGG UUA	1324	503-523	UAACCUCAA AAAAUACCU AGA	1648	501-523
AD- 1784312.1	UGGUGCUUU GUUUAUGGU AGA	1325	1057-1077	UCUACCAUAA ACAAAGCACC AAC	1649	1055-1077
AD- 1784313.1	UGUGAUACAG AGUAUAUUUC A	1326	1470-1490	UGAAAUUAC UCUGUAUCAC AAC	1650	1468-1490
AD- 1784314.1	UCUUCUGGAA UGUGUGACCU A	1327	678-698	UAGGTCACAC AUUCCAGAAG AGG	1651	676-698
AD- 1784315.1	CUGGCCGUUC UAGGUAUUU UA	1328	493-513	UAAAUAACCU AGAACGGCCA GUC	1652	491-513
AD- 1784316.1	AUCAGGUAAA AUAGUCAUGA A	1329	1260-1280	UUCATGACUA UUUUACCUGA UUU	1653	1258-1280

AD-1784317.1	UUCCAUUAAA ACAAAGGGCA A	1330	567-587	UUGCCCTUUG UUUUA AUGG AAUC	1654	565-587
AD-1784318.1	CAAGAGUGCU GACUUCACUA A	1331	585-605	UUAGTGAAGU CAGCACUCUU GCC	1655	583-605
AD-1784319.1	UUUCAACGUG GAGUUUGAU GA	1332	270-290	UCAUCAAAACU CCACGUUGAA AGC	1656	268-290
AD-1784320.1	UUGGUGCUU UGUUUAUGG UAA	1333	1056-1076	UUACCAUAAA CAAAGCACCA ACC	1657	1054-1076
AD-1784321.1	UUGGUGCUU UGUUUAUGG UAA	1333	1056-1076	UUACCATAAA CAAAGCACCA ACC	1658	1054-1076
AD-1784322.1	CACUCAUACA GCCAAGUAUG A	1334	177-197	UCAUACUUGG CUGUAUGAG UGUC	1659	175-197
AD-1784323.1	AUAAAGUACC UUGACUUUG UA	1335	1117-1137	UACAAAGUCA AGGUACUUU AUUC	1660	1115-1137
AD-1784324.1	AUGACUUUU GAAUUACAGA GA	1336	1407-1427	UCUCTGTAAU UCAAAAGUCA UUA	1661	1405-1427
AD-1784325.1	GUCAUGAUUC UAUGUAAUG UA	1337	1273-1293	UACAUUACAU AGAAUCAUGA CUA	1662	1271-1293
AD-1784326.1	GACCUGGAUU GUGCUC AAGG A	1338	693-713	UCCUTGAGCA CAAUCCAGGU CAC	1663	691-713
AD-1784327.1	GACAUCGACA CUCAUACAGC	1339	169-189	UGCUGUAUG AGUGUCGAU	1664	167-189

	A			GUCAA		
AD-1784328.1	GAAGAACAGG CAAUCAAG A	1340	825-845	UCUUTGAUU UGCCUGUUCU UCAG	1665	823-845
AD-1784329.1	CGUAAACUUA ACUUCAAUGG A	1341	751-771	UCCAUUGAAG UUAAGUUUA CGGA		749-771
AD-1784330.1	AGGUAAAUA GUCAUGAUUC A	1342	1263-1283	UGAATCAUGA CUAUUUUACC UGA	1666	1261-1283
AD-1784331.1	GUACCUUGAC UUUGUUCACA A	1343	1122-1142	UUGUGAACAA AGUCAAGGUA CUU	1667	1120-1142
AD-1784332.1	CCGUUCUAGG UAUUUUUUU GA	1344	497-517	UCAAAAAAU ACCUAGAACG GCC	1668	495-517
AD-1784333.1	UUUAUGGUA GUAGUUUUU CUA	1345	1067-1087	UAGAAAAACU ACUACCAUAA ACA	1669	1065-1087
AD-1784334.1	CGUGGAGUU UGAUGACUCU CA	1346	276-296	UGAGAGTCAU CAAACUCCAC GUU	1670	274-296
AD-1784335.1	UUCAACGUGG AGUUUGAUG AA	1347	271-291	UUCATCAAAC UCCACGUUGA AAG	1671	269-291
AD-1784336.1	GAGUUGUGA UACAGAGUAU AA	1348	1466-1486	UUUAUACTCUG UAUCACAACU CUA	1672	1464-1486
AD-1784337.1	UACCUUGACU UUGUUCACAG A	1349	1123-1143	UCUGUGAACA AAGUCAAGGU ACU	1673	1121-1143
AD-	UACCUUGACU	1349	1123-1143	UCUGTGAACA	1674	1121-1143

1784338.1	UUGUUCACAG A			AAGUCAAGGU ACU		
AD- 1784339.1	UAGAGUUGU GAUACAGAGU AA	1350	1464-1484	UUACTCTGUA UCACAACUCU AAU	1675	1462-1484
AD- 1784340.1	UGAGUGCAAA UCCAUAGCAC A	1351	1214-1234	UGUGCUAUG GAUUUGCACU CAAC	1676	1212-1234
AD- 1784341.1	CAAUCAGGU AAAAUAGUCA A	1352	1257-1277	UUGACUAUU UUACCUGAUU UGCC	1677	1255-1277
AD- 1784342.1	AAGCACAGAU CUACCUUGGU A	1353	914-934	UACCAAGGUA GAUCUGUGC UUAG	1678	912-934
AD- 1784343.1	ACUUUGUUCA CAGCAUGUAG A	1354	1130-1150	UCUACAUGCU GUGAACAAAG UCA	1679	1128-1150
AD- 1784344.1	UGGCCGUUCU AGGUUUUU UA	1355	494-514	UAAAAUACC UAGAACGGCC AGU	1680	492-514
AD- 1784345.1	GCCAAGUAUG ACCCUCCCU A	1356	187-207	UAGGGAAGG GUCAUACUUG GCUG	1681	185-207
AD- 1784346.1	UAUGGUAGU AGUUUUUCU GUA	1357	1069-1089	UACAGAAAA CUACUACCAU AAA	1682	1067-1089
AD- 1784347.1	AAUUGAGCUA GUUAAGGCAA A	1358	1240-1260	UUUGCCTUAA CUAGCUCAAU UUA	1683	1238-1260
AD- 1784348.1	ACUAAAAUGC UGCUIUUAAA A	1359	1174-1194	UUUUIAAAAGC AGCAUUUUA GUCA	1684	1172-1194

AD- 1784349.1	ACUUCACUUG GUUCACUGGA A	1360	426-446	UUCCAGTGAA CCAAGUGAAG UUC	1685	424-446
AD- 1784350.1	UCUAGGUAU UUUUUUGAA GGA	1361	501-521	UCCUUCAAAA AAAUACCUAG AAC	1686	499-521
AD- 1784351.1	AGCACAGAUC UACCUUGGUG A	1362	915-935	UCACCAAGGU AGAUCUGUGC UUA	1687	913-935
AD- 1784352.1	GCCGUUCUAG GUAUUUUUU UA	1363	496-516	UAAAAAAAAUA CCUAGAACGG CCA	1688	494-516
AD- 1784353.1	CUAAAAUGCU GCUUUUAAAA A	1364	1175-1195	UUUUUAAAA GCAGCAUUUU AGUC	1689	1173-1195
AD- 1784354.1	GAACAGGCAA AUCAAAGCUU A	1365	828-848	UAAGCUTUGA UUUGCCUGU UCUU	1690	826-848
AD- 1784355.1	UGC UUUGUU UAUGGUAGU AGA	1366	1060-1080	UCUACUACCA UAAACAAAGC ACC	1691	1058-1080
AD- 1784356.1	AAUUAGAGU UGUGAUACAG AA	1367	1461-1481	UUCUGUAUCA CAACUCUAAU UAU	1692	1459-1481
AD- 1784357.1	CUGGUUGGU GCUUUGUUU AUA	1368	1052-1072	UAUAAACAAA GCACCAACCA GCC	1693	1050-1072
AD- 1784358.1	UCCUUCAAAU AAGAUGGUCC A	1369	847-867	UGGACCAUCU UAUUUGAAG GAAG	1694	845-867
AD- 1784359.1	GCCUCCUCC UGAAUCCUUG	1370	620-640	UCAAGGAUUC AGGAAGGAG	1695	618-640

	A			GCCA		
AD-1784360.1	GAUUCUAUG UAAUGUAAAC CA	1371	1278-1298	UGGUTUACAU UACAUAGAAU CAU	1696	1276-1298
AD-1784361.1	UGGUUGGUG CUUUGUUUA UGA	1372	1053-1073	UCAUAAACAA AGCACCAACC AGC	1697	1051-1073
AD-1784362.1	CUCAUACAGC CAAGUAUGAC A	1373	179-199	UGUCAUACUU GGCUGUAUG AGUG	1698	177-199
AD-1784363.1	CUCAUACAGC CAAGUAUGAC A	1373	179-199	UGUCAUACUU GGCUGUAUG AGUG	1698	177-199
AD-1784364.1	AUCGACACUC AUACAGCCAA A	1374	172-192	UUUGGCTGUA UGAGUGUCG AUGU	1699	170-192
AD-1784365.1	GCACUGGCAU AAGGACUUC A	1375	117-137	UGGAAGTCCU UAUGCCAGUG CUC	1700	115-137
AD-1784366.1	AACGUGGAGU UUGAUGACUC A	1376	274-294	UGAGTCAUCA AACUCCACGU UGA	1701	272-294
AD-1784367.1	GCAAAUCAGG UAAAAUAGUC A	1377	1256-1276	UGACUAUUU UACCUGAUUU GCCU	1702	1254-1276
AD-1784368.1	GCAAAUCAGG UAAAAUAGUC A	1377	1256-1276	UGACTATUUU ACCUGAUUUG CCU	1703	1254-1276
AD-1784369.1	CUUCAGAAAG UUGUUGAUG UA	1378	541-561	UACAUCAACA ACUUUCUGAA GGC	1704	539-561
AD-	CUUCAGAAAG	1378	541-561	UACATCAACA	1705	539-561

1784370.1	UUGUUGAUG UA			ACUUUCUGAA GGC		
AD- 1784371.1	AAAUCAGGUA AAAUAGUCAU A	1379	1258-1278	UAUGACTAUU UUACCUGAUU UGC	1706	1256-1278
AD- 1784372.1	AGGCAAUA GGUAAAAUAG A	1380	1254-1274	UCUAUUUUAC CUGAUUUGCC UUA	1707	1252-1274
AD- 1784373.1	GGGCAAGAGU GCUGACUUCA A	1381	582-602	UUGAAGTCAG CACUCUUGCC CUU	1708	580-602
AD- 1784375.1	GGCCGUUCUA GGUAUUUUU UA	1382	495-515	UAAAAAUAC CUAGAACGGC CAG	1709	493-515
AD- 1784377.1	CGGGCCUUCA GAAAGUUGU UA	1383	536-556	UAACAACUUU CUGAAGGCC GGU	1710	534-556
AD- 1784378.1	GGCAAUCAG GUAAAAUAGU A	1384	1255-1275	UACUAUUUU ACCUGAUUUG CCUU	1711	1253-1275
AD- 1784379.1	GAGGAUCCUC AACAAUGGUC A	1385	246-266	UGACCAUUGU UGAGGAUCCU CAG	1712	244-266
AD- 1784380.1	GAGGAUCCUC AACAAUGGUC A	1385	246-266	UGACCATUGU UGAGGAUCCU CAG	1713	244-266
AD- 1784381.1	UUCACUUGGU UCACUGGAAC A	1386	428-448	UGUUCAGU GAACCAAGUG AAGU	1714	426-448
AD- 1784382.1	AGAACUGAUG GUGGACAACU A	1387	786-806	UAGUTGTCCA CCAUCAGUUC UUC	1715	784-806

AD- 1784383.1	AAUAAAGUAC CUUGACUUUG A	1388	1116-1136	UCAAGUCA GGUACUUUA UUCU	1716	1114-1136
AD- 1784384.1	AAUAAAGUAC CUUGACUUUG A	1388	1116-1136	UCAAGTCAA GGUACUUUA UUCU	1717	1114-1136
AD- 1784385.1	CUUUGUUCAC AGCAUGUAGG A	1389	1131-1151	UCCUACAUGC UGUGAACAAA GUC	1718	1129-1151
AD- 1784386.1	CUUUGUUCAC AGCAUGUAGG A	1389	1131-1151	UCCUACAUGC UGUGAACAAA GUC	1718	1129-1151
AD- 1784387.1	AAUAAGAAUA AAGUACCUUG A	1390	1110-1130	UCAAGGTACU UUAUUCUUA UUUC	1719	1108-1130
AD- 1784388.1	AGUAGUUUU UCUGUAACAC AA	1391	1075-1095	UUGUGUTACA GAAAACUAC UAC	1720	1073-1095
AD- 1784389.1	CCAAGUAUGA CCCUUCCUG A	1392	188-208	UCAGGGAAGG GUCAUACUUG GCU	1721	186-208
AD- 1784390.1	UUGAGUGCAA AUCCAUGCA A	1393	1213-1233	UUGCTATGGA UUUGCACUCA ACC	1722	1211-1233
AD- 1784391.1	GGCCUUCAGA AAGUUGUUG AA	1394	538-558	UUCAACAACU UUCUGAAGGC CCG	1723	536-558
AD- 1784392.1	AGGAUCCUCA ACAAUGGUCA A	1395	247-267	UUGACCAUUG UUGAGGAUCC UCA	1724	245-267
AD- 1784393.1	AUUAGAGUU GUGAUACAGA	1396	1462-1482	UCUCTGTAUC ACAACUCUAA	1725	1460-1482

	GA			UUA		
AD-1784394.1	CAACGUGGAG UUUGAUGAC UA	1397	273-293	UAGUCATCAA ACUCCACGUU GAA	1726	271-293
AD-1784395.1	GACUUUUGAA UUACAGAGAU A	1398	1409-1429	UAUCTCTGUA AUUCAAAAGU CAU	1727	1407-1429
AD-1784396.1	UGAGGAUCCU CAACAAUGGU A	1399	245-265	UACCAUUGUU GAGGAUCCUC AGG	1728	243-265
AD-1784397.1	GAGUUUGAU GACUCUCAGG AA	1400	280-300	UUCCTGAGAG UCAUCAAAACU CCA	1729	278-300
AD-1784398.1	UUUUAAAACA UAGGAAAGUA A	1401	1187-1207	UUACTUTCCU AUGUUUUUAA AAGC	1730	1185-1207
AD-1784399.1	UUAUGGUAG UAGUUUUUC UGA	1402	1068-1088	UCAGAAAAAC UACUACCAUA AAC	1731	1066-1088
AD-1784400.1	AACUUCACUU GGUUCACUGG A	1403	425-445	UCCAGUGAAC CAAGUGAAGU UCU	1732	423-445
AD-1784401.1	AAAUUGAGCU AGUUAAGGCA A	1404	1239-1259	UUGCCUTAAC UAGCUCAAUU UAU	1733	1237-1259
AD-1784402.1	UUUGUUUUAU GGUAGUAGU UUA	1405	1063-1083	UAAACUACUA CCAUAAACAA AGC	1734	1061-1083
AD-1784403.1	UUUGUUUUAU GGUAGUAGU UUA	1405	1063-1083	UAAACUACUA CCAUAAACAA AGC	1734	1061-1083
AD-	AAGGGCAAGA	1406	580-600	UAAGTCAGCA	1735	578-600

1784404.1	GUGCUGACUU A			CUCUUGCCCU UUG		
AD- 1784405.1	GGAGUUUGA UGACUCUCAG GA	1407	279-299	UCCUGAGAGU CAUCAAACUC CAC	1736	277-299
AD- 1784406.1	GGGCCUUCAG AAAGUUGUU GA	1408	537-557	UCAACAACUU UCUGAAGGCC CGG	1737	535-557
AD- 1784407.1	GCAAGAGUGC UGACUUCACU A	1409	584-604	UAGUGAAGU CAGCACUCUU GCCC	1738	582-604
AD- 1784408.1	AGCCACUGAA GAACAGGCAA A	1410	818-838	UUUGCCTGUU CUUCAGUGGC UGA	1739	816-838
AD- 1784409.1	AUUCCAUUAA AACAAAGGGC A	1411	566-586	UGCCCUUUGU UUUAAUGGA AUCC	1740	564-586
AD- 1784410.1	AUUCCAUUAA AACAAAGGGC A	1411	566-586	UGCCCUUUGU UUUAAUGGA AUCC	1741	564-586
AD- 1784411.1	GUAGUUUUU CUGUAACACA GA	1412	1076-1096	UCUGTGTUAC AGAAAAACUA CUA	1742	1074-1096
AD- 1784412.1	GGUAUUUUU UUGAAGGUU GGA	1413	505-525	UCCAACCUUC AAAAAAAUAC CUA	1743	503-525
AD- 1784413.1	UCCAAAUAU GAAUCUUCGG A	1414	878-898	UCCGAAGAUU CAUUAUUUG GAUA	1744	876-898
AD- 1784414.1	AAACAUAGGA AAGUAGAAUG A	1415	1192-1212	UCAUTCTACU UUCCUAUGU UUUA	1745	1190-1212

AD- 1784415.1	AUGACUCUCA GGACAAAGCA A	1416	287-307	UUGCTUTGUC CUGAGAGUCA UCA	1746	285-307
AD- 1784416.1	AGCUAGUUAA GGCAAUCAG A	1417	1245-1265	UCUGAUUUG CCUUAACUAG CUCA	1747	1243-1265
AD- 1784417.1	CCUGAGGAUC CUCAACAAUG A	1418	243-263	UCAUTGTUGA GGAUCCUCAG GGA	1748	241-263
AD- 1784418.1	GGUUGGUGC UUUGUUUUAU GGA	1419	1054-1074	UCCAUAACA AAGCACCAAC CAG	1749	1052-1074
AD- 1784419.1	AGGUUUUUU UUUGAAGGU UGA	1420	504-524	UCAACCUUCA AAAAAUACC UAG	1750	502-524
AD- 1784420.1	UGAAUCUUCG GGUGUUUCCC A	1421	887-907	UGGGAAACAC CCGAAGAUUC AUU	1751	885-907
AD- 1784421.1	UGAAUCUUCG GGUGUUUCCC A	1421	887-907	UGGGAAACAC CCGAAGAUUC AUU	1751	885-907
AD- 1784422.1	UAGUAGUUU UUCUGUAACA CA	1422	1074-1094	UGUGUUACA GAAAACUAC UACC	1752	1072-1094
AD- 1784423.1	UAGUAGUUU UUCUGUAACA CA	1422	1074-1094	UGUGTUACAG AAAAACUACU ACC	1753	1072-1094
AD- 1784424.1	GUUUGAUGA CUCUCAGGAC AA	1423	282-302	UUGUCCTGAG AGUCAUCAA CUC	1754	280-302
AD- 1784425.1	AAUGAAUCUU CGGGUGUUU	1424	885-905	UGAAACACCC GAAGAUUCAU	1755	883-905

	CA			UAU		
AD-1784426.1	CAAUAAUGA AUCUUCGGGU A	1425	880-900	UACCCGAAGA UUCAUUUUU UGGA	1756	878-900
AD-1784427.1	UUUGUUCACA GCAUGUAGGG A	1426	1132-1152	UCCCUACAUG CUGUGAACAA AGU	1757	1130-1152
AD-1784428.1	AUUGUGCUC AGGAACCCAU A	1427	700-720	UAUGGGTUCC UUGAGCACAA UCC	1758	698-720
AD-1784429.1	GUUGGUGCU UUGUUUAUG GUA	1428	1055-1075	UACCAUAAAC AAAGCACCAA CCA	1759	1053-1075
AD-1784430.1	GAAUCUUCGG GUGUUUCCCU A	1429	888-908	UAGGGAAACA CCCGAAGAUU CAU	1760	886-908
AD-1784431.1	GGUAGUAGU UUUUCUGUA ACA	1430	1072-1092	UGUUACAGAA AAACUACUAC CAU	1761	1070-1092
AD-1784432.1	AGAACAGGCA AAUCAAGGCU A	1431	827-847	UAGCUUUGA UUUGCCUGU UCUUC	1762	825-847
AD-1784433.1	AGAACAGGCA AAUCAAGGCU A	1431	827-847	UAGCTUTGAU UUGCCUGUUC UUC	1763	825-847
AD-1784434.1	AAAUAGUCA UGAUUCUAU GA	1432	1267-1287	UCAUAGAAUC AUGACUAUU UUAC	1764	1265-1287
AD-1784435.1	ACUGGCCGUU CUAGGUUUU UA	1433	492-512	UAAAUACCUA GAACGGCCAG UCC	1765	490-512
AD-	CCCUGAGGAU	1434	242-262	UAUUGUTGA	1766	240-262

1784436.1	CCUCAACAAU A			GGAUCCUCAG GGAA		
AD- 1784437.1	GCUGGUUGG UGC UUUGUU UAA	1435	1051-1071	UUAACAAG CACCAACCAG CCA	1767	1049-1071
AD- 1784438.1	CAGAAAGUUG UUGAUGUGC UA	1436	544-564	UAGCACAUCA ACAACUUUCU GAA	1768	542-564
AD- 1784439.1	ACUAACUUCG AUCCUCGUGG A	1437	601-621	UCCACGAGGA UCGAAGUUA GUGA	1769	599-621
AD- 1784440.1	CCUUCAGAAA GUUGUUGAU GA	1438	540-560	UCAUCAACAA CUUUCUGAAG GCC	1770	538-560
AD- 1784441.1	UGAGCACUGG CAUAAGGACU A	1439	114-134	UAGUCCTUAU GCCAGUGCUC AGG	1771	112-134
AD- 1784442.1	CUAGUUAAGG CAAUCAGGU A	1440	1247-1267	UACCTGAUUU GCCUUAACUA GCU	1772	1245-1267
AD- 1784443.1	CUGAGGAUCC UCAACAAUGG A	1441	244-264	UCCAUUGUU GAGGAUCCUC AGGG	1773	242-264
AD- 1784444.1	GUUUAUGGU AGUAGUUUU UCA	1442	1066-1086	UGAAAAACUA CUACCAUAAA CAA	1774	1064-1086
AD- 1784445.1	UGUGACCUGG AUUGUGCUC A	1443	690-710	UUGAGCACAA UCCAGGUCAC ACA	1775	688-710
AD- 1784446.1	ACAUCGACAC UCAUACAGCC A	1444	170-190	UGGCTGTAUG AGUGUCGAU GUCA	1776	168-190

AD- 1784447.1	GAUUGUGCUC AAGGAACCCA A	1445	699-719	UUGGGUTCCU UGAGCACAAU CCA	1777	697-719
AD- 1784448.1	UCAUACAGCC AAGUAUGACC A	1446	180-200	UGGUCATACU UGGCUGUAU GAGU	1778	178-200
AD- 1784449.1	UAAAAUAGUC AUGAUUCUAU A	1447	1266-1286	UAUAGAAUCA UGACUAUUU UACC	1779	1264-1286
AD- 1784450.1	UAAAAUAGUC AUGAUUCUAU A	1447	1266-1286	UAUAGAAUCA UGACUAUUU UACC	1779	1264-1286
AD- 1784451.1	GUGCUC AAGG AACCCAUCAG A	1448	703-723	UCUGAUGGG UUCCUUGAGC ACAA	1780	701-723
AD- 1784452.1	CGAAGAACUG AUGGUGGACA A	1449	783-803	UUGUCCACCA UCAGUUCUUC GGG	1781	781-803
AD- 1784453.1	AAUAAAAUGU GAAGACUAGA A	1450	1001-1021	UUCUAGTCUU CACAUUUUAU UAG	1782	999-1021
AD- 1784454.1	GGCUGGUUG GUGCUUUGU UUA	1451	1050-1070	UAAACAAAGC ACCAACCAGC CAC	1783	1048-1070
AD- 1784455.1	UUGUUCACAG CAUGUAGGG UA	1452	1133-1153	UACCCUACAU GCUGUGAACA AAG	1784	1131-1153
AD- 1784456.1	UUCAAAUAAG AUGGUCCAU A	1453	850-870	UAUGGGACCA UCUUAUUUG AAGG	1785	848-870
AD- 1784457.1	UUUAAAACAU AGGAAAGUAG	1454	1188-1208	UCUACUUUCC UAUGUUUUA	1786	1186-1208

	A			AAAG		
AD-1784458.1	UUGUUUAUG GUAGUAGUU UUA	1455	1064-1084	UAAAACUACU ACCAUAAACA AAG	1787	1062-1084
AD-1784459.1	UUGUUUAUG GUAGUAGUU UUA	1455	1064-1084	UAAAACUACU ACCAUAAACA AAG	1788	1062-1084
AD-1784460.1	GCUAGUUAAG GCAAUCAGG A	1456	1246-1266	UCCUGAUUU GCCUUAACUA GCUC	1789	1244-1266
AD-1784461.1	GUAAAAUAGU CAUGAUUCUA A	1457	1265-1285	UUAGAAUCAU GACUAUUUU ACCU	1790	1263-1285
AD-1784462.1	GUAAAAUAGU CAUGAUUCUA A	1457	1265-1285	UUAGAATCAU GACUAUUUU ACCU	1791	1263-1285
AD-1784463.1	GACUGGCCGU UCUAGGUAU UA	1458	491-511	UAAUACCUAG AACGGCCAGU CCA	1792	489-511
AD-1784464.1	UCAGCCACUG AAGAACAGGC A	1459	816-836	UGCCTGTUCU UCAGUGGCU GAGC	1793	814-836
AD-1784465.1	UGGAAUGUG UGACCUGGAU UA	1460	683-703	UAAUCCAGGU CACACAUUCC AGA	1794	681-703
AD-1784466.1	UCACAGCAUG UAGGGUGAU GA	1461	1137-1157	UCAUCACCCU ACAUGCUGUG AAC	1795	1135-1157
AD-1784467.1	UACAGCCAAG UAUGACCCUU A	1462	183-203	UAAGGGTCAU ACUUGGCUG UAUG	1796	181-203
AD-	CUGAGCACUG	1463	113-133	UGUCCUUAU	1797	111-133

1784468.1	GCAUAAGGAC A			GCCAGUGCUC AGGU		
AD- 1784469.1	CUGAGCACUG GCAUAAGGAC A	1463	113-133	UGUCCUTAUG CCAGUGCUCA GGU	1798	111-133
AD- 1784470.1	GCUCAAGGAA CCCAUCAGCG A	1464	705-725	UCGCTGAUGG GUUCCUUGA GCAC	1799	703-725
AD- 1784471.1	UUCUGGAAU GUGUGACCUG GA	1465	680-700	UCCAGGTCAC ACAUUCCAGA AGA	1800	678-700
AD- 1784472.1	UAAAUUGAGC UAGUUAAGGC A	1466	1238-1258	UGCCUUAACU AGCUCAAUUU AUC	1801	1236-1258
AD- 1784473.1	UAUUUUUUU GAAGGUUGGC AA	1467	507-527	UUGCCAACCU UCAAAAAAAU ACC	1802	505-527
AD- 1784474.1	UAAUUAGAG UUGUGAUACA GA	1468	1460-1480	UCUGUAUCAC AACUCUAAUU AUA	1803	1458-1480
AD- 1784475.1	UAAUUAGAG UUGUGAUACA GA	1468	1460-1480	UCUGTATCAC AACUCUAAUU AUA	1804	1458-1480
AD- 1784476.1	UGACUCUCAG GACAAAGCAG A	1469	288-308	UCUGCUUUG UCCUGAGAGU CAUC	1805	286-308
AD- 1784477.1	UGACUCUCAG GACAAAGCAG A	1469	288-308	UCUGCUTUGU CCUGAGAGUC AUC	1806	286-308
AD- 1784478.1	CAUACAGCCA AGUAUGACCC A	1470	181-201	UGGGTCAUAC UUGGCUGUA UGAG	1807	179-201

AD- 1784479.1	GUAUUUUUU UGAAGGUUG GCA	1471	506-526	UGCCAACCUU CAAAAAAUA CCU	1808	504-526
AD- 1784480.1	CACAGCAUGU AGGGUGAUG AA	1472	1138-1158	UUCATCACCC UACAUGCUGU GAA	1809	1136-1158
AD- 1784481.1	UAUAAUUAGA GUUGUGAUA CA	1473	1458-1478	UGUATCACAA CUCUAAUUAU AAC	1810	1456-1478
AD- 1784482.1	GAUUUUGGG AAAGCUGUGC AA	1474	460-480	UUGCACAGCU UUCCCAAAAU CCC	1811	458-480
AD- 1784483.1	UAAAACAAAG GGCAAGAGUG A	1475	573-593	UACTCTUGC CCUUUGUUU UAAU	1812	571-593
AD- 1784484.1	UCAAGGAACC CAUCAGCGUC A	1476	707-727	UGACGCUGAU GGGUUCCUU GAGC	1813	705-727
AD- 1784485.1	UCAAGGAACC CAUCAGCGUC A	1476	707-727	UGACGCTGAU GGGUUCCUU GAGC	1814	705-727
AD- 1784486.1	UCAGAAAGUU GUUGAUGUG CA	1477	543-563	UGCACAUCAA CAACUUUCUG AAG	1815	541-563
AD- 1784487.1	UCAGAAAGUU GUUGAUGUG CA	1477	543-563	UGCACATCAA CAACUUUCUG AAG	1816	541-563
AD- 1784488.1	CCAAUAAUG AAUCUUCGGG A	1478	879-899	UCCCGAAGAU UCAUUUUUU GGAU	1817	877-899
AD- 1784489.1	AGCAUGUAGG GUGAUGAGCA	1479	1141-1161	UUGCTCAUCA CCCUACAUGC	1818	1139-1161

	A			UGU		
AD-1784490.1	GAUAAAUUGA GCUAGUUAAG A	1480	1236-1256	UCUUAACUAG CUCAAUUUAU CUU	1819	1234-1256
AD-1784491.1	CUCAGCCACU GAAGAACAGG A	1481	815-835	UCCUGUUCU UCAGUGGCU GAGCU	1820	813-835
AD-1784492.1	CUCAGCCACU GAAGAACAGG A	1481	815-835	UCCUGUTCUU CAGUGGCUGA GCU	1821	813-835
AD-1784493.1	CAGCAUGUAG GGUGAUGAGC A	1482	1140-1160	UGCUCATCAC CCUACAUGCU GUG	1822	1138-1160
AD-1784494.1	AUAAUGAAUC UUCGGGUGU UA	1483	883-903	UAACACCCGA AGAUUCAUUA UUU	1823	881-903
AD-1784495.1	GGAACCCAUC AGCGUCAGCA A	1484	711-731	UUGCTGACGC UGAUGGGUU CCUU	1824	709-731
AD-1784496.1	UGUUCACAGC AUGUAGGGU GA	1485	1134-1154	UCACCCUACA UGCUGUGAAC AAA	1825	1132-1154
AD-1784497.1	AAACAAAGGG CAAGAGUGCU A	1486	575-595	UAGCACTCUU GCCUUUGUU UUA	1826	573-595
AD-1784498.1	UGUGUGACCU GGAUUGUGC UA	1487	688-708	UAGCACAAUC CAGGUCACAC AUU	1827	686-708
AD-1784499.1	UGUGUGACCU GGAUUGUGC UA	1487	688-708	UAGCACAAUC CAGGUCACAC AUU	1827	686-708
AD-	AAUAAUGAAU	1488	882-902	UACACCCGAA	1828	880-902

1784500.1	CUUCGGGUG UA			GAUUCAUUA UUUG		
AD- 1784501.1	AUUUUUUUG AAGGUUGGCA GA	1489	508-528	UCUGCCAACC UUCAAAAAAA UAC	1829	506-528
AD- 1784502.1	AUUUUUUUG AAGGUUGGCA GA	1489	508-528	UCUGCCAACC UUCAAAAAAA UAC	1829	506-528
AD- 1784503.1	UGCUCAAGGA ACCCAUCAGC A	1490	704-724	UGCUGATGGG UUCUUGAGC ACA	1830	702-724
AD- 1784504.1	UAAUGAAUCU UCGGGUGUU UA	1491	884-904	UAAACACCCG AAGAUUCAUU AUU	1831	882-904
AD- 1784505.1	GUGGCUGGU UGGUGCUUU GUA	1492	1048-1068	UACAAAGCAC CAACCAGCCA CAG	1832	1046-1068
AD- 1784506.1	AAGGAACCCA UCAGCGUCAG A	1493	709-729	UCUGACGCUG AUGGGUUC UUGA	1833	707-729
AD- 1784507.1	UUAAAACAAA GGGCAAGAGU A	1494	572-592	UACUCUTGCC CUUUGUUUU AAUG	1834	570-592
AD- 1784508.1	CUGUGGCUG GUUGGUGCU UUA	1495	1046-1066	UAAAGCACCA ACCAGCCACA GCA	1835	1044-1066
AD- 1784509.1	CAGCUCAGCC ACUGAAGAAC A	1496	812-832	UGUUCUTCAG UGGCUGAGC UGGG	1836	810-832
AD- 1784510.1	AAAUAAUGAA UCUUCGGGU GA	1497	881-901	UCACCCGAAG AUUCAUUAU UUGG	1837	879-901

AD-1784511.1	GAAUGUGUG ACCUGGAUUG UA	1498	685-705	UACAAUCCAG GUCACACAUU CCA	1838	683-705
AD-1784512.1	CAUGUAGGG UGAUGAGCAC UA	1499	1143-1163	UAGUGCTCAU CACCCUACAU GCU	1839	1141-1163
AD-1784513.1	GGACUGGCCG UUCUAGGUA UA	1500	490-510	UAUACCTAGA ACGGCCAGUC CAU	1840	488-510
AD-1784514.1	AUAAAUUGAG CUAGUUAAGG A	1501	1237-1257	UCCUUAACUA GCUCAAUUUA UCU	1841	1235-1257
AD-1784515.1	GAAAGUUGU UGAUGUGCU GGA	1502	546-566	UCCAGCACAU CAACAACUUU CUG	1842	544-566
AD-1784516.1	GAAAGUUGU UGAUGUGCU GGA	1502	546-566	UCCAGCACAU CAACAACUUU CUG	1842	544-566
AD-1784517.1	AACAAAGGGC AAGAGUGCUG A	1503	576-596	UCAGCACUCU UGCCCUUUGU UUU	1843	574-596
AD-1784518.1	CCUGAGCACU GGCAUAAGGA A	1504	112-132	UUCCTUAUGC CAGUGCUCAG GUC	1844	110-132
AD-1784519.1	UGAUGGUGG ACAACUGGCG CA	1505	791-811	UGCGCCAGUU GUCCACCAUC AGU	1845	789-811
AD-1784520.1	ACAAAGGGCA AGAGUGCUGA A	1506	577-597	UUCAGCACUC UUGCCCUUUG UUU	1846	575-597
AD-1784521.1	ACGGACCUGA GCACUGGCAU	1507	107-127	UAUGCCAGUG CUCAGGUCCG	1847	105-127

	A			UUG		
AD-1784522.1	UGGGAAAGCU GUGCAGCAAC A	1508	465-485	UGUUGCTGCA CAGCUUUCCC AAA	1848	463-485
AD-1784523.1	AACCCAUCAG CGUCAGCAGC A	1509	713-733	UGCUGCTGAC GCUGAUGGG UUCC	1849	711-733
AD-1784524.1	AGCUCAGCCA CUGAAGAACA A	1510	813-833	UUGUTCTUCA GUGGCUGAG CUGG	1850	811-833
AD-1784525.1	UUUUGAAGG UUGGCAGCGC UA	1511	512-532	UAGCGCTGCC AACCUUCAA AAA	1851	510-532
AD-1784526.1	GUAUGACCCU UCCCUGAAGC A	1512	192-212	UGCUTCAGGG AAGGGUCAUA CUU	1852	190-212
AD-1784527.1	CUACCCAGGC UCACUGACCA A	1513	651-671	UUGGTCAGUG AGCCUGGGUA GGU	1853	649-671
AD-1784528.1	ACCCAGGCUC ACUGACCACC A	1514	653-673	UGGUGGTCAG UGAGCCUGG GUAG	1854	651-673
AD-1784529.1	AUGGACUGGC CGUUCUAGGU A	1515	488-508	UACCUAGAAC GGCCAGUCCA UCA	1855	486-508
AD-1784530.1	ACCUGAGCAC UGGCAUAAGG A	1516	111-131	UCCUUAUGCC AGUGCUCAGG UCC	1856	109-131
AD-1784531.1	CCAUCAGCGU CAGCAGCGAG A	1517	716-736	UCUCGCUGCU GACGCUGAUG GGU	1857	714-736
AD-	UGGACUGGCC	1518	489-509	UUACCUAGAA	1858	487-509

1784532.1	GUUCUAGGU AA			CGGCCAGUCC AUC		
AD- 1784533.1	UUUUGGGAA AGCUGUGCAG CA	1519	462-482	UGCUGCACAG CUUUCCCAA AUC	1859	460-482
AD- 1784534.1	CUGAUGGACU GGCCGUUCUA A	1520	485-505	UUAGAACGGC CAGUCCAUCA GGU	1860	483-505
AD- 1784535.1	ACCUACCCAG GCUCACUGAC A	1521	649-669	UGUCAGTGAG CCUGGGUAG GUCC	1861	647-669
AD- 1784536.1	GGACCUACCC AGGCUCACUG A	1522	647-667	UCAGTGAGCC UGGGUAGGU CCAG	1862	645-667
AD- 1784537.1	GAUGGACUGG CCGUUCUAGG A	1523	487-507	UCCUAGAACG GCCAGUCCAU CAG	1863	485-507
AD- 1784538.1	AAGGUUGGCA GCGCUAAACC A	1524	517-537	UGGUTUAGCG CUGCCAACCU UCA	1864	515-537
AD- 1784539.1	UGAUGGACU GGCCGUUCUA GA	1525	486-506	UCUAGAACGG CCAGUCCAUC AGG	1865	484-506
AD- 1784540.1	AACUGAUGGU GGACAACUGG A	1526	788-808	UCCAGUUGUC CACCAUCAGU UCU	1866	786-808
AD- 1784541.1	AACUGAUGGU GGACAACUGG A	1526	788-808	UCCAGUTGUC CACCAUCAGU UCU	1867	786-808
AD- 1784542.1	ACAACUGCUG UGGCUGGUU GA	1527	1039-1059	UCAACCAGCC ACAGCAGUUG UGU	1868	1037-1059

AD-1784543.1	ACAACUGCUG UGGCUGGUU GA	1527	1039-1059	UCAACCAGCC ACAGCAGUUG UGU	1868	1037-1059
AD-1784544.1	CAACGGACCU GAGCACUGGC A	1528	105-125	UGCCAGTGCU CAGGUCCGUU GUG	1869	103-125
AD-1784545.1	CAACUGCUGU GGCUGGUUG GA	1529	1040-1060	UCCAACCAGC CACAGCAGUU GUG	1870	1038-1060
AD-1784546.1	ACUGAUGGU GGACAACUGG CA	1530	789-809	UGCCAGTUGU CCACCAUCAG UUC	1871	787-809
AD-1784547.1	CUGCUGUGGC UGGUUGGUG CA	1531	1043-1063	UGCACCAACC AGCCACAGCA GUU	1872	1041-1063

**Таблица 8. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК к СА2**

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишень, от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-1784188.1	usgsuuucCfuAf UfGfaucaagcas asa	1873	VPusUfsugdCu(Tg n)gaucauAfgGfaaa casgsa	2183	UCUGUUUCCUA UGAUCAAGCAA C	2541
AD-1784189.1	usgsacuuCfaCf UfAfacuucgaus csa	1874	VPusGfsaucGfaag uuagUfgAfagucasg sc	2184	GCUGACUUCAC UAACUUCGAUC C	2542
AD-1784190.1	csasaagcUfuCf CfUfucaaaauas gsa	1875	VPusCfsuuaUfuug aaggAfaGfcuuugsa su	2185	AUCAAAAGCUUC CUUCAAAUAAG A	2543
AD-1784191.1	uscsaaagCfuUf CfCfuucaaauas asa	1876	VPusUfsuadTu(Tg n)gaaggaAfgCfuuu gasusu	2186	AAUCAAAAGCUU CCUUCAAAUAA G	2544

AD-1784192.1	gsuscuguAfuCf CfAfaauaaugas asa	1877	VPusUfsucaUfuau uuggAfuAfcagacsu sa	2187	UAGUCUGUAUC CAAUAAUGAA U	2545
AD-1784193.1	gsuscuguAfuCf CfAfaauaaugas asa	1877	VPusUfsucdAu(Tg n)auuuggAfuAfcag acsusa	2188	UAGUCUGUAUC CAAUAAUGAA U	2545
AD-1784194.1	asusuccgUfaAf AfCfuuaacuucs asa	1878	VPusUfsgadAg(Tg n)uaaguuUfaCfpga aususu	2189	AAAUUCCGUAA ACUUAACUUCA A	2546
AD-1784195.1	uscscuauGfaUf CfAfagcaacuus csa	1879	VPusGfsaadGu(Tg n)gcuugaUfcAfuag gasasa	2190	UUUCCUAUGAU CAAGCAACUUC C	2547
AD-1784196.1	gsusuuccUfaUf GfAfucaagcaas csa	1880	VPusGfsuudGc(Tg n)ugaucaUfaGfgaa acsasg	2191	CUGUUUCCUAU GAUCAAGCAAC U	2548
AD-1784197.1	asusgcugCfuUf UfUfaaaacauas gsa	1881	VPusCfsuadTg(Tgn )uuuaaaAfgCfagca ususu	2192	AAAUGCUGCUU UUAAAACAUAG G	2549
AD-1784198.1	csasuucaGfaCf AfAfuauaucaus asa	1882	VPusUfsaudGa(Tg n)auauugUfcUfgaa ugsgsa	2193	UCCAUUCAGAC AAUAUAUCAUA A	2550
AD-1784199.1	gsascuucAfcUf AfAfcuucgaucs csa	1883	VPusGfsgauCfagaag uuaGfuGfaagucsas g	2194	CUGACUUCACU AACUUCGAUCC U	2551
AD-1784200.1	cscsauucAfgAf CfAfaauauucas usa	1884	VPusAfsugaUfaua uuguCfuGfaauggs asa	2195	UUCCAUUCAGA CAAUAUAUCAU A	2552
AD-1784201.1	uscsguaUfcCf AfAfauaugaas usa	1885	VPusAfsuudCa(Tg n)uauuugGfaUfaca gascsu	2196	AGUCUGUAUCC AAUAAUGAAU C	2553
AD-1784202.1	asasucaaAfgCf UfUfccuucaaas	1886	VPusAfsuudTg(Ag n)aggaagCfuUfuga	2197	CAAUCAAGC UUCCUUCAAAU	2554

	usa		uususg		A	
AD-1784203.1	asusucagAfcAf AfUfauaucaua sasa	1887	VPusUfsuadTg(Ag n)uauauuGfuCfug aausgsg	2198	CCAUUCAGACA AUUAUCAUAA C	2555
AD-1784204.1	cscsguaaAfcUf UfAfacuucaaus gsa	1888	VPusCfsauuGfaag uuuaGfuUfuacggs asa	2199	UCCGUAAACU UAACUCAAUG G	2556
AD-1784205.1	cscsguaaAfcUf UfAfacuucaaus gsa	1888	VPusCfsaudTg(Agn )aguuaaGfuUfuacg gsasa	2200	UCCGUAAACU UAACUCAAUG G	2556
AD-1784206.1	gsusgcugAfcUf UfCfacaacuus csa	1890	VPusGfsaadGu(Tg n)agugaaGfuCfagc acsusc	2201	GAGUGCUGACU UCACUAACUUC G	2557
AD-1784207.1	asasgcuuCfcUf UfCfaaauaagas usa	1891	VPusAfsucuUfauu ugaaGfgAfagcuusu sg	2202	CAAAGCUUCCU UCAAAUAAGAU G	2558
AD-1784208.1	asasgcuuCfcUf UfCfaaauaagas usa	1891	VPusAfsucdTu(Ag n)uuugaaGfgAfagc uususg	2203	CAAAGCUUCCU UCAAAUAAGAU G	2558
AD-1784209.1	asasauuCfgUf AfAfacuuaacus usa	1892	VPusAfsaguUfaag uuuaCfgGfaauuus csa	2204	UGAAAUUCCGU AAACUUAACUU C	2559
AD-1784210.1	csusgucuGfuUf UfCfcuaugaucs asa	1893	VPusUfsgadTc(Agn )uaggaaAfcAfgaca gsgsg	2205	CCCUGUCUGUU UCCUAUGAUCA A	2560
AD-1784211.1	gsusauccAfaAf UfAfaugaaucus usa	1894	VPusAfsagaUfucau uauUfuGfgauacsas g	2206	CUGUAUCCAAA UAAUGAAUCUU C	2561
AD-1784212.1	gsusauccAfaAf UfAfaugaaucus usa	1894	VPusAfsagdAu(Tg n)cauuauUfuGfga uacsasg	2207	CUGUAUCCAAA UAAUGAAUCUU C	2561
AD-	csusgacuUfcAf	1895	VPusAfsucgAfaguu	2208	UGCUGACUUCA	2562

1784213.1	CfUfaacuucgas usa		aguGfaAfgucagscs a		CUAACUUCGAU C	
AD- 1784214.1	gscsuuccUfuCf AfAfauaagaugs gsa	1896	VPusCfscauCfuuuu uugAfaGfgaagcsus u	2209	AAGCUUCCUUC AAAUAAGAUGG U	2563
AD- 1784215.1	gscsuuccUfuCf AfAfauaagaugs gsa	1896	VPusCfscadTc(Tgn )uuuugAfaGfgaag csusu	2210	AAGCUUCCUUC AAAUAAGAUGG U	2563
AD- 1784216.1	asasaucaAfaGf CfUfuccuucsaas asa	1897	VPusUfsuudGa(Ag n)ggaagcUfuUfgau uusgsc	2211	GCAAAUCAAG CUUCCUUCAAA U	2564
AD- 1784217.1	asgscuucCfuUf CfAfaauaagaug gsa	1898	VPusCfsaucUfuuu uugaAfgGfaagcusu su	2212	AAAGCUUCCUU CAAAUAAGAUG G	2565
AD- 1784218.1	usgscugcUfuUf UfAfaaacauags gsa	1899	VPusCfscuaUfguu uuuaAfaGfcagcasu su	2213	AAUGCUGCUUU UAAAACAUAGG A	2566
AD- 1784219.1	asgsgcaaAfuCf AfAfagcuuccus usa	1900	VPusAfsaggAfagcu uugAfuUfugccusgs u	2214	ACAGGCAAUC AAAGCUUCCUU C	2567
AD- 1784220.1	asgsgcaaAfuCf AfAfagcuuccus usa	1900	VPusAfsagdGa(Ag n)gcuuugAfuUfugc cusgsu	2215	ACAGGCAAUC AAAGCUUCCUU C	2567
AD- 1784221.1	gsgscaaaUfcAf AfAfgcuuccuus csa	1901	VPusGfsaadGg(Ag n)agcuuuGfaUfuu gccsusg	2216	CAGGCAAUCA AAGCUUCCUUC A	2568
AD- 1784222.1	asasagcuUfcCf UfUfcaauaags asa	1902	VPusUfscuuAfuuu gaagGfaAfgcuuusg sa	2217	UCAAGCUUCC UUCAAAUAAGA U	2569
AD- 1784223.1	asasagcuUfcCf UfUfcaauaags asa	1902	VPusUfscudTa(Tgn )uugaagGfaAfgcuu usgsa	2218	UCAAGCUUCC UUCAAAUAAGA U	2569

AD-1784224.1	usasaaauGfcUf GfCfuuuuaaaa scsa	1903	VPusGfsuuuUfaaa agcaGfcAfuuuuasg su	2219	ACUAAAAUGCU GCUUUUAAAAC A	2570
AD-1784225.1	asasgaauAfaAf GfUfaccuugacs usa	1904	VPusAfsjudCa(Ag n)gguacuUfuAfuuc uusasu	2220	AUAAGAAUAAA GUACCUUGACU U	2571
AD-1784226.1	asgsaauaAfaGf UfAfccuugacus usa	1905	VPusAfsaguCfaagg uacUfuUfauucusu sa	2221	UAAGAAUAAAAG UACCUUGACUU U	2572
AD-1784227.1	asgsaauaAfaGf UfAfccuugacus usa	1905	VPusAfsagdTc(Agn )agguacuUfuUfauuc ususa	2222	UAAGAAUAAAAG UACCUUGACUU U	2572
AD-1784228.1	gsuscuguUfuCf CfUfaucaucaas gsa	1906	VPusCfsuudGa(Tg n)cauaggAfaAfcag acsasg	2223	CUGUCUGUUUC CUAUGAUCAAG C	2573
AD-1784229.1	uscscguaAfaCf UfUfaacucaas usa	1907	VPusAfsuudGa(Ag n)guuaagUfuUfacg gasasu	2224	AUUCGUA AAC UUAACUCAAU G	2574
AD-1784230.1	cscsucuuCfuGf GfAfauguguga scsa	1908	VPusGfsucdAc(Ag n)cauuccAfgAfaga ggsasg	2225	CUCCUCUUCUG GAAUGUGUGA CC	2575
AD-1784231.1	usasuccaAfaUf AfAfugaaucuu csa	1909	VPusGfсадGa(Tg n)ucauuUfuUfgga uascsa	2226	UGUAUCCAAAU AAUGAAUCUUC G	2576
AD-1784232.1	uscsguuUfcCf UfAfugaucaags csa	1910	VPusGfscudTg(Ag n)ucauagGfaAfaca gascsa	2227	UGUCUGUUUCC UAUGAUCAAGC A	2577
AD-1784233.1	gsusugacAfuCf GfAfcacucauas csa	1911	VPusGfsuadTg(Ag n)gugucgAfuGfuca acsasg	2228	CUGUUGACAUC GACACUCAUAC A	2578
AD-1784234.1	asasguacCfuUf GfAfcuuuguuc	1912	VPusUfsgaaCfaaag ucaAfgGfuacuuus	2229	UAAAGUACCUU GACUUUGUUCA	2579

	sasa		a		C	
AD-1784235.1	asasguacCfuUf GfAfcuuuguuc sasa	1912	VPusUfsgadAc(Ag n)aagucaAfgGfuac uususa	2230	UAAAGUACCUU GACUUUGUUCA C	2579
AD-1784236.1	csasgaucUfaCf CfUfuggugauu susa	1913	VPusAfsaadTc(Agn )ccaaggUfaGfaucu gsusg	2231	CACAGAUUCUAC CUUGGUGAUU UG	2580
AD-1784237.1	csusggauUfgUf GfCfucaaggaas csa	1914	VPusGfsuudCc(Tg n)ugagcaCfaAfucc agsgsu	2232	ACCUGGAUUGU GCUCAAGGAAC C	2581
AD-1784238.1	usgscuuuUfaAf AfAfcuaaggaas asa	1915	VPusUfsuudCc(Tg n)auguuUfaAfaag casgsc	2233	GCUGCUUUUAA AACAUAGGAAA G	2582
AD-1784239.1	usgscugaCfuUf CfAfcuaacuucs gsa	1916	VPusCfsgaaGfuuag ugaAfgUfcagcasc u	2234	AGUGCUGACUU CACUAACUUCG A	2583
AD-1784240.1	usgscugaCfuUf CfAfcuaacuucs gsa	1916	VPusCfsgadAg(Tgn )uagugaAfgUfcagc ascsu	2235	AGUGCUGACUU CACUAACUUCG A	2583
AD-1784241.1	gsasaauuCfcGf UfAfaacuuaacs usa	1917	VPusAfsguuAfagu uuacGfgAfauuucsa sa	2236	UUGAAAUCCG UAAACUUAACU U	2584
AD-1784242.1	gsasaauuCfcGf UfAfaacuuaacs usa	1917	VPusAfsjudTa(Ag n)guuuacGfgAfauu ucsasa	2237	UUGAAAUCCG UAAACUUAACU U	2584
AD-1784243.1	usasaggcAfaAf UfCfagguaaaaas usa	1918	VPusAfsuuUfacc ugauUfuGfccuua asc	2238	GUUAAGGCAAA UCAGGUAAAAU A	2585
AD-1784244.1	usasaggcAfaAf UfCfagguaaaaas usa	1918	VPusAfsuudTu(Ag n)ccugauUfuGfccu uasasc	2239	GUUAAGGCAAA UCAGGUAAAAU A	2585
AD-	gsusucuaGfgUf	1919	VPusUfsucaAfaaaa	2240	CCGUUCUAGGU	2586

1784245.1	AfUfuuuuuuga sasa		auaCfcUfagaacs gs		AUUUUUUUGA AG	
AD- 1784246.1	asasgauaAfaUf UfGfagcuaguu sasa	1920	VPusUfsaadCu(Ag n)gcucuaUfuUfauc uusgsu	2241	ACAAGAUAAAU UGAGCUAGUU AA	2587
AD- 1784247.1	ususagcuAfaGf CfAfcagaucuas csa	1921	VPusGfsuadGa(Tg n)cugugcUfuAfgcu aasasg	2242	CUUUAGCUAAG CACAGAUCUAC C	2588
AD- 1784248.1	csusucacUfaAf CfUfucgauccus csa	1922	VPusGfsagdGa(Tg n)cgaaguUfaGfuga agsusc	2243	GACUUCACUAA CUUCGAUCCUC G	2589
AD- 1784249.1	asasuuccGfuAf AfAfcuuaacuus csa	1923	VPusGfsaadGu(Tg n)aaguuuAfcGfgaa uususc	2244	GAAAUUCCGUA AACUUAACUUC A	2590
AD- 1784250.1	csusgcuUfuAf AfAfacuaggas asa	1924	VPusUfsucdCu(Ag n)uguuuuAfaAfac agscsa	2245	UGCUGCUUUU AAAACAUAGGA AA	2591
AD- 1784251.1	csusguugAfcAf UfCfagacucac usa	1925	VPusAfsugdAg(Tg n)gucgauGfuCfaac agsgsg	2246	CCCUGUUGACA UCGACACUCAU A	2592
AD- 1784252.1	ususcacuAfaCf UfUfagcuaccus gsa	1926	VPusCfsgadGg(Ag n)ucgaagUfuAfgug aasgsu	2247	ACUUCACU AAC UUCGAUCCUCG U	2593
AD- 1784253.1	gscsuaagCfaCf AfGfaucuaaccus usa	1927	VPusAfsagdGu(Ag n)gaucugUfgCfuua gcsusa	2248	UAGCUAAGCAC AGAUCUACCUU G	2594
AD- 1784254.1	usasaaguAfcCf UfUfgacuuugu susa	1928	VPusAfsacaAfaguc aagGfuAfcuuuasus u	2249	AAUAAAGUACC UUGACUUUGU UC	2595
AD- 1784255.1	asasaaugCfuGf CfUfuuuaaaacs asa	1929	VPusUfsgudTu(Tg n)aaaagcAfgCfauu uusasg	2250	CUAAAAUGCUG CUUUUAAAACA U	2596

AD-1784256.1	gscsugcuUfuUf AfAfaacauaggs asa	1930	VPusUfscuAfugu uuuaAfaAfgcagcsa su	2251	AUGCUGCUUU UAAAACAUAGG AA	2597
AD-1784257.1	gscsugcuUfuUf AfAfaacauaggs asa	1930	VPusUfscdTa(Tgn )guuuuaAfaAfgcag csasu	2252	AUGCUGCUUU UAAAACAUAGG AA	2597
AD-1784258.1	uscsaugaUfuCf UfAfuguaaugu sasa	1931	VPusUfsacaUfuaca uagAfaUfcaugascs u	2253	AGUCAUGAUUC UAUGUAAUGU AA	2598
AD-1784259.1	uscsaugaUfuCf UfAfuguaaugu sasa	1931	VPusUfsacdAu(Tg n)acauagAfaUfcau gascsu	2254	AGUCAUGAUUC UAUGUAAUGU AA	2598
AD-1784260.1	asgsugcuGfaCf UfUfcacuaacus usa	1932	VPusAfsaguUfagu gaagUfcAfgcacusc su	2255	AGAGUGCUGAC UUCACUAACUU C	2599
AD-1784261.1	csusaagcAfcAf GfAfucuaccuus gsa	1933	VPusCfsaadGg(Tgn )agaucuGfuGfcuua gscsu	2256	AGCUAAGCACA GAUCUACCUUG G	2600
AD-1784262.1	csascuaaCfuUf CfGfauccugus gsa	1934	VPusCfsacgAfggau cgaAfgUfuagugsas a	2257	UUCACUAACUU CGAUCCUCGUG G	2601
AD-1784263.1	csusgaagAfaCf AfGfgcaaaucas asa	1935	VPusUfsugdAu(Tg n)ugccugUfuCfuuc agsusg	2258	CACUGAAGAAC AGGCAAUCAA A	2602
AD-1784264.1	asasaguaCfcUf UfGfacuuuguu scsa	1936	VPusGfsaacAfaagu caaGfgUfacuuusas u	2259	AUAAAGUACCU UGACUUUGUU CA	2603
AD-1784265.1	gscsuuugUfuU fAfUfgguaguag susa	1937	VPusAfscudAc(Tgn )accuaaAfaCfaaag csasc	2260	GUGCUUUGUU UAUGGUAGUA GUU	2604
AD-1784266.1	csasugauUfcUf AfUfguaaugua	1938	VPusUfsuadCa(Tg n)uacuaaGfaAfuca	2261	GUCAUGAUUCU AUGUAAUGUA	2605

	sasa		ugsasc		AA	
AD-1784267.1	csgsuucuAfgGf UfAfuuuuuuug sasa	1939	VPusUfscAAfaaaa uacCfuAfgaacgsgs c	2262	GCCGUUCUAGG UAUUUUUUUG AA	2606
AD-1784268.1	ususcuagGfuAf UfUfuuuuuugaa sgsa	1940	VPusCfsuucAfaaaa aaUfCfuagaascs g	2263	CGUUCUAGGUA UUUUUUUGAA GG	2607
AD-1784269.1	uscscuucCfuGf AfAfuccuuggas usa	1941	VPusAfsuccAfagga uucAfgGfaaggasgs g	2264	CCUCCUCCUG AAUCCUUGGAU U	2608
AD-1784270.1	uscscuucCfuGf AfAfuccuuggas usa	1941	VPusAfsucdCa(Ag n)ggauucAfgGfaag gasgsg	2265	CCUCCUCCUG AAUCCUUGGAU U	2608
AD-1784271.1	gsascuaaAfaUf GfCfugcuuuua sasa	1942	VPusUfsuaaAfagca gcaUfuUfuagucsas a	2266	UUGACUAAAAU GCUGCUUUUAA A	2609
AD-1784272.1	gsascuaaAfaUf GfCfugcuuuua sasa	1942	VPusUfsuadAa(Ag n)gcagcaUfuUfuag ucsasa	2267	UUGACUAAAAU GCUGCUUUUAA A	2609
AD-1784273.1	asascaggCfaAf AfUfcaaagcuus csa	1943	VPusGfsaadGc(Tg n)uugauuUfgCfcug uuscsu	2268	AGAACAGGCAA AUCAAAGCUUC C	2610
AD-1784274.1	csesuuccUfgAf AfUfccuuggaus usa	1944	VPusAfsaucCfaagg auuCfaGfgaaggsas g	2269	CUCCUCCUGA AUCCUUGGAUU A	2611
AD-1784275.1	usgsaugaCfuCf UfCfaggacaaas gsa	1945	VPusCfsuudTg(Tgn )ccugagAfgUfcauc asasa	2270	UUUGAUGACUC UCAGGACAAAG C	2612
AD-1784276.1	usgsgaguUfuG fAfUfgacucuca sgsa	1946	VPusCfsugdAg(Ag n)gucaucAfaAfcuc cascsg	2271	CGUGGAGUUU GAUGACUCUCA GG	2613
AD-	asusccaaAfuAf	1947	VPusCfsgaaGfauuc	2272	GUAUCCAAUA	2614

1784277.1	AfUfgaaucuucs gsa		auuAfuUfuggausas c		AUGAAUCUUCG G	
AD- 1784278.1	asuscmaaAfuAf AfUfgaaucuucs gsa	1947	VPusCfsgadAg(Ag n)uucuuAfuUfug gausasc	2273	GUAUCCAAAUA AUGAAUCUUCG G	2614
AD- 1784279.1	ususgacuUfuG fUfUfcacagcau sgsa	1948	VPusCfsaudGc(Tgn )gugaacAfaAfguca asgsg	2274	CCUUGACUUUG UUCACAGCAUG U	2615
AD- 1784280.1	asgsaucuAfcCf UfUfggugauuu sgsa	1949	VPusCfsaaaUfcacc aagGfuAfgaucusgs u	2275	ACAGAUCUACC UUGGUGAUUU GG	2616
AD- 1784281.1	asusgguaGfuAf GfUfuuuucugu sasa	1950	VPusUfsacaGfaaaa acuAfcUfaccausas a	2276	UUAUGGUAGU AGUUUUUCUG UAA	2617
AD- 1784282.1	asusgguaGfuAf GfUfuuuucugu sasa	1950	VPusUfsacdAg(Ag n)aaaacuAfcUfacc ausasa	2277	UUAUGGUAGU AGUUUUUCUG UAA	2617
AD- 1784283.1	cscsuugaCfuUf UfGfuucacagcs asa	1951	VPusUfsgcdTg(Tgn )gaacaaAfgUfcaag gsusa	2278	UACCUUGACUU UGUUCACAGCA U	2618
AD- 1784284.1	cscsuggaUfuGf UfGfcucaaggas asa	1952	VPusUfsucdCu(Tg n)gagcacAfaUfcca ggsusc	2279	GACCUGGAUUG UGCUCAAGGAA C	2619
AD- 1784285.1	gsasgcuaGfuUf AfAfggcaaaucs asa	1953	VPusUfsgadTu(Tgn )gccuaAfcUfagcu csasa	2280	UUGAGCUAGU UAAGGCAAAUC AG	2620
AD- 1784286.1	ascsugaaGfaAf CfAfggcaaaucs asa	1954	VPusUfsgadTu(Tgn )gccuguUfcUfucag usgsg	2281	CCACUGAAGAA CAGGCAAAUCA A	2621
AD- 1784287.1	usgsaagaAfcAf GfGfcaaaucaas asa	1955	VPusUfsuudGa(Tg n)uugccuGfuUfcuu casgsu	2282	ACUGAAGAACA GGCAAAUCAAA G	2622

AD-1784288.1	csusccucUfuCf UfGfgaaugugu sgsa	1956	VPusCfsacaCfauuc cagAfaGfaggagsg g	2283	CCCUCCUCUUC UGGAAUGUGU GA	2623
AD-1784289.1	csusccucUfuCf UfGfgaaugugu sgsa	1956	VPusCfsacdAc(Agn )uuccagAfaGfagga gsgsg	2284	CCCUCCUCUUC UGGAAUGUGU GA	2623
AD-1784290.1	gscsuuucAfaCf GfUfggaguuuug sasa	1957	VPusUfscaaAfcucc acgUfuGfaaagcsas u	2285	AUGCUUUCAAC GUGGAGUUUG AU	2624
AD-1784291.1	usgscuuuCfaAf CfGfuggaguuu sgsa	1958	VPusCfsaaaCfucca cguUfgAfaagcasus g	2286	CAUGCUUUCAA CGUGGAGUUU GA	2625
AD-1784292.1	usgscuuuCfaAf CfGfuggaguuu sgsa	1958	VPusCfsaadAc(Tgn )ccacguUfgAfaagc asusg	2287	CAUGCUUUCAA CGUGGAGUUU GA	2625
AD-1784293.1	csasgguaAfaAf UfAfgucaugaus usa	1959	VPusAfsaudCa(Tgn )gacuauUfuUfaccu gsasu	2288	AUCAGGUAAAA UAGUCAUGAU UC	2626
AD-1784294.1	csusguauCfcAf AfAfuaaugaaus csa	1960	VPusGfsaudTc(Ag n)uuuuuGfgAfua cagsasc	2289	GUCUGUAUCCA AAUAAUGAAUC U	2627
AD-1784295.1	asasggcaAfaUf CfAfgguaaaaus asa	1961	VPusUfsaudTu(Tg n)accugaUfuUfgcc uusasa	2290	UUAAGGCAAU CAGGUAAAAUA G	2628
AD-1784296.1	cscsuccuUfcCf UfGfaauccuugs gsa	1962	VPusCfscaaGfgauu cagGfaAfggaggscs c	2291	GGCCUCCUCC UGAAUCCUUGG A	2629
AD-1784297.1	ususccuuCfaAf AfUfaagauggus csa	1963	VPusGfsacdCa(Tgn )cuuuuUfgAfaagga asgsc	2292	GCUUCCUUCAA AUAAGAUGGUC C	2630
AD-1784298.1	ususgaaaUfuCf CfGfuaaacuuas	1964	VPusUfsuadAg(Tg n)uuacggAfaUfuuc	2293	UGUUGAAAUU CCGUAAACUUA	2631

	asa		aascsa		AC	
AD-1784299.1	ascsacucAfuAfCfAfgccaaguasusa	1965	VPusAfsuadCu(Tgn)ggcuguAfuGfaguguscs	2294	CGACACUCAUA CAGCCAAGUAU G	2632
AD-1784300.1	gscsacagAfuCfUfAfcuuggugsasa	1966	VPusUfscacCfaagguagAfuCfugugcsusu	2295	AAGCACAGAUC UACCUUGGUGA U	2633
AD-1784301.1	csusuucaAfcGfUfGfgaguuugasusa	1967	VPusAfsucaAfacucacGfuUfgaaagscsa	2296	UGCUUUCAACG UGGAGUUUGA UG	2634
AD-1784302.1	usasgcuaAfgCfAfCfagaucuacsasa	1968	VPusGfsgudAg(Agn)ucugugCfuUfagcuasasa	2297	UUUAGCUAAGC ACAGAUCUACC U	2635
AD-1784303.1	ususgugaUfaCfAfGfaguauuuususa	1969	VPusAfsaauAfuacucugUfaUfcacaascsu	2298	AGUUGUGAUA CAGAGUAUAUU UC	2636
AD-1784304.1	ascsucauAfcAfGfCfcaaguaugsasa	1970	VPusUfscAuAfcuugcugGfuAfuGfagugscsu	2299	ACACUCAUACA GCCAAGUAUGA C	2637
AD-1784305.1	asgsuuaaGfgCfAfAfaucagguasasa	1971	VPusUfsuadCc(Tgn)gauuugCfcUfuaacusasg	2300	CUAGUUAAGGC AAAUCAGGUAA A	2638
AD-1784306.1	gsusugugAfuAfCfAfgaguauaususa	1972	VPusAfsauaUfacucuguAfuCfacaacsusc	2301	GAGUUGUGAU ACAGAGUAUAU UU	2639
AD-1784307.1	gsusugugAfuAfCfAfgaguauaususa	1972	VPusAfsaudAu(Agn)cucuguAfuCfacaacsusc	2302	GAGUUGUGAU ACAGAGUAUAU UU	2639
AD-1784308.1	usgsacauCfGfAfCfAfcucauacassasa	1973	VPusCfsuguAfuGfagugcufgAfuGfagucassasc	2303	GUUGACAUCGA CACUCAUACAG C	2640
AD-	asgsauaaAfuUf	1974	VPusUfsuadAc(Tg	2304	CAAGAUAAAUU	2641

1784309.1	GfAfgcuaguuas asa		n)agcucaAfuUfuau cususg		GAGCUAGUUA A G	
AD- 1784310.1	usasgguaUfuU fUfUfuugaagg ususa	1975	VPusAfsaccUfucaa aaaAfaUfaccuasgs a	2305	UCUAGGUUU UUUUUGAAGG UUG	2642
AD- 1784311.1	usasgguaUfuU fUfUfuugaagg ususa	1975	VPusAfsacdCu(Tgn )caaaaaAfaUfaccu asgsa	2306	UCUAGGUUU UUUUUGAAGG UUG	2642
AD- 1784312.1	usgsgugcUfuUf GfUfuuauggua sgsa	1976	VPusCfsuacCfauaa acaAfaGfcaccasasc	2307	GUUGGUGCUU UGUUUAUGGU AGU	2643
AD- 1784313.1	usgsugauAfcAf GfAfguauuuuu scsa	1977	VPusGfsaaaUfauac ucuGfuAfucacasas c	2308	GUUGUGAUAC AGAGUAUUAU UCC	2644
AD- 1784314.1	uscsuucuGfgAf AfUfgugugaccs usa	1978	VPusAfsaggdTc(Agn )cacauuCfcAfgaag asgsg	2309	CCUCUUCUGGA AUGUGUGACCU G	2645
AD- 1784315.1	csusggccGfuUf CfUfagguuuuu susa	1979	VPusAfsaaaUfaccu agaAfcGfgccagsus c	2310	GACUGGCCGUU CUAGGUUUUU UU	2646
AD- 1784316.1	asuscaggUfaAf AfAfuagucaugs asa	1980	VPusUfscadTg(Agn )cuuuuuUfaCfcuga ususu	2311	AAAUCAGGUAA AAUAGUCAUGA U	2647
AD- 1784317.1	ususccauUfaAf AfAfcuaagggs asa	1981	VPusUfsgcdCc(Tgn )uuguuuUfaAfugg aasusc	2312	GAUUCCAUUA AACAAAGGGCA A	2648
AD- 1784318.1	csasagagUfgCf UfGfacuucacus asa	1982	VPusUfsagdTg(Ag n)agucagCfaCfucu ugscsc	2313	GGCAAGAGUGC UGACUUCACUA A	2649
AD- 1784319.1	ususucacCfGfUf GfGfaguuuugau sgsa	1983	VPusCfsaucAfaacu ccaCfGfugaaasgs c	2314	GCUUUCACGU GGAGUUUGAU GA	2650

AD-1784320.1	ususggugCfuUf UfGfuuuauggu sasa	1984	VPusUfsaccAfuaaa caaAfgCfaccaascsc	2315	GGUUGGUGCU UUGUUUAUGG UAG	2651
AD-1784321.1	ususggugCfuUf UfGfuuuauggu sasa	1984	VPusUfsacdCa(Tgn )aaacaaAfgCfacc scsc	2316	GGUUGGUGCU UUGUUUAUGG UAG	2651
AD-1784322.1	csascucaUfaCf AfGfccaaguau gsa	1985	VPusCfsauaCfuugg cugUfaUfgagugs c	2317	GACACUCAUAC AGCCAAGUAUG A	2652
AD-1784323.1	asusaaagUfaCf CfUfugacuug usa	1986	VPusAfscaaAfguca aggUfaCfuuuaus c	2318	GAAUAAAGUAC CUUGACUUUG UU	2653
AD-1784324.1	asusgacuUfuUf GfAfauuacagas gsa	1987	VPusCfsudTg(Tgn )aaaucaAfaAfguca ususa	2319	UAAUGACUUU UGAAUUACAGA GA	2654
AD-1784325.1	gsuscaugAfuUf CfUfauguaaug susa	1988	VPusAfscauUfacau agaAfuCfaugacs a	2320	UAGUCAUGAU UCUAUGUAAU GUA	2655
AD-1784326.1	gsasccugGfaUf UfGfugcucaags gsa	1989	VPusCfscudTg(Agn )gcacaaUfcCfaggu csasc	2321	GUGACCUGGAU UGUGCUCAAGG A	2656
AD-1784327.1	gsascaucGfaCf AfCfucuaacags csa	1990	VPusGfscudGu(Ag n)ugagugUfcGfaug ucsasa	2322	UUGACAUCGAC ACUCAUACAGC C	2657
AD-1784328.1	gsasagaaCfaGf GfCfaaaucaaas gsa	1991	VPusCfsuudTg(Ag n)uuugccUfgUfucu ucsasg	2323	CUGAAGAACAG GCAAAUCAAG C	2658
AD-1784329.1	csgsuaaaCfuUf AfAfcuucuaugs gsa	1992	VPusCfscauUfgaag uuAfgUfuuacgsgs a	2324	UCCGUAAACUU AACUUCAAUGG G	2659
AD-1784330.1	asgsguuaAfaUf AfGfucaugauu	1993	VPusGfsaadTc(Agn )ugacuaUfuUfuacc	2325	UCAGGUAAAAU AGUCAUGAUUC	2660

	scca		usgsa		U	
AD-1784331.1	gsusaccuUfgAf CfUfuuguucacs asa	1994	VPusUfsgudGa(Ag n)caaaguCfaAfggu acsusu	2326	AAGUACCUUGA CUUUGUUCACA G	2661
AD-1784332.1	cscsguucUfaGf GfUfauuuuuuu sgsa	1995	VPusCfsaaaAfaaau accUfaGfaacggscs c	2327	GGCCGUUCUAG GUAUUUUUUU GA	2662
AD-1784333.1	ususuaugGfuA fGfUfaguuuuu csusa	1996	VPusAfsgaaAfaacu acuAfcCfauaaasc a	2328	UGUUUAUGGU AGUAGUUUUU CUG	2663
AD-1784334.1	csgsuggaGfuUf UfGfaugacucus csa	1997	VPusGfsagdAg(Tg n)caucaaAfcUfcca cgsusu	2329	AACGUGGAGU UUGAUGACUCU CA	2664
AD-1784335.1	ususcaacGfuGf GfAfguuugaug sasa	1998	VPusUfscadTc(Agn )aacuccAfcGfuuga asasg	2330	CUUUCAACGUG GAGUUUGAUG AC	2665
AD-1784336.1	gsasguugUfgAf UfAfcagaguaus asa	1999	VPusUfsaudAc(Tg n)cuguauCfaCfaac ucsusa	2331	UAGAGUUGUG AUACAGAGUAU AU	2666
AD-1784337.1	usasccuuGfaCf UfUfuguucaca sgsa	2000	VPusCfsuguGfaaca aagUfcAfagguasc u	2332	AGUACCUUGAC UUUGUUCACAG C	2667
AD-1784338.1	usasccuuGfaCf UfUfuguucaca sgsa	2000	VPusCfsugdTg(Agn )acaaagUfcAfaggu ascsu	2333	AGUACCUUGAC UUUGUUCACAG C	2667
AD-1784339.1	usasgaguUfgUf GfAfuacagagus asa	2001	VPusUfsacdTc(Tgn )guaucaCfaAfcucu asasu	2334	AUUAGAGUUG UGAUACAGAGU AU	2668
AD-1784340.1	usgsagugCfaAf AfUfccauagcas csa	2002	VPusGfsugdCu(Ag n)uggauuUfgCfacu casasc	2335	GUUGAGUGCA AAUCCAUAGCA CA	2669
AD-	csasaaucAfgGf	2003	VPusUfsgadCu(Ag	2336	GGCAAUCAGG	2670

1784341.1	UfAfaaaugucs asa		n)uuuuacCfuGfau uugscsc		UAAAAUAGUCA U	
AD- 1784342.1	asasgcacAfgAf UfCfuaccuuggs usa	2004	VPusAfsccaAfggua gauCfuGfugcuusas g	2337	CUAAGCACAGA UCUACCUUGGU G	2671
AD- 1784343.1	ascsuuugUfuCf AfCfagcauguas gsa	2005	VPusCfsuacAfugcu gugAfaCfaaaguscs a	2338	UGACUUUGUU CACAGCAUGUA GG	2672
AD- 1784344.1	usgsgccgUfuCf UfAfgguauuuu susa	2006	VPusAfsaaaAfuacc uagAfaCfsgccasgs u	2339	ACUGGCCGUUC UAGGUUUUU UU	2673
AD- 1784345.1	gscscaagUfaUf GfAfcccuucccs usa	2007	VPusAfsggdGa(Ag n)gggucaUfaCfuug gcsusg	2340	CAGCCAAGUUAU GACCCUCCCCU G	2674
AD- 1784346.1	usasugguAfgUf AfGfuuuuucug susa	2008	VPusAfsccagAfaaaa cuaCfuAfccauasas a	2341	UUUAUGGUAG UAGUUUUUCU GUA	2675
AD- 1784347.1	asasuugaGfcUf AfGfuuaaggcas asa	2009	VPusUfsugdCc(Tgn )uaacuaGfcUfcaau ususa	2342	UAAAUUGAGCU AGUUAAGGCAA A	2676
AD- 1784348.1	ascsuuaaAfuGf CfUfgcuuuuaa sasa	2010	VPusUfsuuaAfaagc agcAfuUfuuaguscs a	2343	UGACUAAAAUG CUGCUUUUAAA A	2677
AD- 1784349.1	ascsuucaCfuUf GfGfuucacuggs asa	2011	VPusUfscddAg(Tgn )gaaccaAfgUfgaag ususc	2344	GAACUUCACUU GGUUCACUGGA A	2678
AD- 1784350.1	uscsuaggUfaUf UfUfuuuugaag sgsa	2012	VPusCfscuuCfaaaa aaaUfaCfcuagasas c	2345	GUUCUAGGUA UUUUUUUGAA GGU	2679
AD- 1784351.1	asgscacaGfaUf CfUfaccuuggus gsa	2013	VPusCfsaccAfggu agaUfcUfgugcusus a	2346	UAAGCACAGAU CUACCUUGGUG A	2680

AD-1784352.1	gscscguuCfuAf GfGfuauuuuuu susa	2014	VPusAfsaaaAfaaua ccuAfgAfacggcscsa	2347	UGGCCGUUCUA GGUAUUUUUU UG	2681
AD-1784353.1	csusaaaaUfgCf UfGfcuuuuaaa sasa	2015	VPusUfsuuuAfaaa gcagCfaUfuuuagsu sc	2348	GACUAAAUGC UGCUIIUUAAAA C	2682
AD-1784354.1	gsasacagGfcAf AfAfucaaagcus usa	2016	VPusAfsagdCu(Tgn )ugauuuGfcCfuguu csusu	2349	AAGAACAGGCA AAUCAAGCUU C	2683
AD-1784355.1	usgscuuuGfuU fUfAfugguagua sgsa	2017	VPusCfsuacUfacca uaaAfcAfaagcasc c	2350	GGUGCUUUGU UUAUGGUAGU AGU	2684
AD-1784356.1	asasuuaGfgUf UfGfugauacags asa	2018	VPusUfscudGu(Ag n)ucacaaCfuCfuaa uusasu	2351	AUAAUUAGAG UUGUGAUACA GAG	2685
AD-1784357.1	csusgguuGfgUf GfCfuuuuuua susa	2019	VPusAfsuaaAfcaaa gcaCfcAfacagcsc	2352	GGCUGGUUGG UGCUIIUUUU AUG	2686
AD-1784358.1	uscscuucAfaAf UfAfagauggucs csa	2020	VPusGfsgadCc(Ag n)ucuuauUfuGfaa ggasag	2353	CUUCCUUCAAA UAAGAUGGUCC C	2687
AD-1784359.1	gscscuccUfuCf CfUfgaauccuus gsa	2021	VPusCfsaadGg(Ag n)uucaggAfaGfgag gcscsa	2354	UGGCCUCCUUC CUGAAUCCUUG G	2688
AD-1784360.1	gsasuucAfuGf UfAfauguaaacs csa	2022	VPusGfsgudTu(Ag n)cauuacAfuAfgaa ucsasu	2355	AUGAUUCUAU GUAUGUAAAC CA	2689
AD-1784361.1	usgsguugGfuG fCfUfuuuuuua usgsa	2023	VPusCfsauaAfacaa agcAfcCfaaccagsc	2356	GCUGGUUGGU GCUUUGUUUA UGG	2690
AD-1784362.1	csuscauaCfaGf CfCfaaguaugas	2024	VPusGfsucaUfacu uggcUfgUfaugagsu	2357	CACUCAUACAG CCAAGUAUGAC	2691

	csa		sg		C	
AD-1784363.1	csuscauaCfaGf CfCfaaguaugas csa	2024	VPusGfsucdAu(Ag n)cuuggcUfgUfaug agsusg	2358	CACUCAUACAG CCAAGUAUGAC C	2691
AD-1784364.1	asuscgacAfcUf CfAfuacagccas asa	2025	VPusUfsugdGc(Tg n)guaugaGfuGfucg ausgsu	2359	ACAUCGACACU CAUACAGCCAA G	2692
AD-1784365.1	gscsacugGfcAf UfAfanggacuucs csa	2026	VPusGfsgadAg(Tg n)ccuuauGfcCfagu gcsusc	2360	GAGCACUGGCA UAAGGACUUCC C	2693
AD-1784366.1	asascgugGfaGf UfUfugaugacu scsa	2027	VPusGfsagdTc(Agn )ucaaacUfcCfacgu usgsa	2361	UCAACGUGGAG UUUGAUGACUC U	2694
AD-1784367.1	gscsaaauCfaGf GfUfaaaaugu scsa	2028	VPusGfsacuAfuuu uaccUfgAfuugcsc su	2362	AGGCAAUCAG GUAAAUAUGUC A	2695
AD-1784368.1	gscsaaauCfaGf GfUfaaaaugu scsa	2028	VPusGfsacdTa(Tgn )uuuaccUfgAfuug cscsu	2363	AGGCAAUCAG GUAAAUAUGUC A	2695
AD-1784369.1	csusucagAfaAf GfUfuguugaug susa	2029	VPusAfscauCfaaca acuUfuCfugaagsgs c	2364	GCCUUCAGAAA GUUGUUGAUG UG	2696
AD-1784370.1	csusucagAfaAf GfUfuguugaug susa	2029	VPusAfscauTc(Agn )acaacuUfuCfugaa gsgsc	2365	GCCUUCAGAAA GUUGUUGAUG UG	2696
AD-1784371.1	asasaucGfgUf AfAfaauagucas usa	2030	VPusAfsugdAc(Tgn )auuuuaCfcUfgauu usgsc	2366	GCAAAUCAGGU AAAAUAGUCAU G	2697
AD-1784372.1	asgsgcaaAfuCf AfGfguaaaauas gsa	2031	VPusCfsuauUfuua ccugAfuUfugccusu sa	2367	UAAGGCAAAUC AGGUAAAUAUG U	2698
AD-	gsgsgcaaGfaGf	2032	VPusUfsgadAg(Tg	2368	AAGGGCAAGAG	2699

1784373.1	UfGfcugacuucs asa		n)cagcacUfcUfugc ccsusu		UGCUGACUUCA C	
AD- 1784375.1	gsgsccguUfcUf AfGfguauuuuu susa	2033	VPusAfsaaaAfauac cuaGfaAfcggccsas g	2369	CUGGCCGUUCU AGGUUUUUUU UU	2700
AD- 1784377.1	csgsggccUfuCf AfGfaaaguugu susa	2034	VPusAfsacaAfcuuu cugAfaGfgcccsgs u	2370	ACCGGGCCUUC AGAAAGUUGU UG	2701
AD- 1784378.1	gsgscaaaUfcAf GfGfuaaaaauag susa	2035	VPusAfscaaUfuuu accuGfaUfuugccsu su	2371	AAGGCAAUCA GGUAAAAUAGU C	2702
AD- 1784379.1	gsasggauCfcUf CfAfacauggus csa	2036	VPusGfsaccAfuugu ugaGfgAfucccsas g	2372	CUGAGGAUCCU CAACAAUGGUC A	2703
AD- 1784380.1	gsasggauCfcUf CfAfacauggus csa	2036	VPusGfsacdCa(Tgn )uguugaGfgAfuccu csasg	2373	CUGAGGAUCCU CAACAAUGGUC A	2703
AD- 1784381.1	ususcacuUfgGf UfUfcacuggaas csa	2037	VPusGfsuudCc(Ag n)gugaacCfaAfgug aasgsu	2374	ACUUCACUUGG UUCACUGGAAC A	2704
AD- 1784382.1	asgsaacuGfaUf GfGfuggacaacs usa	2038	VPusAfs gudTg(Tgn )ccaccaUfcAfguuc ususc	2375	GAAGAACUGAU GGUGGACAACU G	2705
AD- 1784383.1	asasuaaaGfuAf CfCfuugacuuus gsa	2039	VPusCfsaaaGfucaa gguaAfcUfuuauuscs u	2376	AGAAUAAAGUA CCUUGACUUUG U	2706
AD- 1784384.1	asasuaaaGfuAf CfCfuugacuuus gsa	2039	VPusCfsaadAg(Tgn )caagguAfcUfuuau uscsu	2377	AGAAUAAAGUA CCUUGACUUUG U	2706
AD- 1784385.1	csusuuguUfcAf CfAfgcauguags gsa	2040	VPusCfscuaCfaugc uguGfaAfcaaagsus c	2378	GACUUUGUUCA CAGCAUGUAGG G	2707

AD-1784386.1	csusuuguUfcAf CfAfgcauguags gsa	2040	VPusCfscudAc(Agn )ugcuguGfaAfcaaa gsusc	2379	GACUUUGUUCA CAGCAUGUAGG G	2707
AD-1784387.1	asasuaagAfaUf AfAfaguaccuus gsa	2041	VPusCfsaadGg(Tgn )acuuuaUfuCfuua uususc	2380	GAAAUAGAAU AAAGUACCUUG A	2708
AD-1784388.1	asgsuaguUfuU fUfCfuguaacac sasa	2042	VPusUfsgudGu(Tg n)acagaaAfaAfcua cusasc	2381	GUAGUAGUUU UUCUGUACAC AG	2709
AD-1784389.1	cscsaaguAfuGf AfCfccuucccus gsa	2043	VPusCfsaggGfaagg gucAfuAfcuuggscs u	2382	AGCCAAGUAUG ACCCUCCCCUG A	2710
AD-1784390.1	ususgaguGfcAf AfAfuccauagcs asa	2044	VPusUfsgcdTa(Tgn )ggauuuGfcAfcuca ascsc	2383	GGUUGAGUGC AAAUCCAUAGC AC	2711
AD-1784391.1	gsgsccuuCfaGf AfAfaguuguug sasa	2045	VPusUfscaaCfaacu uucUfgAfaggccscs g	2384	CGGGCCUUCAG AAAGUUGUUG AU	2712
AD-1784392.1	asgsgaucCfuCf AfAfcaauggucs asa	2046	VPusUfsgadCc(Ag n)uuguugAfgGfauc cuscsa	2385	UGAGGAUCCUC AACAAUGGUCA U	2713
AD-1784393.1	asusuagaGfuU fGfUfgauacaga sgsa	2047	VPusCfsucdTg(Tgn )aucacaAfcUfcuaa ususa	2386	UAAUUAGAGU UGUGAUACAGA GU	2714
AD-1784394.1	csasacguGfgAf GfUfuugaugac susa	2048	VPusAfsgudCa(Tgn )caaacuCfcAfcguu gsasa	2387	UUCAACGUGGA GUUUGAUGAC UC	2715
AD-1784395.1	gsascuuuUfgAf AfUfuacagagas usa	2049	VPusAfsucdTc(Tgn )guaauuCfaAfaagu csasu	2388	AUGACUUUUG AAUUACAGAGA UA	2716
AD-1784396.1	usgsaggaUfcCf UfCfaacaauggs	2050	VPusAfsccaUfuguu gagGfaUfccucasgs	2389	CCUGAGGAUCC UCAACAAUGGU	2717

	usa		g		C	
AD-1784397.1	gsasguuuGfaU fGfAfcucucagg sasa	2051	VPusUfscddTg(Agn )gagucaUfcAfaacu cscsa	2390	UGGAGUUUGA UGACUCUCAGG AC	2718
AD-1784398.1	ususuuuaAfaCf AfUfaggaaagus asa	2052	VPusUfsacdTu(Tgn )ccuauGufuUfuaaa asgsc	2391	GCUUUUAAAAC AUAGGAAAGUA G	2719
AD-1784399.1	ususauggUfaG fUfAfguuuuuc usgsa	2053	VPusCfsagaAfaaac uacUfaCfcauaasas c	2392	GUUUAUGGUA GUAGUUUUUC UGU	2720
AD-1784400.1	asascuucAfcUf UfGfguucacugs gsa	2054	VPusCfscagUfgaac caaGfuGfaaguuscs u	2393	AGAACUUCACU UGGUUCACUG GA	2721
AD-1784401.1	asasauugAfgCf UfAfguaaaggcs asa	2055	VPusUfsgcdCu(Tgn )aacuagCfuCfaauu usasu	2394	AUAAAUUGAGC UAGUUAAGGCA A	2722
AD-1784402.1	ususuguuUfaU fGfGfuaguagu ususa	2056	VPusAfsaacUfacua ccaUfaAfacaaasgs c	2395	GCUUUGUUUA UGGUAGUAGU UUU	2723
AD-1784403.1	ususuguuUfaU fGfGfuaguagu ususa	2056	VPusAfsaadCu(Ag n)cuaccaUfaAfaca aasgsc	2396	GCUUUGUUUA UGGUAGUAGU UUU	2723
AD-1784404.1	asasgggcAfaGf AfGfugcugacus usa	2057	VPusAfsagdTc(Agn )gcacucUfuGfccu ususg	2397	CAAAGGGCAAG AGUGCUGACUU C	2724
AD-1784405.1	gsgsaguuUfgAf UfGfacucucags gsa	2058	VPusCfscugAfgagu cauCfaAfacuccsasc	2398	GUGGAGUUUG AUGACUCUCAG GA	2725
AD-1784406.1	gsgsgccuUfcAf GfAfaaguuguu sgsa	2059	VPusCfsaacAfacuu ucuGfaAfggcccsgs g	2399	CCGGGCCUUCA GAAAGUUGUU GA	2726
AD-	gscsaagaGfuGf	2060	VPusAfsgudGa(Ag	2400	GGGCAAGAGUG	2727

1784407.1	CfUfgacuucacs usa		n)gucagcAfcUfcuu gscsc		CUGACUUCACU A	
AD- 1784408.1	asgscacUfgAf AfGfaacaggcas asa	2061	VPusUfsugdCc(Tgn )guucuuCfaGfuggc usgsa	2401	UCAGCCACUGA AGAACAGGCAA A	2728
AD- 1784409.1	asusuccaUfuAf AfAfacaaagggs csa	2062	VPusGfscddUfuugu uuuAfaUfggauscs c	2402	GGAUUCCAUIA AAACAAAGGGC A	2729
AD- 1784410.1	asusuccaUfuAf AfAfacaaagggs csa	2062	VPusGfscddCu(Tgn )uguuuuAfaUfggaa uscsc	2403	GGAUUCCAUIA AAACAAAGGGC A	2729
AD- 1784411.1	gsusaguuUfuU fCfUfguaacaca sgsa	2063	VPusCfsugdTg(Tgn )uacagaAfaAfacua csusa	2404	UAGUAGUUUU UCUGUAACACA GA	2730
AD- 1784412.1	gsgsuauuUfuU fUfUfgaagguug sgsa	2064	VPusCfscacCfcuuc aaaAfaAfaucsus a	2405	UAGGUUUUU UUUGAAGGUU GGC	2731
AD- 1784413.1	uscscaaaUfaAf UfGfaaucuucgs gsa	2065	VPusCfscgaAfgauu cauUfaUfuuggasus a	2406	UAUCCAAUAA UGAAUCUUCGG G	2732
AD- 1784414.1	asasacauAfgGf AfAfaguagaas gsa	2066	VPusCfsaudTc(Tgn )acuuucCfuAfuguu ususa	2407	UAAAACAUAGG AAAGUAGAAUG G	2733
AD- 1784415.1	asusgacuCfuCf AfGfgacaaagcs asa	2067	VPusUfsgcdTu(Tgn )guccugAfgAfguca uscsc	2408	UGAUGACUCUC AGGACAAAGCA G	2734
AD- 1784416.1	asgscuagUfuAf AfGfgcaaaucas gsa	2068	VPusCfsugaUfuugc cuuAfaCfuagcuscs a	2409	UGAGCUAGUU AAGGCAAUCA GG	2735
AD- 1784417.1	cscsugagGfaUf CfCfucaacaas gsa	2069	VPusCfsaudTg(Tgn )ugaggaUfcCfucag gsgsa	2410	UCCUGAGGAU CCUCAACAAUG G	2736

AD-1784418.1	gsgsuuggUfgCf UfUfuguuuaug sgsa	2070	VPusCfscauAfaaca aagCfaCfcaaccsasg	2411	CUGGUUGGUG CUUUGUUUAU GGU	2737
AD-1784419.1	asgsguauUfuU fUfUfugaaggu usgsa	2071	VPusCfsaacCfuuca aaaAfaAfuaccusas g	2412	CUAGGUUUUU UUUUGAAGGU UGG	2738
AD-1784420.1	usgsaaucUfuCf GfGfguguuucc scsa	2072	VPusGfsggaAfacac ccgAfaGfauucasus u	2413	AAUGAAUCUUC GGGUGUUUCCC U	2739
AD-1784421.1	usgsaaucUfuCf GfGfguguuucc scsa	2072	VPusGfsggdAa(Ag n)cacccgAfaGfauu casusu	2414	AAUGAAUCUUC GGGUGUUUCCC U	2739
AD-1784422.1	usasguagUfuU fUfUfcuguaaca scsa	2073	VPusGfsuguUfaca gaaaAfaCfuacuasc sc	2415	GGUAGUAGUU UUUCUGUAACA CA	2740
AD-1784423.1	usasguagUfuU fUfUfcuguaaca scsa	2073	VPusGfsugdTu(Ag n)cagaaaAfaCfuac uascsc	2416	GGUAGUAGUU UUUCUGUAACA CA	2740
AD-1784424.1	gsusuugaUfgAf CfUfcucaggacs asa	2074	VPusUfsgudCc(Tgn )gagaguCfaUfcaaa csusc	2417	GAGUUUGAUG ACUCUCAGGAC AA	2741
AD-1784425.1	asasugaaUfcUf UfCfggguguuu scsa	2075	VPusGfsaadAc(Ag n)cccgaagfaUfuca uusasu	2418	AUAAUGAAUCU UCGGGUGUUU CC	2742
AD-1784426.1	csasaauaAfuGf AfAfucucgggs usa	2076	VPusAfscccGfaaga uucAfuUfauuugsgs a	2419	UCCAAUAAUG AAUCUUCGGGU G	2743
AD-1784427.1	ususuguuCfaCf AfGfcauguaggs gsa	2077	VPusCfscuAfcaug cugUfgAfacaaasgs u	2420	ACUUUGUUCAC AGCAUGUAGGG U	2744
AD-1784428.1	asusugugCfuCf AfAfggaaccas	2078	VPusAfsugdGg(Tg n)uccuugAfgCfaca	2421	GGAUUGUGCU CAAGGAACCCA	2745

	usa		auscsc		UC	
AD-1784429.1	gsusugguGfcUf UfUfguuuaugg susa	2079	VPusAfsccaUfaaac aaaGfcAfccaacscsa	2422	UGGUUGGUGC UUUGUUUAUG GUA	2746
AD-1784430.1	gsasaucuUfcGf GfGfuguuuccs usa	2080	VPusAfsgggAfaaca cccGfaAfgauucsas u	2423	AUGAAUCUUCG GGUGUUUCCCU U	2747
AD-1784431.1	gsgsuaguAfgUf UfUfuucuguaa scsa	2081	VPusGfsuudAc(Ag n)gaaaaCfuAfcua ccsas	2424	AUGGUAGUAG UUUUUCUGUA ACA	2748
AD-1784432.1	asgsaacaGfgCf AfAfaucuaagcs usa	2082	VPusAfsghuUfuga uuugCfcUfguucus usc	2425	GAAGAACAGGC AAAUCAAGCU U	2749
AD-1784433.1	asgsaacaGfgCf AfAfaucuaagcs usa	2082	VPusAfsghdTu(Tgn )gauuugCfcUfguuc ususc	2426	GAAGAACAGGC AAAUCAAGCU U	2749
AD-1784434.1	asasaauaGfuCf AfUfgauucuau sgsa	2083	VPusCfsauaGfaauc augAfcUfauuuusas c	2427	GUAAAUAUGUC AUGAUUCUAU GU	2750
AD-1784435.1	ascsgggCfGfUf UfCfuagguauu susa	2084	VPusAfsaaAfccua gaaCfGfcccaguscsc	2428	GGACUGGCCGU UCUAGGUUU UU	2751
AD-1784436.1	cscscugaGfgAf UfCfcucaacaas usa	2085	VPusAfsuudGu(Tg n)gaggauCfcUfcag ggsasa	2429	UCCCCUGAGGA UCCUCAACAAU G	2752
AD-1784437.1	gscsugguUfgGf UfGfcuuuguuu sasa	2086	VPusUfsaaaCfaaag cacCfaAfccagcscsa	2430	UGGCUGGUUG GUGCUUUGUU UAU	2753
AD-1784438.1	csasgaaaGfuUf GfUfugaugugc susa	2087	VPusAfsghdAc(Agn )ucaacaAfcUfuucu gsasa	2431	UUCAGAAAGUU GUUGAUGUGC UG	2754
AD-	ascsuuacUfuCf	2088	VPusCfscacGfagga	2432	UCACUAACUUC	2755

1784439.1	GfAfuccucgugs gsa		ucgAfaGfuuagusgs a		GAUCCUCGUGG C	
AD- 1784440.1	csesuucaGfaAf AfGfuuguugau sgsa	2089	VPusCfsaucAfaciaa cuuUfcUfgaaggscs c	2433	GGCCUUCAGAA AGUUGUUGAU GU	2756
AD- 1784441.1	usgsagcaCfuGf GfCfauaaggacs usa	2090	VPusAfsjudCc(Tgn )uaugccAfgUfgcuc asgsg	2434	CCUGAGCACUG GCAUAAGGACU U	2757
AD- 1784442.1	csusaguuAfaGf GfCfaaaucaggs usa	2091	VPusAfsccdTg(Agn )uuugccUfuAfacua gscsu	2435	AGCUAGUUAAG GCAAAUCAGGU A	2758
AD- 1784443.1	csusgaggAfuCf CfUfcaacaugs gsa	2092	VPusCfscauUfguug aggAfuCfcucagsgs g	2436	CCCUGAGGAUC CUCAACAAUGG U	2759
AD- 1784444.1	gsusuauGfgU fAfGfuaguuuu uscscsa	2093	VPusGfsaaaAfacua cuaCfcAfuaaacsas a	2437	UUGUUUAUGG UAGUAGUUUU UCU	2760
AD- 1784445.1	usgsugacCfuGf GfAfuugugcucs asa	2094	VPusUfsgadGc(Ag n)caauccAfgGfuca cascsa	2438	UGUGUGACCU GGAUUGUGCU CAA	2761
AD- 1784446.1	ascsaucgAfcAf CfUfcuacagcs csa	2095	VPusGfsgcdTg(Tgn )augaguGfuCfgaug uscscsa	2439	UGACAUCGACA CUCAUACAGCC A	2762
AD- 1784447.1	gsasuuguGfcUf CfAfaggaaccs asa	2096	VPusUfsggdGu(Tg n)ccuugaGfcAfcaa uscscsa	2440	UGGAUUGUGC UCAAGGAACCC AU	2763
AD- 1784448.1	uscscsaucAfgCf CfAfaguaugacs csa	2097	VPusGfsgudCa(Tg n)acuuggCfuGfuau gasgsu	2441	ACUCAUACAGC CAAGUAUGACC C	2764
AD- 1784449.1	usasaaauAfgUf CfAfugauucuas usa	2098	VPusAfsuagAfauca ugaCfuAfuuuuascs c	2442	GGUAAAUAAGU CAUGAUUCUAU G	2765

AD-1784450.1	usasaauAfgUf CfAfugauucuas usa	2098	VPusAfsuadGa(Ag n)ucaugaCfuAfuuu uascsc	2443	GGUAAAAUAGU CAUGAUUCUAU G	2765
AD-1784451.1	gsusgcucAfaGf GfAfaccaucas gsa	2099	VPusCfsugaUfgggu uccUfuGfagcacsas a	2444	UUGUGCUCUAG GAACCCAUCAG C	2766
AD-1784452.1	csgsaagaAfcUf GfAfugguggacs asa	2100	VPusUfsgudCc(Ag n)ccaugaGfuUfcuu csgsg	2445	CCCGAAGAACU GAUGGUGGACA A	2767
AD-1784453.1	asasuaaaAfuGf UfGfaagacuags asa	2101	VPusUfscudAg(Tg n)cuucacAfuUfuua uusasg	2446	CUAAUAAAAUG UGAAGACUAGA C	2768
AD-1784454.1	gsgscuggUfuGf GfUfgcuuuguu susa	2102	VPusAfsaacAfaagc accAfaCfcagccsasc	2447	GUGGCUGGUU GGUGCUUUGU UUA	2769
AD-1784455.1	ususguucAfcAf GfCfauguagggs usa	2103	VPusAfscccUfacau gcuGfuGfaacaasas g	2448	CUUUGUUCACA GCAUGUAGGG UG	2770
AD-1784456.1	ususcaaaUfaAf GfAfuggucccas usa	2104	VPusAfsugdGg(Ag n)ccaucuUfaUfuug aasgsg	2449	CCUUCAAAUA GAUGGUCCCAU A	2771
AD-1784457.1	ususuaaaAfcAf UfAfggaaaguas gsa	2105	VPusCfsuacUfuucc uauGfuUfuuaasas sg	2450	CUUUUAAAACA UAGGAAAGUAG A	2772
AD-1784458.1	ususguuuAfuG fGfUfaguaguu ususa	2106	VPusAfsaaaCfuacu accAfuAfaacaasas g	2451	CUUUGUUUAU GGUAGUAGUU UUU	2773
AD-1784459.1	ususguuuAfuG fGfUfaguaguu ususa	2106	VPusAfsaadAc(Tgn )acuaccAfuAfaaca asasg	2452	CUUUGUUUAU GGUAGUAGUU UUU	2773
AD-1784460.1	gscsuaguUfaAf GfGfcaaaucags	2107	VPusCfscugAfuuuug ccuUfaAfcuagcsus	2453	GAGCUAGUUAA GGCAAUCAGG	2774

	gsa		c		U	
AD-1784461.1	gsusaaaaUfaGf UfCfaugauucu sasa	2108	VPusUfsagaAfucau gacUfaUfuuuacscs u	2454	AGGUAAAAUAG UCAUGAUUCUA U	2775
AD-1784462.1	gsusaaaaUfaGf UfCfaugauucu sasa	2108	VPusUfsagdAa(Tg n)caugacUfaUfuuu acscsu	2455	AGGUAAAAUAG UCAUGAUUCUA U	2775
AD-1784463.1	gsascuggCfcGf UfUfcuagguau susa	2109	VPusAfsauaCfcuag aacGfgCfcagucscs a	2456	UGGACUGGCCG UUCUAGGUAU UU	2776
AD-1784464.1	uscsagccAfcUf GfAfagaacaggs csa	2110	VPusGfscddTg(Tgn )ucuucaGfuGfgcug asgsc	2457	GCUCAGCCACU GAAGAACAGGC A	2777
AD-1784465.1	usgsgaauGfuG fUfGfaccuggau susa	2111	VPusAfsaudCc(Ag n)ggucacAfcAfuuc casgsa	2458	UCUGGAAUGU GUGACCUGGAU UG	2778
AD-1784466.1	uscsacagCfaUf GfUfagggugau sgsa	2112	VPusCfsaucAfcccu acaUfgCfugugasas c	2459	GUUCACAGCAU GUAGGGUGAU GA	2779
AD-1784467.1	usascagcCfaAf GfUfaugaccus usa	2113	VPusAfsagdGg(Tg n)cauacuUfgGfcug uasusg	2460	CAUACAGCCAA GUAUGACCCUU C	2780
AD-1784468.1	csusgagcAfcUf GfGfcauaaggas csa	2114	VPusGfsuccUfuau gccaGfuGfcucagsg su	2461	ACCUGAGCACU GGCAUAAGGAC U	2781
AD-1784469.1	csusgagcAfcUf GfGfcauaaggas csa	2114	VPusGfsucdCu(Tg n)augccaGfuGfcuc agsgsu	2462	ACCUGAGCACU GGCAUAAGGAC U	2781
AD-1784470.1	gscsucaaGfgAf AfCfcaucagcs gsa	2115	VPusCfsgcdTg(Agn )uggguuCfcUfugag csasc	2463	GUGCUCAAGGA ACCCAUCAGCG U	2782
AD-	ususcuggAfaUf	2116	VPusCfscadGg(Tgn	2464	UCUUCUGGAU	2783

1784471.1	GfUfgugaccugs gsa		)cacacaUfuCfcaga asgsa		GUGUGACCUG GA	
AD- 1784472.1	usasaauuGfaG fCfUfaguuaagg scsa	2117	VPusGfscuuUfaacu agcUfcAfauuuasus c	2465	GAUAAAUUGAG CUAGUUAAGGC A	2784
AD- 1784473.1	usasuuuuUfuU fGfAfgguuggc sasa	2118	VPusUfsgcdCa(Ag n)ccuucaAfaAfaaa uascsc	2466	GGUAUUUUUUU UGAAGGUUGG CAG	2785
AD- 1784474.1	usasauuaGfaG fUfUfgugauaca sgsa	2119	VPusCfsuguAfucac aacUfcUfaauuasus a	2467	UAUAAUUAGA GUUGUGAUAC AGA	2786
AD- 1784475.1	usasauuaGfaG fUfUfgugauaca sgsa	2119	VPusCfsugdTa(Tgn )cacaacUfcUfaauu asusa	2468	UAUAAUUAGA GUUGUGAUAC AGA	2786
AD- 1784476.1	usgsacucUfcAf GfGfacaagcas gsa	2120	VPusCfsugcUfuug uccuGfaGfagucasu sc	2469	GAUGACUCUCA GGACAAAGCAG U	2787
AD- 1784477.1	usgsacucUfcAf GfGfacaagcas gsa	2120	VPusCfsugdCu(Tgn )uguccuGfaGfaguc asusc	2470	GAUGACUCUCA GGACAAAGCAG U	2787
AD- 1784478.1	csasuacaGfcCf AfAfguaugaccs csa	2121	VPusGfsggdTc(Agn )uacuugGfcUfguau gsasg	2471	CUCAUACAGCC AAGUAUGACCC U	2788
AD- 1784479.1	gsusauuuUfuU fUfGfaagguugg scsa	2122	VPusGfscuaAfccuu caaAfaAfaauacscs u	2472	AGGUUUUUUU UUGAAGGUUG GCA	2789
AD- 1784480.1	csascagcAfuGf UfAfgggugaugs asa	2123	VPusUfscadTc(Agn )cccuacAfuGfcugu gsasa	2473	UUCACAGCAUG UAGGGUGAUG AG	2790
AD- 1784481.1	usasuaauUfaG fAfGfuugugaua scsa	2124	VPusGfsuadTc(Ag n)caacucUfaAfuaa uasasc	2474	GUUAUAAUUA GAGUUGUGAU ACA	2791

AD-1784482.1	gsasuuuuGfgGfAfAfacgugugcsasa	2125	VPusUfsgcdAc(Agn)gcuuucCfcAfaaaucscsc	2475	GGGAUUUUGG GAAAGCUGUGC AG	2792
AD-1784483.1	usasaaacAfaAfGfGfgcaagagusgsa	2126	VPusCfsacdTc(Tgn)ugcccuUfuGfuuuu asasu	2476	AUUAAAACAAA GGGCAAGAGUG C	2793
AD-1784484.1	uscsaaggAfaCfCfCfaucagcguscsa	2127	VPusGfsacgCfugau gggUfuCfcuugasgsc	2477	GCUCAAGGAAC CCAUCAGCGUC A	2794
AD-1784485.1	uscsaaggAfaCfCfCfaucagcguscsa	2127	VPusGfsacdGc(Tgn)gaugggUfuCfcuug asgsc	2478	GCUCAAGGAAC CCAUCAGCGUC A	2794
AD-1784486.1	uscsagaaAfgUfUfGfuugaugugscsa	2128	VPusGfscacAfucaaaCfuUfucugasasg	2479	CUUCAGAAAGU UGUUGAUGUG CU	2795
AD-1784487.1	uscsagaaAfgUfUfGfuugaugugscsa	2128	VPusGfscadCa(Tgn)caacaaCfuUfucugasasg	2480	CUUCAGAAAGU UGUUGAUGUG CU	2795
AD-1784488.1	cscsaaauAfaUfGfAfaucucggsgsa	2129	VPusCfscggAfagauucaUfuAfuuuuggsas u	2481	AUCCAAAUAUU GAAUCUUCGGG U	2796
AD-1784489.1	asgscaugUfaGfGfGfugaugagcsasa	2130	VPusUfsgcdTc(Agn)ucacccUfaCfaugcusg usgsu	2482	ACAGCAUGUAG GGUGAUGAGCA C	2797
AD-1784490.1	gsasuaaaUfuGfAfGfcuaguuaasgsa	2131	VPusCfsuuaAfcuagcucAfaUfuuaucsus u	2483	AAGAUAAAUUG AGCUAGUUAAG G	2798
AD-1784491.1	csuscagcCfaCfUfGfaagaacagsgsa	2132	VPusCfscugUfucuu cagUfgGfcugagscs u	2484	AGCUCAGCCAC UGAAGAACAGG C	2799
AD-1784492.1	csuscagcCfaCfUfGfaagaacags	2132	VPusCfscudGu(Tgn)cuucagUfgGfcug	2485	AGCUCAGCCAC UGAAGAACAGG	2799

	gsa		agscsu		C	
AD-1784493.1	csasgcauGfuAf GfGfgugaugag scsa	2133	VPusGfscudCa(Tgn )cacccuAfcAfugcug susg	2486	CACAGCAUGUA GGGUGAUGAG CA	2800
AD-1784494.1	asusaaugAfaUf CfUfucgggugus usa	2134	VPusAfsacaCfccga agaUfuCfauuausus u	2487	AAAUAAUGAAU CUUCGGGUGU UU	2801
AD-1784495.1	gsgsaaccCfaUf CfAfgcgucagcs asa	2135	VPusUfsgcdTg(Agn )cgcugaUfgGfguuc csusu	2488	AAGGAACCCAU CAGCGUCAGCA G	2802
AD-1784496.1	usgsuucaCfaGf CfAfuguaggus gsa	2136	VPusCfsaccCfuaca ugcUfgUfgaacasas a	2489	UUUGUUCACAG CAUGUAGGGU GA	2803
AD-1784497.1	asasacaaAfgGf GfCfaagagugcs usa	2137	VPusAfsgcdAc(Tgn )cuugccCfuUfuguu ususa	2490	UAAAACAAAGG GCAAGAGUGCU G	2804
AD-1784498.1	usgsugugAfcCf UfGfgauugugc susa	2138	VPusAfsfgcaCfaauc cagGfuCfacacasmus u	2491	AAUGUGUGACC UGGAUUGUGC UC	2805
AD-1784499.1	usgsugugAfcCf UfGfgauugugc susa	2138	VPusAfsfgcdAc(Agn )auccagGfuCfacac asusu	2492	AAUGUGUGACC UGGAUUGUGC UC	2805
AD-1784500.1	asasuaauGfaAf UfCfuucgggugs usa	2139	VPusAfsacacCfcgaa gauUfcAfuuauus g	2493	CAAUAAUGAA UCUUCGGGUG UU	2806
AD-1784501.1	asusuuuuUfuG fAfAfgguuggca sgsa	2140	VPusCfsugcCfaacc uucAfaAfaaaus c	2494	GUAUUUUUUU GAAGGUUGGCA GC	2807
AD-1784502.1	asusuuuuUfuG fAfAfgguuggca sgsa	2140	VPusCfsugdCc(Agn )accuucAfaAfaaa usasc	2495	GUAUUUUUUU GAAGGUUGGCA GC	2807
AD-	usgscucaAfgGf	2141	VPusGfscudGa(Tg	2496	UGUGCUC AAGG	2808

1784503.1	AfAfcccaucags csa		n)ggguucCfuUfgag cascsa		AACCCAUCAGC G	
AD- 1784504.1	usasaugaAfuCf UfUfcggguguu susa	2142	VPusAfsaacAfcccg aagAfuUfcuuuasus u	2497	AAUAAUGAAUC UUCGGGUGUU UC	2809
AD- 1784505.1	gsusggcuGfgUf UfGfgugcuuug susa	2143	VPusAfscaaAfgcac caaCfcAfgccacsasg	2498	CUGUGGCUGG UUGGUGCUUU GUU	2810
AD- 1784506.1	asasggaaCfcCf AfUfcagcgucas gsa	2144	VPusCfsugaCfgcug augGfgUfuccuusgs a	2499	UCAAGGAACCC AUCAGCGUCAG C	2811
AD- 1784507.1	ususaaaaCfaAf AfGfggcaagags usa	2145	VPusAfsrudCu(Tgn )gccuuUfgUfuuuu asusg	2500	CAUUA AAAACAA AGGGCAAGAGU G	2812
AD- 1784508.1	csusguggCfuGf GfUfuggugcuu susa	2146	VPusAfsaadGc(Ag n)ccaaccAfgCfcaca gscsa	2501	UGCUGUGGCU GGUUGGUGCU UUG	2813
AD- 1784509.1	csasgcucAfgCf CfAfcugaagaas csa	2147	VPusGfsuudCu(Tg n)caguggCfuGfagc ugsgsg	2502	CCCAGCUCAGC CACUGAAGAAC A	2814
AD- 1784510.1	asasauaaUfgAf AfUfcuucgggus gsa	2148	VPusCfsaccCfgaag auuCfaUfuauuusg sg	2503	CCAAAUA AUGA AUCUUCGGGU GU	2815
AD- 1784511.1	gsasauguGfuG fAfCfcuggauug susa	2149	VPusAfscaaUfccag gucAfcAfcuuucscs a	2504	UGGAAUGUGU GACCUGGAUUG UG	2816
AD- 1784512.1	csasuguaGfgGf UfGfaugagcacs usa	2150	VPusAfsrudGc(Tg n)caucacCfcUfaca ugscsu	2505	AGCAUGUAGGG UGAUGAGCACU C	2817
AD- 1784513.1	gsgsacugGfcCf GfUfucuaggua susa	2151	VPusAfsuadCc(Tgn )agaacgGfcCfagucc sasus	2506	AUGGACUGGCC GUUCUAGGUA UU	2818

AD-1784514.1	asusaaauUfgAf GfCfuaguuaags gsa	2152	VPusCfscuuAfacua gcuCfaAfuuuauscs u	2507	AGAUAUUUGA GCUAGUUAAG GC	2819
AD-1784515.1	gsasaaguUfgUf UfGfauugucug sgsa	2153	VPusCfscagCfacau caaCfaAfcuuucsus g	2508	CAGAAAGUUGU UGAUGUGCUG GA	2820
AD-1784516.1	gsasaaguUfgUf UfGfauugucug sgsa	2153	VPusCfscadGc(Agn )caucaaCfaAfcuu csusg	2509	CAGAAAGUUGU UGAUGUGCUG GA	2820
AD-1784517.1	asascaaaGfgGf CfAfgagugcus gsa	2154	VPusCfsagcAfcucu ugcCfcUfuuguusus u	2510	AAAACAAAGGG CAAGAGUGCUG A	2821
AD-1784518.1	cscsugagCfaCf UfGfgcauaaggs asa	2155	VPusUfscddTu(Agn )ugccagUfgCfucag gsusc	2511	GACCUGAGCAC UGGCAUAAGGA C	2822
AD-1784519.1	usgsauggUfgGf AfCfaacuggcgs csa	2156	VPusGfscgdCc(Agn )guugucCfaCfcauc asgsu	2512	ACUGAUGGUG GACAACUGGCG CC	2823
AD-1784520.1	ascsaaagGfgCf AfAfgagugcugs asa	2157	VPusUfscadGc(Ag n)cucuugCfcCfuuu gususu	2513	AAACAAAGGGC AAGAGUGCUGA C	2824
AD-1784521.1	ascsggacCfuGf AfGfcacuggcas usa	2158	VPusAfsugdCc(Ag n)gugcucAfgGfucc gususg	2514	CAACGGACCUG AGCACUGGCAU A	2825
AD-1784522.1	usgsggaaAfgCf UfGfugcagcaas csa	2159	VPusGfsuudGc(Tg n)gcacagCfuUfucc casasa	2515	UUUGGGAAAG CUGUGCAGCAA CC	2826
AD-1784523.1	asascccaUfcAf GfCfugcagcags csa	2160	VPusGfscudGc(Tg n)gacgcuGfaUfggg uuscs	2516	GGAACCAUCA GCGUCAGCAGC G	2827
AD-1784524.1	asgscucaGfcCf AfCfugaagaacs	2161	VPusUfsgudTc(Tgn )ucagugGfcUfgagc	2517	CCAGCUCAGCC ACUGAAGAACA	2828

	asa		usgsg		G	
AD-1784525.1	ususugaAfgGf UfUfggcagcgcs usa	2162	VPusAfsgcdGc(Tgn )gccaacCfuUfcaaa asasa	2518	UUUUUUGAAG GUUGGCAGCGC UA	2829
AD-1784526.1	gsusaugaCfcCf UfUfcccugaags csa	2163	VPusGfscudTc(Agn )gggaagGfgUfcaua csusu	2519	AAGUAUGACCC UUCCCUGAAGC C	2830
AD-1784527.1	csusacccAfgGf CfUfcacugaccs asa	2164	VPusUfsggdTc(Agn )gugagcCfuGfggua gsgsu	2520	ACCUACCCAGG CUCACUGACCA C	2831
AD-1784528.1	ascscagGfcUf CfAfcugaccacs csa	2165	VPusGfsgudGg(Tg n)cagugaGfcCfugg gusag	2521	CUACCCAGGCU CACUGACCACC C	2832
AD-1784529.1	asusggacUfgGf CfCfguucuaggs usa	2166	VPusAfscuAfgaac ggcCfaGfuccauscs a	2522	UGAUGGACUG GCCGUUCUAGG UA	2833
AD-1784530.1	ascscugaGfcAf CfUfggcuaaags gsa	2167	VPusCfscuuAfugcc aguGfcUfcagguscs c	2523	GGACCUGAGCA CUGGCAUAAGG A	2834
AD-1784531.1	cscsaucaGfcGf UfCfagcagcgas gsa	2168	VPusCfsucgCfugcu gacGfcUfgaugsgs u	2524	ACCCAUCAGCG UCAGCAGCGAG C	2835
AD-1784532.1	usgsgacuGfgCf CfGfuucuaggus asa	2169	VPusUfsacdCu(Ag n)gaacggCfcAfgucc asusc	2525	GAUGGACUGGC CGUUCUAGGUA U	2836
AD-1784533.1	ususuggGfaAf AfGfcugugcags csa	2170	VPusGfscudGc(Ag n)cagcuUfcCfcaa aasusc	2526	GAUUUUGGGA AAGCUGUGCAG CA	2837
AD-1784534.1	csusgaugGfaCf UfGfgccguucus asa	2171	VPusUfsagaAfcggc cagUfcCfaucagsgs u	2527	ACCUGAUGGAC UGCCGUUCUA G	2838
AD-	ascscuacCfcAf	2172	VPusGfsucdAg(Tg	2528	GGACCUACCCA	2839

1784535.1	GfGfcucacugas csa		n)gagccuGfgGfuag guscsc		GGCUCACUGAC C	
AD- 1784536.1	gsgsaccuAfcCf CfAfggcucacus gsa	2173	VPusCfsagdTg(Agn )gccuggGfuAfgguc csasg	2529	CUGGACCUACC CAGGCUCACUG A	2840
AD- 1784537.1	gsasuggaCfuGf GfCfcguucuags gsa	2174	VPusCfscuaGfaacg gccAfgUfccaucsasg	2530	CUGAUGGACUG GCCGUUCUAGG U	2841
AD- 1784538.1	asasgguuGfgCf AfGfgcuaaacs csa	2175	VPusGfsgudTu(Ag n)gcgucGfcAfaccu uscsa	2531	UGAAGGUUGG CAGCGCUAAAC CG	2842
AD- 1784539.1	usgsauggAfcUf GfGfccguucuas gsa	2176	VPusCfsuagAfacgg ccaGfuCfcaucasgs g	2532	CCUGAUGGACU GGCCGUUCUAG G	2843
AD- 1784540.1	asascugaUfgGf UfGfgacaacugs gsa	2177	VPusCfscagUfuguc cacCfaUfcaguuscs u	2533	AGAACUGAUGG UGGACAACUGG C	2844
AD- 1784541.1	asascugaUfgGf UfGfgacaacugs gsa	2177	VPusCfscadGu(Tgn )guccacCfaUfcagu uscsu	2534	AGAACUGAUGG UGGACAACUGG C	2844
AD- 1784542.1	ascsaacuGfcUf GfUfggcugguu sgsa	2178	VPusCfsaacCfagcc acaGfcAfguugusgs u	2535	ACACAACUGCU GUGGCUGGUU GG	2845
AD- 1784543.1	ascsaacuGfcUf GfUfggcugguu sgsa	2178	VPusCfsaadCc(Agn )gccacaGfcAfguug usgsu	2536	ACACAACUGCU GUGGCUGGUU GG	2845
AD- 1784544.1	csasacggAfcCf UfGfagcacuggs csa	2179	VPusGfscddAg(Tgn )gcucagGfuCfcguu gsusg	2537	CACAACGGACC UGAGCACUGGC A	2846
AD- 1784545.1	csasacugCfuGf UfGfgcugguug sgsa	2180	VPusCfscaaCfcagc cacAfgCfaguugsus g	2538	CACAACUGCUG UGGCUGGUUG GU	2847

AD-1784546.1	ascugauGfgUf GfGfacaacuggs csa	2181	VPusGfscddAg(Tgn )uguccaCfcAfucag ususc	2539	GAACUGAUGG UGGACAACUGG CG	2848
AD-1784547.1	csusgcugUfgGf CfUfgguuggugs csa	2182	VPusGfscacCfaacc agcCfaCfagcagsus u	2540	AACUGCUGUGG CUGGUUGGUG CU	2849

**Таблица 9. Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК к СА2 для модификации посредством С16**

Название дуплекса	Смысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_000067.3	Антисмысловая последовательность от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_00067.3
AD-1962343	ACCUGAGCACUG GCAUAAGGU	2850	111-131	ACCUUAUGCCAG UGCUCAGGUCC	3210	109-131
AD-1962345	CUGAGCACUGGC AUAAGGACU	2851	113-133	AGUCCUUAUGCC AGUGCUCAGGU	3211	111-133
AD-1962360	UGACAUCGACAC UCAUACAGU	2852	168-188	ACUGUAUGAGUG UCGAUGUCAAC	3212	166-188
AD-1962369	CACUCAUACAGC CAAGUAUGU	2853	177-197	ACAUACUUGGCU GUAUGAGUGUC	3213	175-197
AD-1962370	ACUCAUACAGCC AAGUAUGAU	2854	178-198	AUCAUACUUGGC UGUAUGAGUGU	3214	176-198
AD-1962371	CUCAUACAGCCA AGUAUGACU	2855	179-199	AGUCAUACUUGG CUGUAUGAGUG	3215	177-199
AD-1962380	CCAAGUAUGACC CUUCCCUGU	2856	188-208	ACAGGGAAGGGU CAUACUUGGCU	3216	186-208
AD-1962416	CUGAGGAUCCUC AACAAUGGU	2857	244-264	ACCAUUGUUGAG GAUCCUCAGGG	3217	242-264
AD-1962417	UGAGGAUCCUCA ACAAUGGUU	2858	245-265	AACCAUUGUUGA GGAUCCUCAGG	3218	243-265
AD-1962418	GAGGAUCCUCAA CAAUGGUCU	2859	246-266	AGACCAUUGUUG AGGAUCCUCAG	3219	244-266

AD- 1962439	UGC UUUCAACG UGGAGUUUGU	2860	267-287	ACAAACUCCACG UUGAAAGCAUG	3220	265- 287
AD- 1962440	GCUUUCAACGU GGAGUUUGAU	2861	268-288	AUCAAACUCCAC GUUGAAAGCAU	3221	266- 288
AD- 1962441	CUUUCAACGUG GAGUUUGAUU	2862	269-289	AAUCAAACUCCA CGUUGAAAGCA	3222	267- 289
AD- 1962442	UUUCAACGUGG AGUUUGAUGU	2863	270-290	ACAUCAAACUCC ACGUUGAAAGC	3223	268- 290
AD- 1962451	GGAGUUUGAUG ACUCUCAGGU	2864	279-299	ACCUGAGAGUCA UCAAACUCCAC	3224	277- 299
AD- 1962460	UGACUCUCAGGA CAAAGCAGU	2865	288-308	ACUGCUUUGUCC UGAGAGUCAUC	3225	286- 308
AD- 1962557	AACUUCACUUGG UUCACUGGU	2866	425-445	ACCAGUGAACCA AGUGAAGUUCU	3226	423- 445
AD- 1962597	CUGAUGGACUG GCCGUUCUAU	2867	485-505	AUAGAACGGCCA GUCCAUCAGGU	3227	483- 505
AD- 1962598	UGAUGGACUGG CCGUUCUAGU	2868	486-506	ACUAGAACGGCC AGUCCAUCAGG	3228	484- 506
AD- 1962599	GAUGGACUGGC CGUUCUAGGU	2869	487-507	ACCUAGAACGGC CAGUCCAUCAG	3229	485- 507
AD- 1962600	AUGGACUGGCC GUUCUAGGUU	2870	488-508	AACCUAGAACGG CCAGUCCAUCA	3230	486- 508
AD- 1962603	GACUGGCCGUUC UAGGUAUUU	2871	491-511	AAAUACCUAGAA CGGCCAGUCCA	3231	489- 511
AD- 1962604	ACUGGCCGUUCU AGGUAUUUU	2872	492-512	AAAAUACCUAGA ACGGCCAGUCC	3232	490- 512
AD- 1962605	CUGGCCGUUCUA GGUAUUUUU	2873	493-513	AAAAAUACCUAG AACGGCCAGUC	3233	491- 513
AD- 1962606	UGGCCGUUCUA GGUAUUUUUU	2874	494-514	AAAAAAUACCUA GAACGGCCAGU	3234	492- 514
AD- 1962607	GGCCGUUCUAG GUAUUUUUUU	2875	495-515	AAAAAAAUACCU AGAACGGCCAG	3235	493- 515

AD- 1962608	GCCGUUCUAGG UAUUUUUUUU	2876	496-516	AAAAAAAAUACC UAGAACGGCCA	3236	494- 516
AD- 1962609	CCGUUCUAGGU AUUUUUUUGU	2877	497-517	ACAAAAAAAAUAC CUAGAACGGCC	3237	495- 517
AD- 1962610	CGUUCUAGGUA UUUUUUUGAU	2878	498-518	AUCAAAAAAUA CCUAGAACGGC	3238	496- 518
AD- 1962611	GUUCUAGGUAU UUUUUUGAAU	2879	499-519	AUUCAAAAAAAU ACCUAGAACGG	3239	497- 519
AD- 1962612	UUCUAGGUAUU UUUUUGAAGU	2880	500-520	ACUUCAAAAAA UACCUAGAACG	3240	498- 520
AD- 1962613	UCUAGGUAUUU UUUUGAAGGU	2881	501-521	ACCUUCAAAAAA AUACCUAGAAC	3241	499- 521
AD- 1962615	UAGGUAUUUUU UUGAAGGUUU	2882	503-523	AAACCUUCAAAA AAAUACCUAGA	3242	501- 523
AD- 1962616	AGGUAUUUUUU UGAAGGUUGU	2883	504-524	ACAACCUUCAAA AAAAUACCUAG	3243	502- 524
AD- 1962617	GGUAUUUUUUU GAAGGUUGGU	2884	505-525	ACCAACCUUCA AAAAUACCUA	3244	503- 525
AD- 1962618	GUAUUUUUUUG AAGGUUGGCU	2885	506-526	AGCCAACCUUCA AAAAAUACCU	3245	504- 526
AD- 1962620	AUUUUUUUGAA GGUUGGCAGU	2886	508-528	ACUGCCAACCUU CAAAAAAUAC	3246	506- 528
AD- 1962648	CGGGCCUUCAGA AAGUUGUUU	2887	536-556	AAACAACUUUCU GAAGGCCCGGU	3247	534- 556
AD- 1962649	GGGCCUUCAGAA AGUUGUUGU	2888	537-557	ACAACAACUUUC UGAAGGCCCGG	3248	535- 557
AD- 1962650	GGCCUUCAGAAA GUUGUUGAU	2889	538-558	AUCAACAACUUU CUGAAGGCCCG	3249	536- 558
AD- 1962652	CCUUCAGAAAGU UGUUGAUGU	2890	540-560	ACAUCAACAACU UUCUGAAGGCC	3250	538- 560
AD- 1962653	CUUCAGAAAGU UGUUGAUGUU	2891	541-561	AACAUCAACAAC UUUCUGAAGGC	3251	539- 561

AD- 1962655	UCAGAAAGUUG UUGAUGUGCU	2892	543-563	AGCACAUCAACA ACUUUCUGAAG	3252	541- 563
AD- 1962658	GAAAGUUGUUG AUGUGCUGGU	2893	546-566	ACCAGCACAUCA ACAACUUUCUG	3253	544- 566
AD- 1962678	AUUCCAUAUAAA CAAAGGGCU	2894	566-586	AGCCCUUUGUUU UAAUGGAAUCC	3254	564- 586
AD- 1962688	AACAAAGGGCAA GAGUGCUGU	2895	576-596	ACAGCACUCUUG CCCUUUGUUUU	3255	574- 596
AD- 1962701	AGUGCUGACUU CACUAACUUU	2896	589-609	AAAGUUAGUGAA GUCAGCACUCU	3256	587- 609
AD- 1962703	UGCUGACUUCAC UAACUUCGU	2897	591-611	ACGAAGUUAGUG AAGUCAGCACU	3257	589- 611
AD- 1962705	CUGACUUCACUA ACUUCGAUU	2898	593-613	AAUCGAAGUUAG UGAAGUCAGCA	3258	591- 613
AD- 1962706	UGACUUCACUAA CUUCGAUCU	2899	594-614	AGAUCGAAGUUA GUGAAGUCAGC	3259	592- 614
AD- 1962707	GACUUCACUAAC UUCGAUCCU	2900	595-615	AGGAUCGAAGUU AGUGAAGUCAG	3260	593- 615
AD- 1962712	CACUAACUUCGA UCCUCGUGU	2901	600-620	ACACGAGGAUCG AAGUUAGUGAA	3261	598- 620
AD- 1962713	ACUAACUUCGAU CCUCGUGGU	2902	601-621	ACCACGAGGAUC GAAGUUAGUGA	3262	599- 621
AD- 1962733	CCUCCUCCUGA AUCCUUGGU	2903	621-641	ACCAAGGAUUCA GGAAGGAGGCC	3263	619- 641
AD- 1962735	UCCUCCUGAAU CCUUGGAUU	2904	623-643	AAUCCAAGGAUU CAGGAAGGAGG	3264	621- 643
AD- 1962736	CCUCCUGAAUC CUUGGAUUU	2905	624-644	AAUCCAAGGAU UCAGGAAGGAG	3265	622- 644
AD- 1962766	CUCCUCUUCUGG AAUGUGUGU	2906	674-694	ACACACAUUCCA GAAGAGGAGGG	3266	672- 694
AD- 1962777	GAAUGUGUGAC CUGGAUUGUU	2907	685-705	AACAAUCCAGGU CACACAUUCCA	3267	683- 705

AD- 1962780	UGUGUGACCUG GAUUGUGCUU	2908	688-708	AAGCACAUAUCA GGUCACACAUU	3268	686- 708
AD- 1962795	GUGCUC AAGGA ACCCAUCAGU	2909	703-723	ACUGAUGGGUUC CUUGAGCACAA	3269	701- 723
AD- 1962799	UCAAGGAACCCA UCAGCGUCU	2910	707-727	AGACGCUGAUGG GUUCCUUGAGC	3270	705- 727
AD- 1962801	AAGGAACCCAUC AGCGUCAGU	2911	709-729	ACUGACGCUGAU GGGUUCCUUGA	3271	707- 729
AD- 1962808	CCAUCAGCGUCA GCAGCGAGU	2912	716-736	ACUCGCUGCUGA CGCUGAUGGGU	3272	714- 736
AD- 1962836	GAAAUUCCGUAA ACUUAACUU	2913	744-764	AAGUUAAGUUA CGGAAUUUCA	3273	742- 764
AD- 1962837	AAAUUCCGUAAA CUUAACUUU	2914	745-765	AAAGUUAAGUUU ACGGAAUUUCA	3274	743- 765
AD- 1962842	CCGUAAACUUA CUUCA AUGU	2915	750-770	ACAUUGAAGUUA AGUUUACGGAA	3275	748- 770
AD- 1962843	CGUAAACUUAAC UUCA AUGGU	2916	751-771	ACCAUUGAAGUU AAGUUUACGGAA	3276	749- 771
AD- 1962860	AACUGAUGGUG GACAACUGGU	2917	788-808	ACCAGUUGUCCA CCAUCAGUUCU	3277	786- 808
AD- 1962885	CUCAGCCACUGA AGAACAGGU	2918	815-835	ACCUGUUCUUCA GUGGCUGAGCU	3278	813- 835
AD- 1962897	AGAACAGGCAAA UCAAGCUU	2919	827-847	AAGCUUUGAUUU GCCUGUUCUUC	3279	825- 847
AD- 1962902	AGGCAAUCAA GCUUCCUUU	2920	832-852	AAAGGAAGCUUU GAUUUGCCUGU	3280	830- 852
AD- 1962910	CAAAGCUUCCUU CAAUAAGU	2921	840-860	ACUUAUUUGAAG GAAGCUUUGAU	3281	838- 860
AD- 1962911	AAAGCUUCCUUC AAUAAGAU	2922	841-861	AUCUUAUUUGAA GGAAGCUUUGA	3282	839- 861
AD- 1962912	AAGCUUCCUUCA AAUAAGAUU	2923	842-862	AAUCUUAUUUGA AGGAAGCUUUG	3283	840- 862

AD- 1962913	AGCUUCCUCAA AUAAGAUGU	2924	843-863	ACAUCUUAUUUG AAGGAAGCUUU	3284	841- 863
AD- 1962914	GCUUCCUCAA UAAGAUGGU	2925	844-864	ACCAUCUUAUUU GAAGGAAGCUU	3285	842- 864
AD- 1962941	GUCUGUAUCCAA AUA AUGAAU	2926	871-891	AUUCAUUAUUUG GAUACAGACUA	3286	869- 891
AD- 1962945	GUAUCCAAUAA UGAAUCUUU	2927	875-895	AAAGAUUCAUUA UUUGGAUACAG	3287	873- 895
AD- 1962947	AUCCAAUAAUG AAUCUUCGU	2928	877-897	ACGAAGAUUCAU UAUUUGGAUAC	3288	875- 897
AD- 1962948	UCCAAUAAUGA AUCUUCGGU	2929	878-898	ACCGAAGAUUCA UUUUUGGAUA	3289	876- 898
AD- 1962949	CCAAUAAUGAA UCUUCGGGU	2930	879-899	ACCCGAAGAUUC AUUAUUUGGAU	3290	877- 899
AD- 1962950	CAAUAAUGAAU CUUCGGGUU	2931	880-900	AACCCGAAGAUU CAUUAUUUGGA	3291	878- 900
AD- 1962951	AAUAAUGAAUC UUCGGGUGU	2932	881-901	ACACCCGAAGAU UCAUUAUUUGG	3292	879- 901
AD- 1962952	AAUAAUGAAUC UUCGGGUGUU	2933	882-902	AACACCCGAAGA UUCAUUAUUUG	3293	880- 902
AD- 1962953	AUA AUGAAUCU UCGGGUGUUU	2934	883-903	AAACACCCGAAG AUUCAUUAUUU	3294	881- 903
AD- 1962954	UAAUGAAUCU CGGGUGUUUU	2935	884-904	AAAACACCCGAA GAUUCAUUAUU	3295	882- 904
AD- 1962957	UGAAUCUUCGG GUGUUUCCCU	2936	887-907	AGGGAAACACCC GAAGAUUCAUU	3296	885- 907
AD- 1962958	GAAUCUUCGGG UGUUUCCCUU	2937	888-908	AAGGGAAACACC CGAAGAUUCAU	3297	886- 908
AD- 1962984	AAGCACAGAUCU ACCUUGGUU	2938	914-934	AACCAAGGUAGA UCUGUGCUUAG	3298	912- 934
AD- 1962985	AGCACAGAUCUA CCUUGGUGU	2939	915-935	ACACCAAGGUAG AUCUGUGCUUA	3299	913- 935

AD- 1962986	GCACAGAUCUAC CUUGGUGAU	2940	916-936	AUCACCAAGGUA GAUCUGUGCUU	3300	914- 936
AD- 1962990	AGAUCUACCUUG GUGAUUUGU	2941	920-940	ACAAAUCACCAA GGUAGAUCUGU	3301	918- 940
AD- 1963114	ACAACUGCUGUG GCUGGUUGU	2942	1039- 1059	ACAACCAGCCACA GCAGUUGUGU	3302	1037- 1059
AD- 1963115	CAACUGCUGUG GCUGGUUGGU	2943	1040- 1060	ACCAACCAGCCAC AGCAGUUGUG	3303	1038- 1060
AD- 1963118	CUGCUGUGGCU GGUUGGUGCU	2944	1043- 1063	AGCACCAACCAGC CACAGCAGUU	3304	1041- 1063
AD- 1963123	GUGGCUGGUUG GUGCUUUGUU	2945	1048- 1068	AACAAAGCACCAA CCAGCCACAG	3305	1046- 1068
AD- 1963125	GGCUGGUUGGU GCUUUGUUUU	2946	1050- 1070	AAAACAAAGCACC AACCAGCCAC	3306	1048- 1070
AD- 1963126	GCUGGUUGGUG CUUUGUUUAU	2947	1051- 1071	AUAAACAAAGCA CCAACCAGCCA	3307	1049- 1071
AD- 1963127	CUGGUUGGUGC UUUGUUUAUU	2948	1052- 1072	AAUAAACAAAGC ACCAACCAGCC	3308	1050- 1072
AD- 1963128	UGGUUGGUGCU UUGUUUAUGU	2949	1053- 1073	ACAUAAACAAAG CACCAACCAGC	3309	1051- 1073
AD- 1963129	GGUUGGUGCUU UGUUUAUGGU	2950	1054- 1074	ACCAUAAACAAA GCACCAACCAG	3310	1052- 1074
AD- 1963130	GUUGGUGCUUU GUUUUAUGGU	2951	1055- 1075	AACCAUAAACAA AGCACCAACCA	3311	1053- 1075
AD- 1963131	UUGGUGCUUUG UUUAUGGUAU	2952	1056- 1076	AUACCAUAAACA AAGCACCAACC	3312	1054- 1076
AD- 1963132	UGGUGCUUUGU UUAUGGUAGU	2953	1057- 1077	ACUACCAUAAAC AAAGCACCAAC	3313	1055- 1077
AD- 1963135	UGC UUUGUUUA UGGUAGUAGU	2954	1060- 1080	ACUACUACCAUA AACAAAGCACC	3314	1058- 1080
AD- 1963138	UUUGUUUAUGG UAGUAGUUUU	2955	1063- 1083	AAAACUACUACC AUAAACAAAGC	3315	1061- 1083

AD- 1963139	UUGUUUAUGGU AGUAGUUUUU	2956	1064- 1084	AAAAACUACUAC CAUAAACAAAG	3316	1062- 1084
AD- 1963140	GUUUUAUGGUAG UAGUUUUUCU	2957	1066- 1086	AGAAAAACUACU ACCAUAAACAA	3317	1064- 1086
AD- 1963141	UUUAUGGUAGU AGUUUUUCUU	2958	1067- 1087	AAGAAAAACUAC UACCAUAAACA	3318	1065- 1087
AD- 1963142	UUAUGGUAGUA GUUUUUUCUGU	2959	1068- 1088	ACAGAAAAACUA CUACCAUAAAC	3319	1066- 1088
AD- 1963143	UAUGGUAGUAG UUUUUCUGUU	2960	1069- 1089	AACAGAAAAACU ACUACCAUAAA	3320	1067- 1089
AD- 1963144	AUGGUAGUAGU UUUUCUGUAU	2961	1070- 1090	AUACAGAAAAAC UACUACCAUAA	3321	1068- 1090
AD- 1963148	UAGUAGUUUUU CUGUAACACU	2962	1074- 1094	AGUGUUACAGAA AAACUACUACC	3322	1072- 1094
AD- 1963202	AGAAUAAAGUAC CUUGACUUU	2963	1114- 1134	AAAGUCAAGGUA CUUUAUUCUUA	3323	1112- 1134
AD- 1963204	AAUAAAGUACCU UGACUUUGU	2964	1116- 1136	ACAAAGUCAAGG UACUUUAUUCU	3324	1114- 1136
AD- 1963205	AUAAAGUACCUU GACUUUGUU	2965	1117- 1137	AACAAAGUCAAG GUACUUUAUUC	3325	1115- 1137
AD- 1963206	UAAAGUACCUU GACUUUGUUU	2966	1118- 1138	AAACAAAGUCA GGUACUUUAUU	3326	1116- 1138
AD- 1963207	AAAGUACCUUGA CUUUGUUCU	2967	1119- 1139	AGAACAAAGUCA AGGUACUUUAU	3327	1117- 1139
AD- 1963208	AAGUACCUUGAC UUUGUUCAU	2968	1120- 1140	AUGAACAAAGUC AAGGUACUUUA	3328	1118- 1140
AD- 1963211	UACCUUGACUU UGUUCACAGU	2969	1123- 1143	ACUGUGAACAAA GUCAAGGUACU	3329	1121- 1143
AD- 1963218	ACUUUGUUCAC AGCAUGUAGU	2970	1130- 1150	ACUACAUGCUGU GAACAAAGUCA	3330	1128- 1150
AD- 1963219	CUUUGUUCACA GCAUGUAGGU	2971	1131- 1151	ACCUACAUGCUG UGAACAAAGUC	3331	1129- 1151

AD- 1963220	UUUGUUCACAG CAUGUAGGGU	2972	1132- 1152	ACCCUACAUGCU GUGAACAAAGU	3332	1130- 1152
AD- 1963221	UUGUUCACAGCA UGUAGGGUU	2973	1133- 1153	AACCCUACAUGC UGUGAACAAAG	3333	1131- 1153
AD- 1963222	UGUUCACAGCAU GUAGGGUGU	2974	1134- 1154	ACACCCUACAUG CUGUGAACAAA	3334	1132- 1154
AD- 1963225	UCACAGCAUGUA GGGUGAUGU	2975	1137- 1157	ACAUCACCCUACA UGCUGUGAAC	3335	1135- 1157
AD- 1963237	CAACGGACCUGA GCACUGGCU	2976	105-125	AGCCAGTGCUCA GGUCCGUUGUG	3336	103- 125
AD- 1963239	ACGGACCUGAGC ACUGGCAUU	2977	107-127	AAUGCCAGUGCU CAGGUCCGUUG	3337	105- 127
AD- 1963244	CCUGAGCACUGG CAUAAGGAU	2978	112-132	AUCCTUAUGCCA GUGCUCAGGUC	3338	110- 132
AD- 1963245	CUGAGCACUGGC AUAAGGACU	2979	113-133	AGUCCUTAUGCC AGUGCUCAGGU	3339	111- 133
AD- 1963246	UGAGCACUGGCA UAAGGACUU	2980	114-134	AAGUCCTUAUGC CAGUGCUCAGG	3340	112- 134
AD- 1963249	GCACUGGCAUAA GGACUCCU	2981	117-137	AGGAAGTCCUUA UGCCAGUGCUC	3341	115- 137
AD- 1963287	GACUAAAUGCU GCUUUUAAU	2982	1173- 1193	AUUAAAAGCAGC AUUUUAGUCA	3342	1171- 1193
AD- 1963288	ACUAAAUGCUG CUUUUAAU	2983	1174- 1194	AUUUAAAAGCAG CAUUUUAGUCA	3343	1172- 1194
AD- 1963289	CUAAAUGCUGC UUUUAAAAU	2984	1175- 1195	AUUUUAAAAGCA GCAUUUUAGUC	3344	1173- 1195
AD- 1963290	UAAAUGCUGC UUUUAAAACU	2985	1176- 1196	AGUUUUAAAAGC AGCAUUUUAGU	3345	1174- 1196
AD- 1963295	UGCUGCUUUUA AAACAUAGGU	2986	1181- 1201	ACCUAUGUUUUA AAAGCAGCAUU	3346	1179- 1201
AD- 1963296	GCUGCUUUUUA AACAUAGGAU	2987	1182- 1202	AUCCUAUGUUUU AAAAGCAGCAU	3347	1180- 1202

AD- 1963302	UUUAAAACAUA GGAAAGUAGU	2988	1188- 1208	ACUACUUUCCUA UGUUUUAAAAG	3348	1186- 1208
AD- 1963306	CUGUUGACAUC GACACUCAUU	2989	164-184	AAUGAGTGUCGA UGUCAACAGGG	3349	162- 184
AD- 1963308	GUUGACAUCGAC ACUCAUACU	2990	166-186	AGUATGAGUGUC GAUGUCAACAG	3350	164- 186
AD- 1963311	GACAUCGACACU CAUACAGCU	2991	169-189	AGCUGUAUGAGU GUCGAUGUCAA	3351	167- 189
AD- 1963312	ACAUCGACACUC AUACAGCCU	2992	170-190	AGGCTGTAUGAG UGUCGAUGUCA	3352	168- 190
AD- 1963314	AUCGACACUCAU ACAGCCAAU	2993	172-192	AUUGGCTGUAUG AGUGUCGAUGU	3353	170- 192
AD- 1963318	ACACUCAUACAG CCAAGUAUU	2994	176-196	AAUACUTGGCUG UAUGAGUGUCG	3354	174- 196
AD- 1963321	CUCAUACAGCCA AGUAUGACU	2995	179-199	AGUCAUACUUGG CUGUAUGAGUG	3355	177- 199
AD- 1963322	UCAUACAGCCAA GUAUGACCU	2996	180-200	AGGUCATACUUG GCUGUAUGAGU	3356	178- 200
AD- 1963323	CAUACAGCCAAG UAUGACCCU	2997	181-201	AGGGTCAUACUU GGCUGUAUGAG	3357	179- 201
AD- 1963325	UACAGCCAAGUA UGACCCUUU	2998	183-203	AAAGGGTCAUAC UUGGCUGUAUG	3358	181- 203
AD- 1963329	GCCAAGUAUGAC CCUUCUUU	2999	187-207	AAGGGAAGGGUC AUACUUGGCUG	3359	185- 207
AD- 1963375	GAUAAAUUGAG CUAGUUAAGU	3000	1236- 1256	ACUUAACUAGCU CAAUUUAUCUU	3360	1234- 1256
AD- 1963376	AUAAAUUGAGC UAGUUAAGGU	3001	1237- 1257	ACCUUAACUAGC UCAUUUAUCU	3361	1235- 1257
AD- 1963377	UAAAUUGAGCU AGUUAAGGCU	3002	1238- 1258	AGCCUUAACUAG CUCAAUUUAUC	3362	1236- 1258
AD- 1963384	GUAUGACCCUUC CCUGAAGCU	3003	192-212	AGCUTCAGGGAA GGUCAUACUU	3363	190- 212

AD- 1963386	CUGUCUGUUUC CUAUGAUCAU	3004	214-234	AUGATCAUAGGA AACAGACAGGG	3364	212- 234
AD- 1963388	GUCUGUUUCCU AUGAUCAAGU	3005	216-236	ACUUGATCAUAG GAAACAGACAG	3365	214- 236
AD- 1963389	UCUGUUUCCUA UGAUCAAGCU	3006	217-237	AGCUTGAUCAUA GGAAACAGACA	3366	215- 237
AD- 1963391	UGUUUCCUAUG AUCAAGCAAU	3007	219-239	AUUGCUTGAUCA UAGGAAACAGA	3367	217- 239
AD- 1963392	GUUUCCUAUGA UCAAGCAACU	3008	220-240	AGUUGCTUGAUC AUAGGAAACAG	3368	218- 240
AD- 1963395	UCCUAUGAUCAA GCAACUUCU	3009	223-243	AGAAGUTGCUUG AUCAUAGGAAA	3369	221- 243
AD- 1963410	AGCUAGUUAAG GCAAUCAGU	3010	1245- 1265	ACUGAUUUGCCU UAACUAGCUCA	3370	1243- 1265
AD- 1963411	GCUAGUUAAGG CAAUCAGGU	3011	1246- 1266	ACCUGAUUUGCC UUAACUAGCUC	3371	1244- 1266
AD- 1963417	UAAGGCAAUCA GGUAAAAUU	3012	1252- 1272	AAUUUUACCUGA UUUGCCUUAAC	3372	1250- 1272
AD- 1963419	AGGCAAUCAGG UAAAAUAGU	3013	1254- 1274	ACUAUUUUACCU GAUUUGCCUUA	3373	1252- 1274
AD- 1963420	GGCAAUCAGG UAAAAUAGUU	3014	1255- 1275	AACUAUUUUACC UGAUUUGCCUU	3374	1253- 1275
AD- 1963421	GCAAUCAGGUA AAAUAGUCU	3015	1256- 1276	AGACUAUUUUAC CUGAUUUGCCU	3375	1254- 1276
AD- 1963430	GUAAAAUAGUC AUGAUUCUAU	3016	1265- 1285	AUAGAAUCAUGA CUAUUUUACCU	3376	1263- 1285
AD- 1963431	UAAAAUAGUCA UGAUUCUAUU	3017	1266- 1286	AAUAGAAUCAUG ACUAUUUUACC	3377	1264- 1286
AD- 1963432	AAAAUAGUCAU GAUUCUAUGU	3018	1267- 1287	ACAUAGAAUCAU GACUAUUUUAC	3378	1265- 1287
AD- 1963437	AGUCAUGAUUC UAUGUAAUGU	3019	1272- 1292	ACAUUACAUAGA AUCAUGACUAU	3379	1270- 1292

AD- 1963438	GUCAUGAUUCU AUGUAAUGUU	3020	1273- 1293	AACAUUACAUAG AAUCAUGACUA	3380	1271- 1293
AD- 1963439	UCAUGAUUCUA UGUAAUGUAU	3021	1274- 1294	AUACAUUACUA GAAUCAUGACU	3381	1272- 1294
AD- 1963464	CCCUGAGGAUCC UCAACAAUU	3022	242-262	AAUUGUTGAGGA UCCUCAGGGAA	3382	240- 262
AD- 1963465	CCUGAGGAUCCU CAACAAUGU	3023	243-263	ACAUTGTUGAGG AUCCUCAGGGAA	3383	241- 263
AD- 1963468	GAGGAUCCUCAA CAAUGGUCU	3024	246-266	AGACCATUGUUG AGGAUCCUCAG	3384	244- 266
AD- 1963469	AGGAUCCUCAAC AAUGGUCAU	3025	247-267	AUGACCAUUGUU GAGGAUCCUCA	3385	245- 267
AD- 1963539	UGC UUCAACG UGGAGUUUGU	3026	267-287	ACAAACTCCACGU UGAAAGCAUG	3386	265- 287
AD- 1963543	UUCAACGUGGA GUUUGAUGAU	3027	271-291	AUCATCAAACUCC ACGUUGAAAG	3387	269- 291
AD- 1963545	CAACGUGGAGU UUGAUGACUU	3028	273-293	AAGUCATCAAAC UCCACGUUGAA	3388	271- 293
AD- 1963546	AACGUGGAGUU UGAUGACUCU	3029	274-294	AGAGTCAUCAA CUCCACGUUGA	3389	272- 294
AD- 1963548	CGUGGAGUUUG AUGACUCUCU	3030	276-296	AGAGAGTCAUCA AACUCCACGUU	3390	274- 296
AD- 1963550	UGGAGUUUGAU GACUCUCAGU	3031	278-298	ACUGAGAGUCAU CAAACUCCACG	3391	276- 298
AD- 1963552	GAGUUUGAUGA CUCUCAGGAU	3032	280-300	AUCCTGAGAGUC AUCAAACUCCA	3392	278- 300
AD- 1963554	GUUUGAUGACU CUCAGGACAU	3033	282-302	AUGUCCTGAGAG UCAUCAAACUC	3393	280- 302
AD- 1963557	UGAUGACUCUCA GGACAAAGU	3034	285-305	ACUUTGTCCUGA GAGUCAUCAA	3394	283- 305
AD- 1963582	UAAUUAGAGUU GUGAUACAGU	3035	1460- 1480	ACUGUAUCACAA CUCUAAUUUAUA	3395	1458- 1480

AD- 1963590	GUUGUGAUACA GAGUAUAUUU	3036	1468- 1488	AAAUUAUCUCUG UAUCACAACUC	3396	1466- 1488
AD- 1963591	UUGUGAUACAG AGUAUAUUUU	3037	1469- 1489	AAAAUAUCUCU GUAUCACAACU	3397	1467- 1489
AD- 1963592	UGUGAUACAGA GUAUAUUUCU	3038	1470- 1490	AGAAUAUACUC UGUAUCACAAC	3398	1468- 1490
AD- 1963609	AUGACUCUCAGG ACAAAGCAU	3039	287-307	AUGCTUTGUCCU GAGAGUCAUCA	3399	285- 307
AD- 1963610	UGACUCUCAGGA CAAAGCAGU	3040	288-308	ACUGCUTUGUCC UGAGAGUCAUC	3400	286- 308
AD- 1963618	CCAUUCAGACAA UAUAUCAUU	3041	1489- 1509	AAUGAUUAUUG UCUGAAUGGAA	3401	1487- 1509
AD- 1963719	ACUUCACUUGG UUCACUGGAU	3042	426-446	AUCCAGTGAACC AAGUGAAGUUC	3402	424- 446
AD- 1963721	UUCACUUGGUU CACUGGAACU	3043	428-448	AGUUCCAGUGAA CCAAGUGAAGU	3403	426- 448
AD- 1963733	GAUUUUGGGAA AGCUGUGCAU	3044	460-480	AUGCACAGCUUU CCCCAAAUCCC	3404	458- 480
AD- 1963735	UUUUGGGAAAG CUGUGCAGCU	3045	462-482	AGCUGCACAGCU UUCCCCAAAUC	3405	460- 482
AD- 1963738	UGGAAAGCUG UGCAGCAACU	3046	465-485	AGUUGCTGCACA GCUUCCCCAAA	3406	463- 485
AD- 1963762	UGGACUGGCCG UUCUAGGUAU	3047	489-509	AUACCUAGAACG GCCAGUCCAUC	3407	487- 509
AD- 1963763	GGACUGGCCGU UCUAGGUUU	3048	490-510	AAUACCTAGAAC GGCCAGUCCAU	3408	488- 510
AD- 1963776	UAGGUUUUUUU UUGAAGGUUU	3049	503-523	AAACCUCAAAAA AAUACCUAGA	3409	501- 523
AD- 1963780	UAUUUUUUUGA AGGUUGGCAU	3050	507-527	AUGCCAACCUUC AAAAAAAUACC	3410	505- 527
AD- 1963781	AUUUUUUUGAA GGUUGGCAGU	3051	508-528	ACUGCCAACCUU CAAAAAAUAC	3411	506- 528

AD- 1963785	UUUUGAAGGUU GGCAGCGCUU	3052	512-532	AAGCGCTGCCAAC CUUCAAAAAA	3412	510- 532
AD- 1963790	AAGGUUGGCAG CGCUAAACCU	3053	517-537	AGGUTUAGCGCU GCCAACCUUCA	3413	515- 537
AD- 1963814	CUUCAGAAAGU UGUUGAUGUU	3054	541-561	AACATCAACAACU UUCUGAAGGC	3414	539- 561
AD- 1963816	UCAGAAAGUUG UUGAUGUGCU	3055	543-563	AGCACATCAACAA CUUUCUGAAG	3415	541- 563
AD- 1963817	CAGAAAGUUGU UGAUGUGCUU	3056	544-564	AAGCACAUCAAC AACUUUCUGAA	3416	542- 564
AD- 1963819	GAAAGUUGUUG AUGUGCUGGU	3057	546-566	ACCAGCACAUCA ACAACUUUCUG	3417	544- 566
AD- 1963839	AUCCAUUAAAA CAAAGGGCU	3058	566-586	AGCCUTUGUUU UAAUGGAAUCC	3418	564- 586
AD- 1963840	UCCAUUAAAAC AAAGGGCAU	3059	567-587	AUGCCCTUUGUU UUAUGGAAUC	3419	565- 587
AD- 1963845	UUAAAACAAAGG GCAAGAGUU	3060	572-592	AACUCUTGCCCU UUGUUUUAUG	3420	570- 592
AD- 1963846	UAAAACAAAGGG CAAGAGUGU	3061	573-593	ACACTCTUGCCCU UUGUUUUAU	3421	571- 593
AD- 1963848	AAACAAAGGGCA AGAGUGCUU	3062	575-595	AAGCACTCUUGC CCUUGUUUUA	3422	573- 595
AD- 1963850	ACAAAGGGCAAG AGUGCUGAU	3063	577-597	AUCAGCACUCUU GCCCUUUGUUU	3423	575- 597
AD- 1963853	AAGGGCAAGAG UGCUGACUUU	3064	580-600	AAAGTCAGCACU CUUGCCCUUG	3424	578- 600
AD- 1963855	GGGCAAGAGUG CUGACUUCAU	3065	582-602	AUGAAGTCAGCA CUCUUGCCCUU	3425	580- 602
AD- 1963857	GCAAGAGUGCU GACUUCACUU	3066	584-604	AAGUGAAGUCAG CACUCUUGCCC	3426	582- 604
AD- 1963858	CAAGAGUGCUG ACUUCACUAU	3067	585-605	AUAGTGAAGUCA GCACUCUUGCC	3427	583- 605

AD-1963860	AGAGUGCUGAC UUCACUAACU	3068	587-607	AGUUAGTGAAGU CAGCACUCUUG	3428	585-607
AD-1963863	GUGCUGACUUC ACUAACUUCU	3069	590-610	AGAAGUTAGUGA AGUCAGCACUC	3429	588-610
AD-1963864	UGCUGACUUCAC UAACUUCGU	3070	591-611	ACGAAGTUAGUG AAGUCAGCACU	3430	589-611
AD-1963870	CUUCACUAACUU CGAUCCUCU	3071	597-617	AGAGGATCGAAG UUAGUGAAGUC	3431	595-617
AD-1963871	UUCACUAACUUC GAUCCUCGU	3072	598-618	ACGAGGAUCGAA GUUAGUGAAGU	3432	596-618
AD-1963893	GCCUCCUUCUG AAUCCUUGU	3073	620-640	ACAAGGAUUCAG GAAGGAGGCCA	3433	618-640
AD-1963896	UCCUUCUGAAU CCUUGGAUU	3074	623-643	AAUCCAAGGAUU CAGGAAGGAGG	3434	621-643
AD-1963920	GGACCUACCCAG GCUCACUGU	3075	647-667	ACAGTGAGCCUG GGUAGGUCCAG	3435	645-667
AD-1963922	ACCUACCCAGGC UCACUGACU	3076	649-669	AGUCAGTGAGCC UGGGUAGGUCC	3436	647-669
AD-1963924	CUACCCAGGCUC ACUGACCAU	3077	651-671	AUGGTCAGUGAG CCUGGGUAGGU	3437	649-671
AD-1963926	ACCCAGGCUCAC UGACCACCU	3078	653-673	AGGUGGTCAGUG AGCCUGGGUAG	3438	651-673
AD-1963927	CUCCUCUUCUGG AAUGUGUGU	3079	674-694	ACACACAUUCCA GAAGAGGAGGG	3439	672-694
AD-1963929	CCUCUUCUGGAA UGUGUGACU	3080	676-696	AGUCACACAUUC CAGAAGAGGAG	3440	674-696
AD-1963931	UCUUCUGGAAU GUGUGACCUU	3081	678-698	AAGGTCACACAU UCCAGAAGAGG	3441	676-698
AD-1963933	UUCUGGAAUGU GUGACCUGGU	3082	680-700	ACCAGGTCACACA UUCAGAAGA	3442	678-700
AD-1963936	UGGAAUGUGUG ACCUGGAUUU	3083	683-703	AAAUCCAGGUCA CACAUUCCAGA	3443	681-703

AD- 1963941	UGUGUGACCUG GAUUGUGCUU	3084	688-708	AAGCACAAUCCA GGUCACACAUU	3444	686- 708
AD- 1963943	UGUGACCUGGA UUGUGCUCAU	3085	690-710	AUGAGCACAUC CAGGUCACACA	3445	688- 710
AD- 1963946	GACCUGGAUUG UGCUCAAGGU	3086	693-713	ACCUTGAGCACA AUCCAGGUCAC	3446	691- 713
AD- 1963948	CCUGGAUUGUG CUCAAGGAU	3087	695-715	AUUCCUTGAGCA CAAUCCAGGUC	3447	693- 715
AD- 1963949	CUGGAUUGUGC UCAAGGAACU	3088	696-716	AGUUCCTUGAGC ACAAUCCAGGU	3448	694- 716
AD- 1963952	GAUUGUGCUCA AGGAACCCA	3089	699-719	AUGGGUTCCUUG AGCACAAUCCA	3449	697- 719
AD- 1963953	AUUGUGCUCAA GGAACCCA	3090	700-720	AAUGGGTUCCU GAGCACAUC	3450	698- 720
AD- 1963957	UGCUCAAGGAAC CCAUCAGCU	3091	704-724	AGCUGATGGGU CCUUGAGCACA	3451	702- 724
AD- 1963958	GCUCAAGGAACC CAUCAGCGU	3092	705-725	ACGCTGAUGGGU UCCUUGAGCAC	3452	703- 725
AD- 1963960	UCAAGGAACCCA UCAGCGUCU	3093	707-727	AGACGCTGAUGG GUUCCUUGAGC	3453	705- 727
AD- 1963964	GGAACCCAUCAG CGUCAGCAU	3094	711-731	AUGCTGACGCUG AUGGGUCCU	3454	709- 731
AD- 1963966	AACCCAUCAGCG UCAGCAGCU	3095	713-733	AGCUGCTGACGC UGAUGGGUCC	3455	711- 733
AD- 1963995	UUGAAAUUCCG UAAACUUAU	3096	742-762	AUUAAGTUACG GAAUUCAACA	3456	740- 762
AD- 1963997	GAAAUUCCGUAA ACUUAACU	3097	744-764	AAGUTAAGUUUA CGGAAUUCAA	3457	742- 764
AD- 1963999	AAUCCGUAAAC UUAACUUCU	3098	746-766	AGAAGUTAAGUU UACGGAAUUC	3458	744- 766
AD- 1964000	AUCCGUAAACU UAACUUCU	3099	747-767	AUGAAGTUAAGU UUACGGAAUU	3459	745- 767

AD- 1964002	UCCGAAAACUUA ACUUCAAUU	3100	749-769	AAUUGAAGUUA GUUUACGGAAU	3460	747- 769
AD- 1964003	CCGAAAACUUA CUUCAUGU	3101	750-770	ACAUTGAAGUUA AGUUUACGGAA	3461	748- 770
AD- 1964016	CGAAGAACUGAU GGUGGACAU	3102	783-803	AUGUCCACCAUC AGUUCUUCGGG	3462	781- 803
AD- 1964019	AGAACUGAUGG UGGACAACUU	3103	786-806	AAGUTGTCCACCA UCAGUUCUUC	3463	784- 806
AD- 1964021	AACUGAUGGUG GACAACUGGU	3104	788-808	ACCAGUTGUCCA CCAUCAGUUCU	3464	786- 808
AD- 1964022	ACUGAUGGUGG ACAACUGGCU	3105	789-809	AGCCAGTUGUCC ACCAUCAGUUC	3465	787- 809
AD- 1964024	UGAUGGUGGAC AACUGGCGCU	3106	791-811	AGCGCCAGUUGU CCACCAUCAGU	3466	789- 811
AD- 1964043	CAGCUCAGCCAC UGAAGAACU	3107	812-832	AGUUCUTCAGUG GCUGAGCUGGG	3467	810- 832
AD- 1964044	AGCUCAGCCACU GAAGAACAU	3108	813-833	AUGUTCTUCAGU GGCUGAGCUGG	3468	811- 833
AD- 1964046	CUCAGCCACUGA AGAACAGGU	3109	815-835	ACCUGUTCUUCA GUGGCUGAGCU	3469	813- 835
AD- 1964047	UCAGCCACUGAA GAACAGGCU	3110	816-836	AGCCTGTUCUUC AGUGGCUGAGC	3470	814- 836
AD- 1964049	AGCCACUGAAGA ACAGGCAAU	3111	818-838	AUUGCCTGUUCU UCAGUGGCUGA	3471	816- 838
AD- 1964053	ACUGAAGAACAG GCAAUCAU	3112	822-842	AUGATUTGCCUG UUCUUCAGUGG	3472	820- 842
AD- 1964054	CUGAAGAACAGG CAAUCAAU	3113	823-843	AUUGAUTUGCCU GUUCUUCAGUG	3473	821- 843
AD- 1964055	UGAAGAACAGGC AAAUCAAU	3114	824-844	AUUUGATUUGCC UGUUCUUCAGU	3474	822- 844
AD- 1964056	GAAGAACAGGCA AAUCAAGU	3115	825-845	ACUUTGAUUUGC CUGUUCUUCAG	3475	823- 845

AD-1964058	AGAACAGGCAAA UCAAGCUU	3116	827-847	AAGCTUTGAUUU GCCUGUUCUUC	3476	825-847
AD-1964059	GAACAGGCAAAU CAAAGCUUU	3117	828-848	AAAGCUTUGAUU UGCCUGUUCUU	3477	826-848
AD-1964060	AACAGGCAAUUC AAAGCUUCU	3118	829-849	AGAAGCTUUGAU UUGCCUGUUCU	3478	827-849
AD-1964063	AGGCAAAUCAAA GCUUCCUUU	3119	832-852	AAAGGAAGCUUU GAUUUGCCUGU	3479	830-852
AD-1964064	GGCAAAUCAAG CUUCCUUCU	3120	833-853	AGAAGGAAGCUU UGAUUUGCCUG	3480	831-853
AD-1964067	AAAUCAAAGCUU CCUUCAAAU	3121	836-856	AUUUGAAGGAAG CUUUGAUUUGC	3481	834-856
AD-1964068	AAUCAAAAGCUUC CUUCAAAUU	3122	837-857	AAUUTGAAGGAA GCUUUGAUUUG	3482	835-857
AD-1964070	UCAAGCUUCCU UCAAAUAAU	3123	839-859	AUUATUTGAAGG AAGCUUUGAUU	3483	837-859
AD-1964072	AAAGCUUCCUUC AAAUAAGAU	3124	841-861	AUCUTATUUGAA GGAAGCUUUGA	3484	839-861
AD-1964073	AAGCUUCCUUCA AAUAAGAUU	3125	842-862	AAUCTUAUUUGA AGGAAGCUUUG	3485	840-862
AD-1964075	GCUUCCUUCAAA UAAGAUGGU	3126	844-864	ACCATCTUAUUU GAAGGAAGCUU	3486	842-864
AD-1964077	UUCUUCAAAUA AGAUGGUCU	3127	846-866	AGACCATCUUUA UUGAAGGAAGC	3487	844-866
AD-1964078	UCCUUCAAAUAA GAUGGUCCU	3128	847-867	AGGACCAUCUUA UUUGAAGGAAG	3488	845-867
AD-1964081	UUCAAAUAAGA UGGUCCAUU	3129	850-870	AAUGGGACCAUC UUAUUUGAAGG	3489	848-870
AD-1964102	GUCUGUAUCCAA AUA AUGAAU	3130	871-891	AUUCAUTAUUUG GAUACAGACUA	3490	869-891
AD-1964103	UCUGUAUCCAAA UAAUGAAUU	3131	872-892	AAUUCATUAUUU GGAUACAGACU	3491	870-892

AD- 1964104	CUGUAUCCAAAU AAUGAAUCU	3132	873-893	AGAUTCAUUUU UGGAUACAGAC	3492	871- 893
AD- 1964106	GUAUCCAAAUAA UGAAUCUUU	3133	875-895	AAAGAUTCAUUA UUUGGAUACAG	3493	873- 895
AD- 1964107	UAUCCAAAUAAU GAAUCUUCU	3134	876-896	AGAAGATUCAUU AUUUGGAUACA	3494	874- 896
AD- 1964108	AUCCAAAUAAUG AAUCUUCGU	3135	877-897	ACGAAGAUUCAU UAUUUGGAUAC	3495	875- 897
AD- 1964116	AAUGAAUCUUC GGGUGUUUCU	3136	885-905	AGAAACACCCGA AGAUUCAUUAU	3496	883- 905
AD- 1964118	UGAAUCUUCGG GUGUUUCCCU	3137	887-907	AGGGAAACACCC GAAGAUUCAUU	3497	885- 907
AD- 1964139	UUAGCUAAGCAC AGAUCUACU	3138	908-928	AGUAGATCUGUG CUUAGCUAAAG	3498	906- 928
AD- 1964140	UAGCUAAGCACA GAUCUACCU	3139	909-929	AGGUAGAUCUGU GCUUAGCUAAA	3499	907- 929
AD- 1964142	GCUAAGCACAGA UCUACCUUU	3140	911-931	AAAGGUAGAUCU GUGCUUAGCUA	3500	909- 931
AD- 1964143	CUAAGCACAGAU CUACCUUGU	3141	912-932	ACAAGGTAGAUC UGUGCUUAGCU	3501	910- 932
AD- 1964150	CAGAUCUACCUU GGUGAUUUU	3142	919-939	AAAATCACCAAGG UAGAUCUGUG	3502	917- 939
AD- 1964229	AAUAAAUGUG AAGACUAGAU	3143	1001- 1021	AUCUAGTCUUCA CAUUUUUUUAG	3503	999- 1021
AD- 1964267	ACAACUGCUGUG GCUGGUUGU	3144	1039- 1059	ACAACCAGCCACA GCAGUUGUGU	3504	1037- 1059
AD- 1964274	CUGUGGCUGGU UGGUGCUUUU	3145	1046- 1066	AAAAGCACCAACC AGCCACAGCA	3505	1044- 1066
AD- 1964284	UUGGUGCUUUG UUUAUGGUAU	3146	1056- 1076	AUACCATAAACAA AGCACCAACC	3506	1054- 1076
AD- 1964289	GCUUUGUUUAU GGUAGUAGUU	3147	1061- 1081	AACUACTACCAUA AACAAAGCAC	3507	1059- 1081

AD- 1964291	UUUGUUUAUGG UAGUAGUUUU	3148	1063- 1083	AAAACUACUACC AUAAACAAAGC	3508	1061- 1083
AD- 1964292	UUGUUUAUGGU AGUAGUUUUU	3149	1064- 1084	AAAACTACUACC AUAAACAAAG	3509	1062- 1084
AD- 1964297	AUGGUAGUAGU UUUUCUGUAU	3150	1070- 1090	AUACAGAAAAAC UACUACCAUAA	3510	1068- 1090
AD- 1964299	GGUAGUAGUUU UUCUGUAACU	3151	1072- 1092	AGUUACAGAAAA ACUACUACCAU	3511	1070- 1092
AD- 1964301	UAGUAGUUUUU CUGUAACACU	3152	1074- 1094	AGUGTUACAGAA AAACUACUACC	3512	1072- 1094
AD- 1964302	AGUAGUUUUUC UGUAACACAU	3153	1075- 1095	AUGUGUTACAGA AAAACUACUAC	3513	1073- 1095
AD- 1964303	GUAGUUUUUCU GUAACACAGU	3154	1076- 1096	ACUGTGTUACAG AAAACUACUA	3514	1074- 1096
AD- 1964325	AAUAAGAAUAAA GUACCUUGU	3155	1110- 1130	ACAAGGTACUUU AUUCUUAUUUC	3515	1108- 1130
AD- 1964328	AAGAAUAAAGU ACCUUGACUU	3156	1113- 1133	AAGUCAAGGUAC UUUAUUCUUAU	3516	1111- 1133
AD- 1964329	AGAAUAAAGUAC CUUGACUUU	3157	1114- 1134	AAAGTCAAGGUA CUUUAUUCUUA	3517	1112- 1134
AD- 1964331	AAUAAAGUACCU UGACUUUGU	3158	1116- 1136	ACAAAGTCAAGG UACUUUAUUCU	3518	1114- 1136
AD- 1964335	AAGUACCUUGAC UUUGUUCAU	3159	1120- 1140	AUGAACAAAGUC AAGGUACUUUA	3519	1118- 1140
AD- 1964337	GUACCUUGACU UUGUUCACAU	3160	1122- 1142	AUGUGAACAAAG UCAAGGUACUU	3520	1120- 1142
AD- 1964338	UACCUUGACUU UGUUCACAGU	3161	1123- 1143	ACUGTGAACAAA GUCAAGGUACU	3521	1121- 1143
AD- 1964340	CCUUGACUUUG UUCACAGCAU	3162	1125- 1145	AUGCTGTGAACA AAGUCAAGGUA	3522	1123- 1145
AD- 1964342	UUGACUUUGUU CACAGCAUGU	3163	1127- 1147	ACAUGCTGUGAA CAAAGUCAAGG	3523	1125- 1147

AD- 1964346	CUUUGUUCACA GCAUGUAGGU	3164	1131- 1151	ACCUACAUGCUG UGAACAAAGUC	3524	1129- 1151
AD- 1964353	CACAGCAUGUAG GGUGAUGAU	3165	1138- 1158	AUCATCACCCUAC AUGCUGUGAA	3525	1136- 1158
AD- 1964355	CAGCAUGUAGG GUGAUGAGCU	3166	1140- 1160	AGCUCATCACCCU ACAUGCUGUG	3526	1138- 1160
AD- 1964356	AGCAUGUAGGG UGAUGAGCAU	3167	1141- 1161	AUGCTCAUCACCC UACAUGCUGU	3527	1139- 1161
AD- 1964358	CAUGUAGGGUG AUGAGCACUU	3168	1143- 1163	AAGUGCTCAUCA CCCUACAUGCU	3528	1141- 1163
AD- 1964388	GACUAAAUGCU GCUUUUAAU	3169	1173- 1193	AUUAAAAGCAGC AUUUUAGUCA	3529	1171- 1193
AD- 1964392	AAAUGCUGCU UUUAAAACAU	3170	1177- 1197	AUGUTUTAAAAG CAGCAUUUUAG	3530	1175- 1197
AD- 1964395	AUGCUGCUUUU AAAACAUAGU	3171	1180- 1200	ACUATGTUUUAA AAGCAGCAUUU	3531	1178- 1200
AD- 1964397	GUCGCUUUUAA AACAUAGGAU	3172	1182- 1202	AUCCTATGUUUU AAAAGCAGCAU	3532	1180- 1202
AD- 1964398	CUGCUIUUUAAA ACAUAGGAAU	3173	1183- 1203	AUUCCUAUGUUU UAAAAGCAGCA	3533	1181- 1203
AD- 1964399	UGCUIUUUAAA CAUAGGAAU	3174	1184- 1204	AUUUCCTAUGUU UUAAAAGCAGC	3534	1182- 1204
AD- 1964402	UUUUAAAACAU AGGAAAGUUAU	3175	1187- 1207	AUACTUTCCUUAU GUUUUAAAAGC	3535	1185- 1207
AD- 1964407	AAACAUAGGAAA GUAGAAUGU	3176	1192- 1212	ACAUTCTACUUU CCUAUGUUUUA	3536	1190- 1212
AD- 1964428	UUGAGUGCAAA UCCAUGAGCAU	3177	1213- 1233	AUGCTATGGAUU UGCACUCAACC	3537	1211- 1233
AD- 1964429	UGAGUGCAAU CCAUGACACU	3178	1214- 1234	AGUGCUAUGGAU UUGCACUCAAC	3538	1212- 1234
AD- 1964449	AAGAUAUUUG AGCUAGUUUAU	3179	1234- 1254	AUAACUAGCUCA AUUUUAUCUUGU	3539	1232- 1254

AD- 1964450	AGAUAUUUGA GCUAGUUAU	3180	1235- 1255	AUUAAGTAGCUC AAUUUAUCUUG	3540	1233- 1255
AD- 1964454	AAAUUGAGCUA GUUAAGGCAU	3181	1239- 1259	AUGCCUTAACUA GCUCAAUUUAU	3541	1237- 1259
AD- 1964455	AAUUGAGCUAG UUAAGGCAAU	3182	1240- 1260	AUUGCCTUAACU AGCUCAAUUUA	3542	1238- 1260
AD- 1964459	GAGCUAGUUA GGCAAUCAU	3183	1244- 1264	AUGATUTGCCUU AACUAGCUCAA	3543	1242- 1264
AD- 1964462	CUAGUUAAGGC AAAUCAGGUU	3184	1247- 1267	AACCTGAUUUGC CUUAACUAGCU	3544	1245- 1267
AD- 1964464	AGUUAAGGCAA AUCAGGUAAU	3185	1249- 1269	AUUACCTGAUUU GCCUUAACUAG	3545	1247- 1269
AD- 1964467	UAAGGCAAUCA GGUAAAAUU	3186	1252- 1272	AAUUTUACCUGA UUUGCCUUAAC	3546	1250- 1272
AD- 1964468	AAGGCAAUCAG GUAAAAUUAU	3187	1253- 1273	AUAUTUTACCUG AUUUGCCUUA	3547	1251- 1273
AD- 1964471	GCAAUCAGGUA AAAUAGUCU	3188	1256- 1276	AGACTATUUUAC CUGAUUUGCCU	3548	1254- 1276
AD- 1964472	CAAUCAGGUAA AAUAGUCAU	3189	1257- 1277	AUGACUAAUUUA CCUGAUUUGCC	3549	1255- 1277
AD- 1964473	AAAUCAGGUAAA AUAGUCAUU	3190	1258- 1278	AAUGACTAUUUU ACCUGAUUUGC	3550	1256- 1278
AD- 1964475	AUCAGGUAAAA UAGUCAUGAU	3191	1260- 1280	AUCATGACUAAU UUACCUGAUUU	3551	1258- 1280
AD- 1964477	CAGGUAAAUA GUCAUGAUUU	3192	1262- 1282	AAUUCATGACUA UUUUACCUGAU	3552	1260- 1282
AD- 1964478	AGGUAAAUAUAG UCAUGAUUCU	3193	1263- 1283	AGAATCAUGACU AUUUUACCUGA	3553	1261- 1283
AD- 1964480	GUAAAUAUAGUC AUGAUUCUAU	3194	1265- 1285	AUAGAATCAUGA CUAUUUUACCU	3554	1263- 1285
AD- 1964481	UAAAUAUGUCA UGAUUCUAUU	3195	1266- 1286	AAUAGAAUCAUG ACUAUUUUACC	3555	1264- 1286

AD- 1964489	UCAUGAUUCUA UGUAAUGUAU	3196	1274- 1294	AUACAUTACAUA GAAUCAUGACU	3556	1272- 1294
AD- 1964490	CAUGAUUCUAU GUAAUGUAAU	3197	1275- 1295	AUUACATUACAU AGAAUCAUGAC	3557	1273- 1295
AD- 1964493	GAUUCUAUGUA AUGUAAACCU	3198	1278- 1298	AGGUTUACAUIA CAUAGAAUCAU	3558	1276- 1298
AD- 1964551	AUGACUUUUGA AUUACAGAGU	3199	1407- 1427	ACUCTGTAAUUC AAAAGUCAUIA	3559	1405- 1427
AD- 1964553	GACUUUUGAAU UACAGAGAAU	3200	1409- 1429	AAUCTCTGAAU UCAAAAGUCAU	3560	1407- 1429
AD- 1964578	UAUAAUUAGAG UUGUGAUACU	3201	1458- 1478	AGUATCACAACU CUAAUUUAAC	3561	1456- 1478
AD- 1964580	UAAUUAGAGUU GUGAUACAGU	3202	1460- 1480	ACUGTATCACAAC UCUAAUUUA	3562	1458- 1480
AD- 1964581	AAUUAGAGUUG UGAUACAGAU	3203	1461- 1481	AUCUGUAUCACA ACUCUAAUUUA	3563	1459- 1481
AD- 1964582	AUUAGAGUUGU GAUACAGAGU	3204	1462- 1482	ACUCTGTAUCACA ACUCUAAUUA	3564	1460- 1482
AD- 1964584	UAGAGUUGUGA UACAGAGUAU	3205	1464- 1484	AUACTCTGUAUC ACAACUCUAAU	3565	1462- 1484
AD- 1964586	GAGUUGUGAUA CAGAGUAUUA	3206	1466- 1486	AUAUACTCUGUA UCACAACUCUA	3566	1464- 1486
AD- 1964588	GUUGUGAUACA GAGUAUAUUU	3207	1468- 1488	AAUUAUACUCUG UAUCACAACUC	3567	1466- 1488
AD- 1964610	CAUUCAGACAAU AUAUCAUUAU	3208	1490- 1510	AUAUGATAUUAU GUCUGAAUGGA	3568	1488- 1510
AD- 1964611	AUUCAGACAAUA UAUCAUUAU	3209	1491- 1511	AUUATGAUUAU UGUCUGAAUGG	3569	1489- 1511

**Таблица 10. Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепей агентов на основе дцРНК к СА2 с модификацией С16**

Название дуплекса	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишень, от 5' к	SEQ ID NO:
-------------------	------------------------------	------------	----------------------------------	------------	---	------------

	от 5' к 3'		от 5' к 3'		3'	
AD-1962343	ascscug(Ahd)GfcAfCfUfggcauaagsgsu	3570	asCfscuuAfugccaguGfcUfcagguscsc	3930	GGACCUGAGCA CUGGCAUAAGG A	2834
AD-1962345	csusgag(Chd)AfcUfGfGfcuaaaggascsu	3571	asGfsuccUfuaugc caGfuGfcucagsgs u	3931	ACCUGAGCACU GGCAUAAGGAC U	2781
AD-1962360	usgsaca(Uhd)Cf gAfCfAfcucaua casgsu	3572	asCfsuguAfugagu guCfGafugucasas c	3932	GUUGACAUCGA CACUCAUACAGC	2640
AD-1962369	csascuc(Ahd)Uf aCfAfGfccaagu ausgsu	3573	asCfsauaCfuuggc ugUfaUfgagugsus c	3933	GACACUCAUACA GCCAAGUAUGA	2652
AD-1962370	ascsuca(Uhd)AfcAfGfCfcaaguaugsasu	3574	asUfscAuAfcuugg cuGfuAfugagusgs u	3934	ACACUCAUACAG CCAAGUAUGAC	2637
AD-1962371	csuscau(Ahd)Cf aGfCfCfaaguau gascsu	3575	asGfsucaUfacuug gcUfgUfaugagsus g	3935	CACUCAUACAGC CAAGUAUGACC	2691
AD-1962380	cscsaag(Uhd)AfcUfGfAfcfcuucccusgsu	3576	asCfsaggGfaaggg ucAfuAfcuuggscs u	3936	AGCCAAGUAUG ACCCUUCCCUGA	2710
AD-1962416	csusgag(Ghd)AfcUfCfUfcaacaaugsu	3577	asCfscAuUfguuga ggAfuCfcucagsgsg	3937	CCCUGAGGAUCC UCAACAAUGGU	2759
AD-1962417	usgsagg(Ahd)UfcCfUfCfaacaau ggsusu	3578	asAfsccaUfuguug agGfaUfccucasgs g	3938	CCUGAGGAUCC UCAACAAUGGU C	2717
AD-1962418	gsasgga(Uhd)CfcUfCfAfacaaug guscsu	3579	asGfsaccAfuuguu gaGfgAfuccucsas g	3939	CUGAGGAUCCU CAACAAUGGUC A	2703
AD-	usgsuu(Uhd)C	3580	asCfsaaaCfuccacg	3940	CAUGC UUCAA	2625

1962439	faAfCfGfuggag uuusgsu		uUfgAfaagcasusg		CGUGGAGUUUG A	
AD- 1962440	gscsuuu(Chd)Af aCfGfUfggaguu ugsasu	3581	asUfscaaAfcuccac gUfuGfaaagcsasu	3941	AUGCUUUCAAC GUGGAGUUUGA U	2624
AD- 1962441	csusuuc(Ahd)Af cGfUfGfgaguuu gasusu	3582	asAfsucaAfacucca cGfuUfgaaagscsa	3942	UGCUUUCAACG UGGAGUUUGAU G	2634
AD- 1962442	ususuca(Ahd)Cf gUfGfGfaguug ausgsu	3583	asCfsaucAfaacucc aCfGfUfgaaasgsc	3943	GCUUUCAACGU GGAGUUUGAUG A	2650
AD- 1962451	gsgsagu(Uhd)U fgAfUfGfacucuc agsgsu	3584	asCfscugAfgaguca uCfaAfacuccsasc	3944	GUGGAGUUUGA UGACUCUCAGG A	2725
AD- 1962460	usgsacu(Chd)Uf cAfGfGfacaag casgsu	3585	asCfsugcUfuuguc cuGfaGfagucasus c	3945	GAUGACUCUCA GGACAAAGCAG U	2787
AD- 1962557	asascuu(Chd)Af cUfUfGfguucac ugsgsu	3586	asCfscagUfgaacca aGfuGfaaguuscsu	3946	AGAACUUCACU UGGUUCACUGG A	2721
AD- 1962597	csusgau(Ghd)G faCfUfGfgccguu cusasu	3587	asUfsagaAfcggcca gUfcCfaucagsgsu	3947	ACCUGAUGGAC UGGCCGUUCUA G	2838
AD- 1962598	usgsaug(Ghd)A fcUfGfGfccguuc uasgsu	3588	asCfsuagAfacggcc aGfuCfcaucasgsg	3948	CCUGAUGGACU GGCCGUUCUAG G	2843
AD- 1962599	gsasugg(Ahd)Cf uGfGfCfcguucu agsgsu	3589	asCfscuaGfaacggc cAfgUfccaucsasg	3949	CUGAUGGACUG GCCGUUCUAGG U	2841
AD- 1962600	asusgga(Chd)Uf gGfCfCfguucua ggsusu	3590	asAfsccuAfgaacgg cCfaGfuccauscsa	3950	UGAUGGACUGG CCGUUCUAGGU A	2833

AD-1962603	gsascug(Ghd)Cf cGfUfUfcuaggu aususu	3591	asAfsauaCfcuaga acGfgCfcagucscsa	3951	UGGACUGGCCG UUCUAGGUAAU U	2776
AD-1962604	ascsgg(Chd)Cf gUfUfCfuaggua uususu	3592	asAfsaaUfccuag aaCfgGfccaguscs	3952	GGACUGGCCGU UCUAGGUUUU U	2751
AD-1962605	csusggc(Chd)Gf uUfCfUfagguau uususu	3593	asAfsaaaUfaccua gaAfcGfgccagsusc	3953	GACUGGCCGUU CUAGGUUUUU U	2646
AD-1962606	usgsgcc(Ghd)Uf uUfUfAfgguauu uususu	3594	asAfsaaaAfuaccu agAfaCfsgccasgsu	3954	ACUGGCCGUUC UAGGUUUUUU U	2673
AD-1962607	gsgscg(Uhd)Uf cUfAfGfguauuu uususu	3595	asAfsaaaAfauacc uaGfaAfcgcccassg	3955	CUGGCCGUUCU AGGUUUUUUU U	2700
AD-1962608	gscscgu(Uhd)Cf uAfGfGfuauuu uuususu	3596	asAfsaaaAfaauac cuAfgAfacggcscsa	3956	UGGCCGUUCUA GGUUUUUUUU G	2681
AD-1962609	cscsguu(Chd)Uf aGfGfUfauuuu uuusgsu	3597	asCfsaaaAfaaaau ccUfaGfaacggscsc	3957	GGCCGUUCUAG GUUUUUUUUUG A	2662
AD-1962610	csgsuuc(Uhd)Af gGfUfAfuuuuu uugsasu	3598	asUfscaaAfaaaau acCfuAfgaacgsgsc	3958	GCCGUUCUAGG UAUUUUUUUGA A	2606
AD-1962611	gsusucu(Ahd)G fgUfAfUfuuuuu ugasasu	3599	asUfsucaAfaaaaa uaCfcUfagaacsgsg	3959	CCGUUCUAGGU AUUUUUUUUGA G	2586
AD-1962612	ususcu(Ghd)G fuAfUfUfuuuuu gaasgsu	3600	asCfsuucAfaaaaa auAfcCfuagaascsg	3960	CGUUCUAGGUA UUUUUUUGAAG G	2607
AD-1962613	uscsuag(Ghd)U faUfUfUfuuuug	3601	asCfscuuCfaaaaa aaUfaCfcuagasas	3961	GUUCUAGGUAU UUUUUUUGAAGG	2679

	aagsgsu		c		U	
AD-1962615	usasggu(Ahd)UfuUfUfuugaa ggususu	3602	asAfsaccUfucaaa aaAfaUfaccuasgs a	3962	UCUAGGUUUUU UUUUGAAGGUU G	2642
AD-1962616	asgsgua(Uhd)UfuUfUfugaag guusgsu	3603	asCfsaacCfucaaa aAfaAfuaccuasg	3963	CUAGGUUUUUU UUUGAAGGUUG G	2738
AD-1962617	gsgsuau(Uhd)UfuUfUfugaagg uugsgsu	3604	asCfscaaCfcucaa aAfaAfaauaccsusa	3964	UAGGUUUUUUU UUGAAGGUUGG C	2731
AD-1962618	gsusauu(Uhd)UfuUfUfGfaaggu uggscsu	3605	asGfsccaAfccucaa aAfaAfaauacscsu	3965	AGGUUUUUUUU UGAAGGUUGGC A	2789
AD-1962620	asusuuu(Uhd)UfuGfAfAfgguug gcasgsu	3606	asCfsugcCfaaccuu cAfaAfaaaausasc	3966	GUAUUUUUUUUG AAGGUUGGCAG C	2807
AD-1962648	csgsggc(Chd)UfuCfAfGfaaaguu gususu	3607	asAfsacaAfcuuuc ugAfaGfgcccgsgs u	3967	ACCGGGCCUUCA GAAAGUUGUUG	2701
AD-1962649	gsgsgcc(Uhd)UfcAfGfAfaaguug uusgsu	3608	asCfsaacAfacuuuc uGfaAfggccccsgsg	3968	CCGGGCCUUCA GAAAGUUGUUG A	2726
AD-1962650	gsgsccu(Uhd)CfaGfAfAfaguugu ugsasu	3609	asUfscaaCfaacuu ucUfgAfaggccscsg	3969	CGGGCCUUCAG AAAGUUGUUGA U	2712
AD-1962652	cscsuuc(Ahd)GfaAfAfGfuuguug ausgsu	3610	asCfsaucAfacaacu uUfcUfugaaggscsc	3970	GGCCUUCAGAA AGUUGUUGAUG U	2756
AD-1962653	csusuca(Ghd)AfaAfGfUfuguuga ugsusu	3611	asAfscauCfaacaac uUfuCfugaagsgsc	3971	GCCUUCAGAAA GUUGUUGAUGU G	2696
AD-	uscsaga(Ahd)Afa	3612	asGfscacAfucaaca	3972	CUUCAGAAAGU	2795

1962655	gUfUfGfuugaug ugscsu		aCfuUfucugasasg		UGUUGAUGUGC U	
AD- 1962658	gsasaag(Uhd)U fgUfUfGfaugug cugsgsu	3613	asCfscagCfacauca aCfaAfcuuucsusg	3973	CAGAAAGUUGU UGAUGUGCUGG A	2820
AD- 1962678	asusucc(Ahd)Uf uAfAfafacaaag ggscsu	3614	asGfscuccUfuuguu uuAfaUfggaauscs c	3974	GGAUUCCAUIA AAACAAAGGGCA	2729
AD- 1962688	asascaa(Ahd)Gf gGfCfAfagagug cusgsu	3615	asCfsagcAfcucuug cCfcUfuuguususu	3975	AAAACAAAGGGC AAGAGUGCUGA	2821
AD- 1962701	asgsugc(Uhd)G faCfUfUfcacuaa cususu	3616	asAfsaguUfaguga agUfcAfgcacuscsu	3976	AGAGUGCUGAC UUCACUAACUU C	2599
AD- 1962703	usgscug(Ahd)Cf uUfCfAfcuaacu ucsgsu	3617	asCfsgaaGfuuagu gaAfgUfcagcascsu	3977	AGUGCUGACUU CACUAACUUCGA	2583
AD- 1962705	csusgac(Uhd)U fcAfCfUfaacuuc gasusu	3618	asAfsucgAfaguua guGfaAfgucagscs a	3978	UGCUGACUUCA CUAACUUCGAU C	2562
AD- 1962706	usgsacu(Uhd)Cf aCfUfAfacuucg auscsu	3619	asGfsaucGfaaguu agUfgAfagucasgs c	3979	GCUGACUUCAC UAACUUCGAUC C	2542
AD- 1962707	gsascuu(Chd)Af cUfAfAfcuucga ucscsu	3620	asGfsgauCfgaagu uaGfuGfaagucsas g	3980	CUGACUUCACU AACUUCGAUCC U	2551
AD- 1962712	csascua(Ahd)Cf uUfCfGfauccuc gusgsu	3621	asCfsacgAfggaucg aAfgUfuagugsasa	3981	UUCACUAACUU CGAUCCUCGUG G	2601
AD- 1962713	ascsuaa(Chd)Uf uCfGfAfuccucg ugsgsu	3622	asCfscacGfaggauc gAfaGfuuagusgsa	3982	UCACUAACUUC GAUCCUCGUGG C	2755

AD-1962733	cscsucc(Uhd)Uf cCfUfGfaauccu ugsgsu	3623	asCfscaaGfgauuc agGfaAfggaggscsc	3983	GGCCUCCUCCU GAAUCCUUGGA	2629
AD-1962735	uscscuu(Chd)Cf uGfAfAfuccuug gasusu	3624	asAfsuccAfggau ucAfgGfaaggasgs g	3984	CCUCCUCCUGA AUCCUUGGAUU	2608
AD-1962736	cscsuuc(Chd)Uf gAfAfUfccuugg aususu	3625	asAfsaucCfaagga uuCfaGfgaaggas g	3985	CUCCUCCUGAA UCCUUGGAUUA	2611
AD-1962766	csusccu(Chd)Uf uCfUfGfgaaugu gusgsu	3626	asCfsacaCfaucca gAfaGfaggagsgsg	3986	CCCUCCUCUUCU GGAAUGUGUGA	2623
AD-1962777	gsasaug(Uhd)G fuGfAfCfcugga uugsusu	3627	asAfscaaUfccaggu cAfcAfcauucscsa	3987	UGGAAUGUGUG ACCUGGAUUGU G	2816
AD-1962780	usgsugu(Ghd)A fcCfUfGfgauug ugcsusu	3628	asAfsucaCfaucca gGfuCfacacasusu	3988	AAUGUGUGACC UGGAUUGUGCU C	2805
AD-1962795	gsusgcu(Chd)Af aGfGfAfaccuau casgsu	3629	asCfsugaUfggguu ccUfuGfagcacsas a	3989	UUGUGCUCAAG GAACCAUCAGC	2766
AD-1962799	uscsaag(Ghd)Af aCfCfCfaucagcg uscsu	3630	asGfsacgCfugaug ggUfuCfcuugasgs c	3990	GCUCAAGGAACC CAUCAGCGUCA	2794
AD-1962801	asasgga(Ahd)Cf cCfAfUfcagcguc asgsu	3631	asCfsugaCfbcuga ugGfgUfccuusgs a	3991	UCAAGGAACCCA UCAGCGUCAGC	2811
AD-1962808	cscsauc(Ahd)Gf cGfUfCfagcagc gasgsu	3632	asCfsucgCfbcuga cGfcUfgauggsgsu	3992	ACCAUCAGCGU CAGCAGCGAGC	2835
AD-1962836	gsasaau(Uhd)C fcGfUfAfaacuu	3633	asAfsuguAfaguuu acGfgAfauuucas	3993	UUGAAAUCCG UAAACUUAACU	2584

	aacsusu		a		U	
AD-1962837	asasauu(Chd)Cf gUfAfafacuuaa cususu	3634	asAfsaguUfaaguu uaCfgGfaauuuscs a	3994	UGAAAUUCGGU AAACUUAACUU C	2559
AD-1962842	cscsgua(Ahd)Af cUfUfAfacuuca ausgsu	3635	asCfsauuGfaaguu aaGfuUfuacggsas a	3995	UUCGGUAAACU UAACUUCAAUG G	2556
AD-1962843	csgsuua(Ahd)Cf uUfAfafcuucaa ugsgsu	3636	asCfscauUfgaagu uaAfgUfuuacgsgs a	3996	UCCGUAAACUU AACUUCAAUGG G	2659
AD-1962860	asascug(Ahd)Uf gGfUfGfgacaac ugsgsu	3637	asCfscagUfugucca cCfaUfcaguuscsu	3997	AGAACUGAUGG UGGACAACUGG C	2844
AD-1962885	csuscag(Chd)Cf aCfUfGfaagaac agsgsu	3638	asCfscugUfucuuc agUfgGfcugagscs u	3998	AGCUCAGCCACU GAAGAACAGGC	2799
AD-1962897	asgsaac(Ahd)Gf gCfAfafaucaaa gcsusu	3639	asAfsagcuUfugauu ugCfcUfguucusus c	3999	GAAGAACAGGC AAAUCAAGGCU U	2749
AD-1962902	asgsgca(Ahd)Af uCfAfafagcuuc cususu	3640	asAfsaggAfagcuu ugAfuUfugccusgs u	4000	ACAGGCAAAUCA AAGCUUCCUUC	2567
AD-1962910	csasaag(Chd)Uf uCfCfUfucaaa aasgsu	3641	asCfsuuaUfuugaa ggAfaGfcuuugsas u	4001	AUCAAGCUUCC UUCAAAUAAGA	2543
AD-1962911	asasagc(Uhd)U fcCfUfUfcaaa agsasu	3642	asUfscuuAfuuga agGfaAfgcuuusgs a	4002	UCAAGCUUCC UUCAAAUAAGA U	2569
AD-1962912	asagcu(Uhd)Cf cUfUfCfaaa gasusu	3643	asAfsucuUfauuug aaGfgAfagcuusus g	4003	CAAAGCUUCCU UCAAAUAAGAU G	2558
AD-	asgscuu(Chd)Cf	3644	asCfsaucUfuauuu	4004	AAAGCUUCCUU	2565

1962913	uUfCfAfaauaag ausgsu		gaAfgGfaagcusus u		CAAUAAGAUG G	
AD- 1962914	gscsuuc(Chd)Uf uCfAfAfauaaga ugsgsu	3645	asCfscauCfuuauu ugAfaGfgaagcusus u	4005	AAGCUUCCUUC AAUAAGAUGG U	2563
AD- 1962941	gsuscug(Uhd)A fuCfCfAfaauaa ugasasu	3646	asUfsucaUfuauuu ggAfuAfcagacsus a	4006	UAGUCUGUAUC CAAUAUGAA U	2545
AD- 1962945	gsusauc(Chd)Af aAfUfAfaugaau cususu	3647	asAfsagaUfucuu auUfuGfgauacsas g	4007	CUGUAUCCAAA UAAUGAAUCUU C	2561
AD- 1962947	asuscca(Ahd)Af uAfAfUfgaaucu ucsgsu	3648	asCfsgaaGfauuca uuAfuUfuggausas c	4008	GUAUCCAAAUA AUGAAUCUUCG G	2614
AD- 1962948	uscscAA(Ahd)Uf aAfUfGfaaucuu cgsgsu	3649	asCfscgaAfgauuca uUfaUfuuggasusa	4009	UAUCCAAAUA UGAAUCUUCGG G	2732
AD- 1962949	cscsaaa(Uhd)Af aUfGfAfaucuu ggsgsu	3650	asCfscgAfgauuc aUfuAfuuggsasus	4010	AUCCAAAUAU GAAUCUUCGGG U	2796
AD- 1962950	csasaau(Ahd)Af uGfAfAfucucg ggsusu	3651	asAfscccGfaagau ucAfuUfauuugsgs a	4011	UCCAAAUAUG AAUCUUCGGGU G	2743
AD- 1962951	asasaau(Ahd)U fgAfAfUfcuucg gusgsu	3652	asCfsaccCfgaagau uCfaUfuauuusgsg	4012	CCAAAUAUGAA UCUUCGGGUGU	2815
AD- 1962952	asasuaa(Uhd)G faAfUfCfuucggg ugsusu	3653	asAfsacCfcaaga uUfcAfuauuusug	4013	CAAUAUGAA UCUUCGGGUGU U	2806
AD- 1962953	asusaau(Ghd)A faUfCfUfucggg ugususu	3654	asAfsacaCfccgaag aUfuCfauuauususu	4014	AAUAUGAAU CUUCGGGUGUU U	2801

AD-1962954	usasaug(Ahd)AfuCfUfUfcgggu guususu	3655	asAfsaacAfcccgaagAfuUfcauuasusu	4015	AAUAAUGAAUCUUCGGGUGUUUC	2809
AD-1962957	usgsaau(Chd)UfuCfGfGfguguu uccscsu	3656	asGfsggaAfacaccgAfaGfauucasusu	4016	AAUGAAUCUUCGGUGUUUCCC	2739
AD-1962958	gsasauc(Uhd)UfcGfGfGfuguuu cccsusu	3657	asAfsgggAfaacc cGfaAfgauucsasu	4017	AUGAAUCUUCGGUGUUUCCC	2747
AD-1962984	asasgca(Chd)AfgAfuCfuaccuu ggsusu	3658	asAfsccaAfgguaguCfuGfugcuusag	4018	CUAAGCACAGAUUCUACCUUGGU	2671
AD-1962985	asgscac(Ahd)GfaUfCfUfaccuug usgsu	3659	asCfsaccAfgguagaUfCfUfgugcususa	4019	UAAGCACAGAUUCUACCUUGGUG	2680
AD-1962986	gscsaca(Ghd)AfuCfUfAfccuugg ugsasu	3660	asUfscacCfaagguagAfuCfugugcsusu	4020	AAGCACAGAUUCUACCUUGGUGA	2633
AD-1962990	asgsauc(Uhd)AfcCfUfUfggugau uusgsu	3661	asCfsaaaUfcaccaa gGfuAfgaucusgsu	4021	ACAGAUUCUACCUUGGUGAUUUGG	2616
AD-1963114	ascsaac(Uhd)GfcUfGfUfggcugg uusgsu	3662	asCfsaacCfagccac aGfcAfguugusgsu	4022	ACACAACUGCUGUGGCUGGUUGG	2845
AD-1963115	csasacu(Ghd)CfuGfUfGfgcuggu ugsusu	3663	asCfscaaCfcagccacAfgCfaguugsusg	4023	CACAACUGCUGUGGCUGGUUGG	2847
AD-1963118	csusgcu(Ghd)UfgGfCfUfgguug ugsusu	3664	asGfscacCfaaccag cCfaCfagcagsusu	4024	AACUGCUGUGGCUGGUUGGUGC	2849
AD-1963123	gsusggc(Uhd)GfgUfUfGfgugcu	3665	asAfscaaAfgcaccacCfcAfgccacsag	4025	CUGUGGCUGGUUGGUGCUUUGU	2810

	uugsusu				U	
AD-1963125	gsgscug(Ghd)U fuGfGfUfgcuuu guususu	3666	asAfsaacAfaagcac cAfaCfcagccsasc	4026	GUGGCUGGUUG GUGCUUUGUUU A	2769
AD-1963126	gscsugg(Uhd)U fgGfUfGfcuuug uuusasu	3667	asUfsaaaCfaaagc acCfaAfccagcscsa	4027	UGGCUGGUUGG UGCUUUGUUUA U	2753
AD-1963127	csusggu(Uhd)G fgUfGfCfuugu uuasusu	3668	asAfsuaaAfaaagc aCfcAfacagcscsc	4028	GGCUGGUUGGU GCUUUGUUUAU G	2686
AD-1963128	usgsguu(Ghd)G fuGfCfUfuuguu uauusgu	3669	asCfsauaAfaaaa gcAfcCfaaccasgsc	4029	GCUGGUUGGUG CUUUGUUUAUG G	2690
AD-1963129	gsgsuug(Ghd)U fgCfUfUfuguuu augsgsu	3670	asCfscauAfaaaaa gCfaCfaaccsasg	4030	CUGGUUGGUGC UUUGUUUAUGG U	2737
AD-1963130	gsusugg(Uhd)G fcUfUfUfguuua uggsusu	3671	asAfsccaUfaaaaa aGfcAfccaacscsa	4031	UGGUUGGUGCU UUGUUUAUGGU A	2746
AD-1963131	ususggu(Ghd)C fuUfUfGfuuuau ggusasu	3672	asUfsaccAfuaaac aaAfgCfaccascs	4032	GGUUGGUGCUU UGUUUAUGGUA G	2651
AD-1963132	usgsgug(Chd)U fuUfGfUfuuaug guasgsu	3673	asCfsuacCfuaaac aAfaGfcaccasasc	4033	GUUGGUGCUUU GUUUAUGGUAG U	2643
AD-1963135	usgscuu(Uhd)G fuUfUfAfuggua guasgsu	3674	asCfsuacUfaccau aaAfcAfaagcascsc	4034	GGUGCUUUGUU UAUGGUAGUAG U	2684
AD-1963138	ususugu(Uhd)U faUfGfGfuagua guususu	3675	asAfsaacUfacuacc aUfaAfaaaaasgsc	4035	GCUUUGUUUAU GGUAGUAGUUU U	2723
AD-	ususguu(Uhd)A	3676	asAfsaaaCfuacua	4036	CUUUGUUUAUG	2773

1963139	fuGfGfUfaguag uuususu		ccAfuAfaacaasag		GUAGUAGUUUU U	
AD- 1963140	gsusuaa(Uhd)G fgUfAfGfuaguu uuuscsu	3677	asGfsaaaAfacuac uaCfcAfuaaacsas a	4037	UUGUUUAUGGU AGUAGUUUUUC U	2760
AD- 1963141	ususuaa(Ghd)G fuAfGfUfaguuu uucsusu	3678	asAfsгааAfaacuac uAfcCfauaaascsa	4038	UGUUUAUGGUA GUAGUUUUUCU G	2663
AD- 1963142	ususaug(Ghd)U faGfUfAfguuuu ucusgsu	3679	asCfsagaAfaaacu acUfaCfcauaasasc	4039	GUUUUAUGGUAG UAGUUUUUCUG U	2720
AD- 1963143	usasugg(Uhd)A fgUfAfGfuuuuu cugsusu	3680	asAfsцagAfaaacu aCfuAfccauasasa	4040	UUUAUGGUAGU AGUUUUUCUGU A	2675
AD- 1963144	asusggu(Ahd)G fuAfGfUfuuuuc ugusasu	3681	asUfsacaGfaaaaa cuAfcUfaccausas a	4041	UUAUGGUAGUA GUUUUUUCUGUA A	2617
AD- 1963148	usasgua(Ghd)U fuUfUfUfcugua acascsu	3682	asGfsuguUfacaga aaAfaCfuacuascsc	4042	GGUAGUAGUUU UUCUGUAACAC A	2740
AD- 1963202	asgsaaU(Ahd)Af aGfUfAfccuuga cususu	3683	asAfsaguCfaaggu acUfuUfauucusus a	4043	UAAGAAUAAAG UACCUUGACUU U	2572
AD- 1963204	asasuaa(Ahd)G fuAfCfcfuugacu uusgsu	3684	asCfsaaaGfucaag guAfcUfuuauscs u	4044	AGAAUAAAGUA CCUUGACUUUG U	2706
AD- 1963205	asusaaa(Ghd)U faCfCfUfugacu uugsusu	3685	asAfscaaAfgucaag gUfaCfuuuaususc	4045	GAAUAAAGUAC CUUGACUUUGU U	2653
AD- 1963206	usasaag(Uhd)A fcCfUfUfgacuu ugususu	3686	asAfsacaAfagucaa gGfuAfcuuasusu	4046	AAUAAAGUACC UUGACUUUGUU C	2595

AD-1963207	asasagu(Ahd)Cf cUfUfGfacuuug uuscsu	3687	asGfsaacAfaaguc aaGfgUfacuuus u	4047	AUAAAGUACCU UGACUUUGUUC A	2603
AD-1963208	asasgua(Chd)Cf uUfGfAfcuuugu ucsasu	3688	asUfsgaaCfaaagu caAfgGfuacuusus a	4048	UAAAGUACCUU GACUUUGUUCA C	2579
AD-1963211	usasccu(Uhd)G faCfUfUfuguuc acasgsu	3689	asCfsuguGfaacaa agUfcAfagguasc u	4049	AGUACCUUGAC UUUGUUCACAG C	2667
AD-1963218	ascsuuu(Ghd)U fuCfAfCfagcaug uasgsu	3690	asCfsuacAfugcug ugAfaCfaaaguscs a	4050	UGACUUUGUUC ACAGCAUGUAG G	2672
AD-1963219	csusuug(Uhd)U fcAfCfAfgcaugu agsgsu	3691	asCfscuaCfaugcug uGfaAfcaaagsusc	4051	GACUUUGUUCA CAGCAUGUAGG G	2707
AD-1963220	ususugu(Uhd)C faCfAfGfcaugua ggsgsu	3692	asCfscuAfcaugcu gUfgAfacaaasgsu	4052	ACUUUGUUCAC AGCAUGUAGGG U	2744
AD-1963221	ususguu(Chd)A fcAfGfCfauagu ggsusu	3693	asAfscuUfcaugc uGfuGfaacaasag	4053	CUUUGUUCACA GCAUGUAGGGU G	2770
AD-1963222	usgsuuc(Ahd)Cf aGfCfAfguagg gusgsu	3694	asCfsaccCfuacug cUfgUfgaacasasa	4054	UUUGUUCACAG CAUGUAGGGUG A	2803
AD-1963225	uscsaca(Ghd)Cf aUfGfUfagggug ausgsu	3695	asCfsaucAfccuac aUfgCfugugasasc	4055	GUUCACAGCAU GUAGGGUGAUG A	2779
AD-1963237	csasacg(Ghd)Af cCfUfGfagcacu ggscsu	3696	asGfscddAg(Tgn)g cucagGfuCfcguug susg	4056	CACAACGGACCU GAGCACUGGCA	2846
AD-1963239	ascsgga(Chd)Cf uGfAfGfcacugg	3697	asAfsugdCc(Agn) gugcucAfgGfuccg	4057	CAACGGACCUGA GCACUGGCAUA	2825

	casusu		ususg			
AD-1963244	cscsuga(Ghd)Cf aCfUfGfgcauaa ggsasu	3698	asUfscddTu(Agn) ugccagUfgCfucag gsusc	4058	GACCUGAGCAC UGGCAUAAGGA C	2822
AD-1963245	csusgag(Chd)Af cUfGfGfcuaaag gascsu	3699	asGfsucdCu(Tgn) augccaGfuGfcuca gsgsu	4059	ACCUGAGCACU GGCAUAAGGAC U	2781
AD-1963246	usgsagc(Ahd)Cf uGfGfCfauaagg acsusu	3700	asAfsugdCc(Tgn)u augccAfgUfgcuca sgsg	4060	CCUGAGCACUG GCAUAAGGACU U	2757
AD-1963249	gscsacu(Ghd)Gf cAfUfAfaggacu ucscsu	3701	asGfsgadAg(Tgn)c cuuauGfcCfagugc susc	4061	GAGCACUGGCA UAAGGACUUCC C	2693
AD-1963287	gsascua(Ahd)Af aUfGfCfugcuuu uasasu	3702	asUfsuaaAfagcag caUfuUfuagucsas a	4062	UUGACUAAAAU GCUGCUUUUAA A	2609
AD-1963288	ascsuuaa(Ahd)Af uGfCfUfgcuuuu aasasu	3703	asUfsuuaAfaagca gcAfuUfuuaguscs a	4063	UGACUAAAAUG CUGCUUUUAAA A	2677
AD-1963289	csusaaa(Ahd)U fgCfUfGfcuuuu aaasasu	3704	asUfsuuuAfaaagc agCfaUfuuuagsus c	4064	GACUAAAAUGC UGCUUUUAAAA C	2682
AD-1963290	usasaaa(Uhd)G fcUfGfCfuuuua aaascsu	3705	asGfsuuuUfaaaag caGfcAfuuuuasgs u	4065	ACUAAAAUGCU GCUUUUAAAAC A	2570
AD-1963295	usgscug(Chd)Uf uUfUfAfaaacau agsgsu	3706	asCfscuaUfguuuu aaAfaGfcagcasus u	4066	AAUGCUGCUUU UAAAACAUAGG A	2566
AD-1963296	gscsugc(Uhd)Uf uUfAfAfaacaua ggsasu	3707	asUfscuAfuguuu uaAfaAfgcagcsas u	4067	AUGCUGCUUUU AAAACAUAGGA A	2597
AD-	ususuaa(Ahd)A	3708	asCfsuacUfuuccu	4068	CUUUUAAAACA	2772

1963302	fcAfUfAfggaaag uasgsu		auGfuUfuuaaasas g		UAGGAAAGUAG A	
AD- 1963306	csusguu(Ghd)A fcAfUfCfGacacu casusu	3709	asAfsugdAg(Tgn) gucgauGfuCfaaca gsgsg	4069	CCCUGUUGACA UCGACACUCAUA	2592
AD- 1963308	gsusuga(Chd)Af uCfGfAfcacuca uascsu	3710	asGfsuadTg(Agn) gugucgAfuGfucaa csasg	4070	CUGUUGACAUC GACACUCAUACA	2578
AD- 1963311	gsascau(Chd)Gf aCfAfCfucauac agscsu	3711	asGfscudGu(Agn) ugagugUfcGfaugu csasa	4071	UUGACAUCGAC ACUCAUACAGCC	2657
AD- 1963312	ascsauc(Ghd)Af cAfCfUfcuauaca gcscsu	3712	asGfsgcdTg(Tgn)a ugaguGfuCfgaugu scsa	4072	UGACAUCGACAC UCAUACAGCCA	2762
AD- 1963314	asuscga(Chd)Af cUfCfAfuacagcc asasu	3713	asUfsugdGc(Tgn) guaugaGfuGfucga usgsu	4073	ACAUCGACACUC AUACAGCCAAG	2692
AD- 1963318	ascscacu(Chd)Af uAfCfAfgccaag uasusu	3714	asAfsuadCu(Tgn) ggcuguAfuGfagug uscsg	4074	CGACACUCAUAC AGCCAAGUAUG	2632
AD- 1963321	csuscau(Ahd)Cf aGfCfCfaaguau gascsu	3715	asGfsucdAu(Agn) cuuggcUfgUfauga gsusg	4075	CACUCAUACAGC CAAGUAUGACC	2691
AD- 1963322	uscscuaa(Chd)Af gCfCfAfaguaug acscsu	3716	asGfsgudCa(Tgn) acuuggCfuGfuaug asgsu	4076	ACUCAUACAGCC AAGUAUGACCC	2764
AD- 1963323	csasuac(Ahd)Gf cCfAfAfguauga ccscsu	3717	asGfsggdTc(Agn) uacuugGfcUfguau gsasg	4077	CUCAUACAGCCA AGUAUGACCCU	2788
AD- 1963325	usascag(Chd)Cf aAfGfUfaugacc cususu	3718	asAfsagdGg(Tgn)c auacuUfgGfcugua susg	4078	CAUACAGCCAAG UAUGACCCUUC	2780

AD-1963329	gscscaa(Ghd)Uf aUfGfAfcccuuc ccsusu	3719	asAfsggdGa(Agn) gggucaUfaCfuugg csusg	4079	CAGCCAAGUUAU GACCCUUCCCUG	2674
AD-1963375	gsasuaa(Ahd)U fuGfAfGfcuagu uaasgsu	3720	asCfsuaaAfcuagc ucAfaUfuuaucsus u	4080	AAGAUAAAUUG AGCUAGUUAAG G	2798
AD-1963376	asusaaa(Uhd)U fgAfGfCfuaguu aagsgsu	3721	asCfscuuAfacuagc uCfaAfuuuaucsu	4081	AGAUAAAUUGA GCUAGUUAAGG C	2819
AD-1963377	usasaau(Uhd)G faGfCfUfaguua aggscsu	3722	asGfscuuUfaacua gcUfcAfauuuasus c	4082	GAUAAAUUGAG CUAGUUAAGGC A	2784
AD-1963384	gsusaug(Ahd)Cf cCfUfUfccuga agscsu	3723	asGfscudTc(Agn)g ggaagGfgUfcuac susu	4083	AAGUAUGACCC UUCCCUGAAGCC	2830
AD-1963386	csusguc(Uhd)G fuUfUfCfcaug aucsas	3724	asUfsgadTc(Agn) uaggaaAfcAfgaca gsgsg	4084	CCCUGUCUGUU UCCUAUGAUCA A	2560
AD-1963388	gsuscug(Uhd)U fuCfCfUfaugau caasgsu	3725	asCfsuudGa(Tgn) cauaggAfaAfcaga csasg	4085	CUGUCUGUUUC CUAUGAUCAAG C	2573
AD-1963389	uscsgu(Uhd)U fcCfUfAfugauca agscsu	3726	asGfscudTg(Agn) ucauagGfaAfacag ascsa	4086	UGUCUGUUUCC UAUGAUCAAGC A	2577
AD-1963391	usgsuuu(Chd)C fuAfUfGfaucaa gcasasu	3727	asUfsugdCu(Tgn) gaucauAfgGfaaac asgsa	4087	UCUGUUUCCUA UGAUCAAGCAA C	2541
AD-1963392	gsusuuc(Chd)U faUfGfAfucaag caascsu	3728	asGfsuudGc(Tgn) ugaucaUfaGfgaaa csasg	4088	CUGUUUCCUAU GAUCAAGCAAC U	2548
AD-1963395	uscscua(Uhd)G faUfCfAfagcaac	3729	asGfsaadGu(Tgn) gcuugaUfcAfuagg	4089	UUUCCUAUGAU CAAGCAACUCC	2547

	uuscsu		asasa			
AD-1963410	asgscua(Ghd)U fuAfAfGfgcaaa ucasgsu	3730	asCfsugaUfuugcc uuAfaCfuagcuscs a	4090	UGAGCUAGUUA AGGCAAUCAG G	2735
AD-1963411	gscsuag(Uhd)U faAfGfGfcaaa cagsgsu	3731	asCfscugAfuugc cuUfaAfcuagcsus c	4091	GAGCUAGUUA GGCAAUCAGG U	2774
AD-1963417	usasagg(Chd)Af aAfUfCfagguaa aasusu	3732	asAfsuuUfaccug auUfuGfccuusas c	4092	GUUAAGGCAA UCAGGUAAAAU A	2585
AD-1963419	asgsgca(Ahd)Af uCfAfGfguaaaa uasgsu	3733	asCfsuauUfuuacc ugAfuUfugccsus a	4093	UAAGGCAAUC AGGUAAAAUAG U	2698
AD-1963420	gsgscaa(Ahd)Uf cAfGfGfuaaaa agsusu	3734	asAfsuaUfuuuac cuGfaUfuugccsus u	4094	AAGGCAAUCA GGUAAAAUAGU C	2702
AD-1963421	gscsaaa(Uhd)Cf aGfGfUfaaaaa guscsu	3735	asGfsacuAfuuuua ccUfgAfuugcscs u	4095	AGGCAAUCAG GUAAAAUAGUC A	2695
AD-1963430	gsusaaa(Ahd)U faGfUfCfau gau ucusasu	3736	asUfsagaAfucaug acUfaUfuuuacscs u	4096	AGGUAAAAUAG UCAUGAUUCUA U	2775
AD-1963431	usasaaa(Uhd)A fgUfCfAfugauu cuasusu	3737	asAfsuagAfauc gaCfuAfuuuuasc c	4097	GGUAAAAUAGU CAUGAUUCUAU G	2765
AD-1963432	asasaau(Ahd)G fuCfAfUfgauuc uausgsu	3738	asCfsauaGfaauca ugAfcUfauuuusas c	4098	GUAAAAUAGUC AUGAUUCUAUG U	2750
AD-1963437	asgsuca(Uhd)G faUfUfCfuaugu aausgsu	3739	asCfsauuAfcuag aaUfcAfugacusas u	4099	AUAGUCAUGAU UCAUGUAAUG U	4290
AD-	gsusc au(Ghd)A	3740	asAfscauUfacaua	4100	UAGUCAUGAUU	2655

1963438	fuUfCfUfaugua augssusu		gaAfuCfaugacsus a		CUAUGUAAUGU A	
AD- 1963439	uscsaug(Ahd)U fuCfUfAfuguaa ugusasu	3741	asUfsacaUfuacau agAfaUfcaugascs u	4101	AGUCAUGAUUC UAUGUAAUGUA A	2598
AD- 1963464	cscscug(Ahd)Gf gAfUfCfcucaac aasusu	3742	asAfsuudGu(Tgn) gaggauCfcUfcagg gsasa	4102	UUCCCUGAGGA UCCUCAACAAUG	2752
AD- 1963465	cscsuga(Ghd)Gf aUfCfCfucaaca ausgsu	3743	asCfsaudTg(Tgn)u gaggaUfcCfucagg sgsa	4103	UCCCUGAGGAU CCUCAACAAUGG	2736
AD- 1963468	gsasgga(Uhd)Cf cUfCfAfacaau guscsu	3744	asGfsacdCa(Tgn)u guugaGfgAfuccuc sasg	4104	CUGAGGAUCCU CAACAAUGGUC A	2703
AD- 1963469	asgsgau(Chd)Cf uCfAfafcaau ucsasu	3745	asUfsgadCc(Agn) uuguugAfgGfaucc uscsa	4105	UGAGGAUCCUC AACAAUGGUCA U	2713
AD- 1963539	usgscuu(Uhd)C faAfCfGfuggag uuusgsu	3746	asCfsaadAc(Tgn)c cacguUfgAfaagca susg	4106	CAUGC UUCAA CGUGGAGUUUG A	2625
AD- 1963543	ususcaa(Chd)Gf uGfGfAfguuuga ugsasu	3747	asUfscadTc(Agn)a acuccAfcGfuugaa sasg	4107	CUUUCAACGUG GAGUUUGAUGA C	2665
AD- 1963545	csasacg(Uhd)Gf gAfGfUfuugaug acsusu	3748	asAfsagudCa(Tgn)c aaacuCfcAfcguug sasa	4108	UUCAACGUGGA GUUUGAUGACU C	2715
AD- 1963546	asascgu(Ghd)G faGfUfUfugaug acuscsu	3749	asGfsagdTc(Agn) ucaaacUfcCfacgu usgsa	4109	UCAACGUGGAG UUUGAUGACUC U	2694
AD- 1963548	csgsugg(Ahd)Gf uUfUfGfaugacu cuscsu	3750	asGfsagdAg(Tgn)c aucaaAfcUfccacgs usu	4110	AACGUGGAGUU UGAUGACUCUC A	2664

AD-1963550	usgsgag(Uhd)U fuGfAfUfgacuc ucasgsu	3751	asCfsugdAg(Agn) gucaucAfaAfcucc ascsg	4111	CGUGGAGUUUG AUGACUCUCAG G	2613
AD-1963552	gsasguu(Uhd)G faUfGfAfcucuc aggsasu	3752	asUfscddTg(Agn)g agucaUfcAfaacuc scsa	4112	UGGAGUUUGAU GACUCUCAGGA C	2718
AD-1963554	gsusuug(Ahd)U fgAfCfUfcucagg acsasu	3753	asUfsgudCc(Tgn)g agaguCfaUfcaaac susc	4113	GAGUUUGAUGA CUCUCAGGACAA	2741
AD-1963557	usgsaug(Ahd)Cf uCfUfCfaggaca aasgsu	3754	asCfsuudTg(Tgn)c cugagAfgUfcauca sasa	4114	UUUGAUGACUC UCAGGACAAAGC	2612
AD-1963582	usasauu(Ahd)G faGfUfUfgugau acasgsu	3755	asCfsuguAfucaca acUfcUfaauuasus a	4115	UAUAAUUAGAG UUGUGAUACAG A	2786
AD-1963590	gsusugu(Ghd)A fuAfCfAfgagua uaususu	3756	asAfsauaUfacucu guAfuCfacaacsusc	4116	GAGUUGUGAUA CAGAGUAUAUU U	2639
AD-1963591	ususgug(Ahd)U faCfAfGfaguau auususu	3757	asAfsaauAfuacuc ugUfaUfcacaasc u	4117	AGUUGUGAUAC AGAGUAUAUUU C	2636
AD-1963592	usgsuga(Uhd)A fcAfGfAfgua uuuscsu	3758	asGfsaaaUfauacu cuGfuAfuacacas c	4118	GUUGUGAUACA GAGUAUAUUUC C	2644
AD-1963609	asusgac(Uhd)Cf uCfAfGfgacaaa gcsasu	3759	asUfsgcdTu(Tgn)g uccugAfgAfgucau scsa	4119	UGAUGACUCUC AGGACAAAGCA G	2734
AD-1963610	usgsacu(Chd)Uf cAfGfGfacaag casgsu	3760	asCfsugdCu(Tgn) uguccuGfaGfaguc asusc	4120	GAUGACUCUCA GGACAAAGCAG U	2787
AD-1963618	cscauu(Chd)Af gAfCfAfauauau	3761	asAfsugaUfauauu guCfuGfaauggsas	4121	UUCCAUUCAGA CAUAUAUCAU	2552

	casusu		a		A	
AD-1963719	ascsuuc(Ahd)Cf uUfGfGfuucacu ggsasu	3762	asUfscddAg(Tgn)g aaccaAfgUfgaagu susc	4122	GAACUUCACUU GGUUCACUGGA A	2678
AD-1963721	ususcac(Uhd)U fgGfUfUfcacug gaascsu	3763	asGfsuudCc(Agn) gugaacCfaAfguga asgsu	4123	ACUUCACUUGG UUCACUGGAAC A	2704
AD-1963733	gsasuuu(Uhd)G fgGfAfAfagcug ugcsasu	3764	asUfsgcdAc(Agn) gcuuucCfcAfaaa cscsc	4124	GGGAUUUUGGG AAAGCUGUGCA G	2792
AD-1963735	ususuug(Ghd)G faAfAfGfcugugc agscsu	3765	asGfscudGc(Agn) cagcuUfcCfcaaa asusc	4125	GAUUUUGGGAA AGCUGUGCAGC A	2837
AD-1963738	usgsgga(Ahd)Af gCfUfGfugcagc aascsu	3766	asGfsuudGc(Tgn) gcacagCfuUfuccc asasa	4126	UUUGGGAAAGC UGUGCAGCAAC C	2826
AD-1963762	usgsgac(Uhd)G fgCfCfGfuucuag gusasu	3767	asUfsacdCu(Agn) gaacggCfcAfgucca susc	4127	GAUGGACUGGC CGUUCUAGGUA U	2836
AD-1963763	gsgsacu(Ghd)G fcCfGfUfucuagg uasusu	3768	asAfsuadCc(Tgn)a gaacgGfcCfaguccs asu	4128	AUGGACUGGCC GUUCUAGGUAU U	2818
AD-1963776	usasggu(Ahd)U fuUfUfUfuugaa ggususu	3769	asAfsacdCu(Tgn)c aaaaaAfaUfaccua sgsa	4129	UCUAGGUUUUU UUUUGAAGGUU G	2642
AD-1963780	usasuuu(Uhd)U fuUfGfAfagguu ggcsasu	3770	asUfsgcdCa(Agn)c cuucaAfaAfaaa scsc	4130	GGUAUUUUUUU GAAGGUUGGCA G	2785
AD-1963781	asusuuu(Uhd)U fuGfAfAfgguug gcasgsu	3771	asCfsugdCc(Agn)a ccuucAfaAfaaa sasc	4131	GUAUUUUUUUG AAGGUUGGCAG C	2807
AD-	ususuug(Ahd)A	3772	asAfsgcdGc(Tgn)g	4132	UUUUUUGAAGG	2829

1963785	fgGfUfUfggcagc gcsusu		ccaacCfuUfcaaaa sasa		UUGGCAGCGCU A	
AD- 1963790	asasggu(Uhd)G fgCfAfGfcgcuaa acscsu	3773	asGfsgudTu(Agn) gcgugCfcAfacu uscsa	4133	UGAAGGUUGGC AGCGCUAAACCG	2842
AD- 1963814	csusuca(Ghd)Af aAfGfUfuguuga ugsusu	3774	asAfscadTc(Agn)a caacuUfuCfugaag sgsc	4134	GCCUUCAGAAA GUUGUUGAUGU G	2696
AD- 1963816	uscsaga(Ahd)Af gUfUfGfuugaug ugscsu	3775	asGfscadCa(Tgn)c aacaacFuUfucuga sasg	4135	CUUCAGAAAGU UGUUGAUGUGC U	2795
AD- 1963817	csasgaa(Ahd)Gf uUfGfUfugaug ugcsusu	3776	asAfsgcdAc(Agn) ucaacaAfcUfuucu gsasa	4136	UUCAGAAAGUU GUUGAUGUGCU G	2754
AD- 1963819	gsasaag(Uhd)U fgUfUfGfaugug cugsgsu	3777	asCfscadGc(Agn)c aucaaCfaAfcuuuc susg	4137	CAGAAAGUUGU UGAUGUGCUGG A	2820
AD- 1963839	asusucc(Ahd)Uf uAfAfAfacaaag ggscsu	3778	asGfscddCu(Tgn)u guuuuAfaUfggaa uscsc	4138	GGAUUCCAUA AAACAAAGGGCA	2729
AD- 1963840	ususcca(Uhd)U faAfAfAfcaaagg gcsasu	3779	asUfsgcdCc(Tgn)u uguuuUfaAfugga asusc	4139	GAUUCCAUA AAACAAAGGGCAA	2648
AD- 1963845	ususaaa(Ahd)Cf aAfAfGfggcaag agsusu	3780	asAfscudCu(Tgn)g cccuUfgUfuuuua susg	4140	CAUUAAAACAAA GGGCAAGAGUG	2812
AD- 1963846	usasaaa(Chd)Af aAfGfGfgcaaga gusgsu	3781	asCfsacdTc(Tgn)u gcccuUfuGfuuuua sasu	4141	AUUAAAACAAA GGGCAAGAGUG C	2793
AD- 1963848	asasaca(Ahd)Af gGfGfCfaagagu gcsusu	3782	asAfsgcdAc(Tgn)c uugccCfuUfuguuu susa	4142	UAAAACAAAGG GCAAGAGUGCU G	2804

AD-1963850	ascsaaa(Ghd)Gf gCfAfAfgagugc ugsasu	3783	asUfscadGc(Agn) cucuugCfcCfuuug ususu	4143	AAACAAAGGGCA AGAGUGCUGAC	2824
AD-1963853	asasggg(Chd)Af aGfAfGfugcuga cususu	3784	asAfsagdTc(Agn)g cacucUfuGfccuu susg	4144	CAAAGGGCAAG AGUGCUGACUU C	2724
AD-1963855	gsgsgca(Ahd)Gf aGfUfGfcugacu ucsasu	3785	asUfsgadAg(Tgn)c agcacUfcUfugcccs usu	4145	AAGGGCAAGAG UGCUGACUUCA C	2699
AD-1963857	gscsaag(Ahd)Gf uGfCfUfgacuuc acsusu	3786	asAfsagdGa(Agn) gucagcAfcUfcuug cscsc	4146	GGGCAAGAGUG CUGACUUCACU A	2727
AD-1963858	csasaga(Ghd)U fgCfUfGfacuuc acusasu	3787	asUfsagdTg(Agn) agucagCfaCfucuu gscsc	4147	GGCAAGAGUGC UGACUUCACUA A	2649
AD-1963860	asgsagu(Ghd)Cf uGfAfCfuucacu aascsu	3788	asGfsuudAg(Tgn) gaagucAfgCfacuc usug	4148	CAAGAGUGCUG ACUUCACUAACU	4291
AD-1963863	gsusgcu(Ghd)A fcUfUfCfacuaac uuscsu	3789	asGfsaadGu(Tgn) agugaaGfuCfagca csusc	4149	GAGUGCUGACU UCACUAACUUC G	2557
AD-1963864	usgscug(Ahd)Cf uUfCfAfcuaacu ucsgsu	3790	asCfsgadAg(Tgn)u agugaAfgUfcagca scsu	4150	AGUGCUGACUU CACUAACUUCGA	2583
AD-1963870	csusuca(Chd)Uf aAfCfUfucgauc cuscsu	3791	asGfsagdGa(Tgn) cgaaguUfaGfugaa gsusc	4151	GACUUCACUAAC UUCGAUCCUCG	2589
AD-1963871	ususcac(Uhd)Af aCfUfUfcgaucc ucsgsu	3792	asCfsgadGg(Agn) ucgaagUfuAfguga asgsu	4152	ACUUCACUAACU UCGAUCCUCGU	2593
AD-1963893	gscscuc(Chd)Uf uCfCfUfgaaucc	3793	asCfsaadGg(Agn) uucaggAfaGfgagg	4153	UGGCCUCCUUC UGAAUCCUUGG	2688

	uusgsu		cscsa			
AD-1963896	uscscuu(Chd)Cf uGfAfAfuccuug gasusu	3794	asAfsucdCa(Agn) ggauucAfgGfaagg asgsg	4154	CCUCCUUCCUGA AUCCUUGGAUU	2608
AD-1963920	gsgsacc(Uhd)Af cCfCfAfggcucac usgsu	3795	asCfsagdTg(Agn)g ccuggGfuAfggucc sasg	4155	CUGGACCUACCC AGGCUCACUGA	2840
AD-1963922	ascscua(Chd)Cf cAfGfGfcucacu gascsu	3796	asGfsucdAg(Tgn) gagccuGfgGfuagg uscsc	4156	GGACCUACCCAG GCUCACUGACC	2839
AD-1963924	csusacc(Chd)Af gGfCfUfcacuga ccsasu	3797	asUfsggdTc(Agn)g ugagcCfuGfgguag sgsu	4157	ACCUACCCAGGC UCACUGACCAC	2831
AD-1963926	ascscca(Ghd)Gf cUfCfAfcugacca cscsu	3798	asGfsgudGg(Tgn) cagugaGfcCfuggg usasg	4158	CUACCCAGGCUC ACUGACCACCC	2832
AD-1963927	csusccu(Chd)Uf uCfUfGfgaaugu gusgsu	3799	asCfsacdAc(Agn)u uccagAfaGfaggag sgsg	4159	CCCUCCUCUUCU GGAAUGUGUGA	2623
AD-1963929	cscsucu(Uhd)Cf uGfGfAfaugugu gascsu	3800	asGfsucdAc(Agn) cauuccAfgAfagag gsasg	4160	CUCCUCUUCUG GAAUGUGUGAC C	2575
AD-1963931	uscsuuc(Uhd)G fgAfAfUfgugug accsusu	3801	asAfsaggdTc(Agn)c acauuCfcAfgaaga sgsg	4161	CCUCUUCUGGA AUGUGUGACCU G	2645
AD-1963933	ususcug(Ghd)A faUfGfUfgugac cugsgsu	3802	asCfscadGg(Tgn)c acacaUfuCfcagaa sgsa	4162	UCUUCUGGAAU GUGUGACCUGG A	2783
AD-1963936	usgsgaa(Uhd)G fuGfUfGfaccug gaususu	3803	asAfsaudCc(Agn) ggucacAfcAfuucc asgsa	4163	UCUGGAAUGUG UGACCUGGAUU G	2778
AD-	usgsugu(Ghd)A	3804	asAfsagcdAc(Agn)a	4164	AAUGUGUGACC	2805

1963941	fcCfUfGfgauug ugcsusu		uccagGfuCfacaca susu		UGGAUUGUGCU C	
AD- 1963943	usgsuga(Chd)Cf uGfGfAfuugugc ucsasu	3805	asUfsgadGc(Agn) caauccAfgGfucac ascsa	4165	UGUGUGACCUG GAUUGUGCUCA A	2761
AD- 1963946	gsasccu(Ghd)Gf aUfUfGfugcuca agsgsu	3806	asCfscudTg(Agn)g caciaUfcCfaggucs asc	4166	GUGACCUGGAU UGUGCUCAAGG A	2656
AD- 1963948	cscsugg(Ahd)Uf uGfUfGfcucaag gasasu	3807	asUfsucdCu(Tgn) gagcacAfaUfccag gsusc	4167	GACCUGGAUUG UGCUC AAGGAA C	2619
AD- 1963949	csusgga(Uhd)U fgUfGfCfucaagg aascsu	3808	asGfsuudCc(Tgn) ugagcaCfaAfucca gsgsu	4168	ACCUGGAUUGU GCUCAAGGAACC	2581
AD- 1963952	gsasuug(Uhd)G fcUfCfAfggaac ccsasu	3809	asUfsggdGu(Tgn) ccuugaGfcAfcaau cscsa	4169	UGGAUUGUGCU CAAGGAACCCAUC	2763
AD- 1963953	asusugu(Ghd)C fuCfAfAfggaacc casusu	3810	asAfsugdGg(Tgn) uccuugAfgCfaca uscsc	4170	GGAUUGUGCUC AAGGAACCCAUC	2745
AD- 1963957	usgscuc(Ahd)Af gGfAfAfcccauc agscsu	3811	asGfscudGa(Tgn) ggguucCfuUfgagc ascsa	4171	UGUGCUCAAGG AACCCAUCAGCG	2808
AD- 1963958	gscsuca(Ahd)Gf gAfAfCfccaucag csgsu	3812	asCfsgcdTg(Agn)u ggguuCfcUfugagc sasc	4172	GUGCUC AAGGA ACCCAUCAGCGU	2782
AD- 1963960	uscsaag(Ghd)Af aCfCfCfaucagcg uscsu	3813	asGfsacdGc(Tgn)g augggUfuCfcuuga sgsc	4173	GCUCAAGGAACC CAUCAGCGUCA	2794
AD- 1963964	gsgsaac(Chd)Cf aUfCfAfgcgcuca gcsasu	3814	asUfsgcdTg(Agn)c gcugaUfgGfguucc susu	4174	AAGGAACCCAUC AGCGUCAGCAG	2802

AD-1963966	asasccc(Ahd)Uf cAfGfCfugcagc agscsu	3815	asGfscudGc(Tgn) gacgcuGfaUfgggu uscsc	4175	GGAACCCAUCAG CGUCAGCAGCG	2827
AD-1963995	ususgaa(Ahd)U fuCfCfGfuaaac uuasasu	3816	asUfsuadAg(Tgn) uuacggAfaUfuuca ascsa	4176	UGUUGAAAUUC CGUAAACUUA C	2631
AD-1963997	gsasaau(Uhd)C fcGfUfAfaacuu aacsusu	3817	asAfsjudTa(Agn) guuuacGfgAfauu ucsasa	4177	UUGAAAUUCGG UAAACUUAACU U	2584
AD-1963999	asasuuc(Chd)Gf uAfAfAfcuaaac uuscsu	3818	asGfsaadGu(Tgn) aaguuuAfcGfgaau ususc	4178	GAAAUUCGGUA AACUUAACUUC A	2590
AD-1964000	asusucc(Ghd)U faAfAfCfuaaac uucsasu	3819	asUfsgadAg(Tgn) uaaguuUfaCfaggaa ususu	4179	AAAUUCGGUAA ACUUAACUUCA A	2546
AD-1964002	uscscgu(Ahd)Af aCfUfUfaacuuc aasusu	3820	asAfsuudGa(Agn) guuaagUfuUfacgg asasu	4180	AUUCGGUAAAC UUAACUUCAU G	2574
AD-1964003	cscsgua(Ahd)Af cUfUfAfacuuca ausgsu	3821	asCfsaudTg(Agn)a guuaaGfuUfuacgg sasa	4181	UUCGGUAAACU UAACUUCAUG G	2556
AD-1964016	csgsaag(Ahd)Af cUfGfAfuggugg acsasu	3822	asUfsgudCc(Agn) ccaUCAfUfucuc gsgsg	4182	CCCGAAGAACUG AUGGUGGACAA	2767
AD-1964019	asgsaac(Uhd)G faUfGfGfuggac aacsusu	3823	asAfsjudTg(Tgn)c caccaUfcAfguucu susc	4183	GAAGAACUGAU GGUGGACAACU G	2705
AD-1964021	asascug(Ahd)Uf gGfUfGfgacaac ugsgsu	3824	asCfscadGu(Tgn)g uccacCfaUfcaguu scsu	4184	AGAACUGAUGG UGGACAACUGG C	2844
AD-1964022	ascsguga(Uhd)G fgUfGfGfacaac	3825	asGfscddAg(Tgn)u guccaCfcAfucagu	4185	GAACUGAUGGU GGACAACUGGC	2848

	uggscsu		susc		G	
AD-1964024	usgsaug(Ghd)U fgGfAfCfaacugg cgscsu	3826	asGfscgdCc(Agn)g uugucCfCfcauca sgsu	4186	ACUGAUGGUGG ACAACUGGCGCC	2823
AD-1964043	csasgcu(Chd)Af gCfCfAfcugaag aascsu	3827	asGfsuudCu(Tgn) caguggCfuGfagcu gsgsg	4187	CCCAGCUCAGCC ACUGAAGAACA	2814
AD-1964044	asgscuc(Ahd)Gf cCfAfCfugaaga acsasu	3828	asUfsgudTc(Tgn)u cagugGfcUfgagcu sgsg	4188	CCAGCUCAGCCA CUGAAGAACAG	2828
AD-1964046	csuscag(Chd)Cf aCfUfGfaagaac agsgsu	3829	asCfscudGu(Tgn)c uucagUfgGfcugag scsu	4189	AGCUCAGCCACU GAAGAACAGGC	2799
AD-1964047	uscsagc(Chd)Af cUfGfAfagaaca ggscsu	3830	asGfscddTg(Tgn)u cuucaGfuGfgcuga sgsc	4190	GCUCAGCCACUG AAGAACAGGCA	2777
AD-1964049	asgscca(Chd)Uf gAfAfGfaacagg casasu	3831	asUfsugdCc(Tgn)g uucuuCfGfuggcu sgsa	4191	UCAGCCACUGAA GAACAGGCAAA	2728
AD-1964053	ascsuga(Ahd)Gf aAfCfAfggcaaa ucsas	3832	asUfsgadTu(Tgn)g ccuguUfcUfucagu sgsg	4192	CCACUGAAGAAC AGGCAAAUCAA	2621
AD-1964054	csusgaa(Ghd)Af aCfAfGfgcaaa casasu	3833	asUfsugdAu(Tgn) ugccugUfuCfuuca gsusg	4193	CACUGAAGAACA GGCAAAUCAA	2602
AD-1964055	usgsaag(Ahd)Af cAfGfGfcaaauc aasasu	3834	asUfsuudGa(Tgn) uugccuGfuUfcuuc asgsu	4194	ACUGAAGAACA GGCAAAUCAA G	2622
AD-1964056	gsasaga(Ahd)Cf aGfGfCfaaauca aasgsu	3835	asCfsuudTg(Agn) uuugccUfgUfucuu csasg	4195	CUGAAGAACAG GCAAAUCAAGC	2658
AD-	asgsaac(Ahd)Gf	3836	asAfsgcdTu(Tgn)g	4196	GAAGAACAGGC	2749

1964058	gCfAfAfaucaaa gcsusu		auuugCfcUfguucu susc		AAAUCAAGCU U	
AD- 1964059	gsasaca(Ghd)Gf cAfAfAfucaaaag cususu	3837	asAfsagdCu(Tgn) ugauuuGfcCfugu ucsusu	4197	AAGAACAGGCAA AUCAAAGCUUC	2683
AD- 1964060	asascag(Ghd)Cf aAfAfUfcaaagc uuscsu	3838	asGfsaadGc(Tgn) uugauuUfgCfcugu uscsu	4198	AGAACAGGCAAA UCAAGCUUCC	2610
AD- 1964063	asgsgca(Ahd)Af uCfAfAfgcuuc cususu	3839	asAfsagdGa(Agn) gcuuugAfuUfugcc usgsu	4199	ACAGGCAAAUCA AAGCUUCCUUC	2567
AD- 1964064	gsgscaa(Ahd)Uf cAfAfAfgcuucc uuscsu	3840	asGfsaadGg(Agn) agcuuuGfaUfuugc csusg	4200	CAGGCAAAUCAA AGCUUCCUUCA	2568
AD- 1964067	asasauc(Ahd)Af aGfCfUfuccuuc aasasu	3841	asUfsuudGa(Agn) ggaagcUfuUfgauu usgsc	4201	GCAAAUCAAGC UUCUCAAUAU	2564
AD- 1964068	asasuca(Ahd)Af gCfUfUfccuuca aasusu	3842	asAfsuudTg(Agn) aggaagCfuUfugau ususg	4202	CAAAUCAAGCU UCCUCAAUAU	2554
AD- 1964070	uscstaaa(Ghd)Cf uUfCfCfuucaaa uasasu	3843	asUfsuudTu(Tgn) gaaggaAfgCfuug asusu	4203	AAUCAAGCUU CCUCAAUAUA G	2544
AD- 1964072	asasagc(Uhd)U fcCfUfUfcaaaaua agsasu	3844	asUfscudTa(Tgn)u ugaagGfaAfgcuuu sgsa	4204	UCAAGCUUCC UUCAAUAAGA U	2569
AD- 1964073	asasgcu(Uhd)Cf cUfUfCfaaaaua gasusu	3845	asAfsucdTu(Agn) uuugaaGfgAfgcu ususg	4205	CAAAGCUUCCU UCAAAUAAGAU G	2558
AD- 1964075	gscsuuc(Chd)Uf uCfAfAfauaaga ugsgsu	3846	asCfscadTc(Tgn)u auuugAfaGfgaagc susu	4206	AAGCUUCCUUC AAUAAGAUGG U	2563

AD-1964077	ususccu(Uhd)Cf aAfAfUfaagaug guscsu	3847	asGfsacdCa(Tgn)c uuauuUfgAfaggaa sgsc	4207	GCUUCCUCAA AUAAGAUGGUC C	2630
AD-1964078	uscscuu(Chd)Af aAfUfAfagaugg ucscsu	3848	asGfsgadCc(Agn) ucuuauUfuGfaag gasasg	4208	CUUCCUCAA UAAGAUGGUCC C	2687
AD-1964081	ususcaa(Ahd)U faAfGfAfuggucc casusu	3849	asAfsugdGg(Agn) ccaucuUfaUfuuga asgsg	4209	CCUCAAUA GAUGGUCCAU A	2771
AD-1964102	gsuscug(Uhd)A fuCfCfAfaauaa ugasasu	3850	asUfsucdAu(Tgn) auuuggAfuAfcaga csusa	4210	UAGUCUGUAUC CAAUAUGAA U	2545
AD-1964103	uscsugu(Ahd)U fcCfAfAfauaaug aasusu	3851	asAfsuudCa(Tgn) uauuugGfaUfacag ascsu	4211	AGUCUGUAUCC AAUAUGAAU C	2553
AD-1964104	csusgua(Uhd)Cf cAfAfAfuaauga auscsu	3852	asGfsaudTc(Agn) uuauuuGfgAfuac agsasc	4212	GUCUGUAUCCA AAUAUGAAUC U	2627
AD-1964106	gsusauc(Chd)Af aAfUfAfaugaau cususu	3853	asAfsagdAu(Tgn)c auuauUfuGfgaua csasg	4213	CUGUAUCCAAA UAAUGAAUCUU C	2561
AD-1964107	usasucc(Ahd)Af aUfAfAfugaauc uuscsu	3854	asGfsaadGa(Tgn) ucauuUfuUfgga uascsa	4214	UGUAUCCAAAU AAUGAAUCUUC G	2576
AD-1964108	asuscca(Ahd)Af uAfAfUfgaaucu ucsgsu	3855	asCfsgadAg(Agn) uucauuAfuUfugg ausasc	4215	GUAUCCAAUA AUGAAUCUUCG G	2614
AD-1964116	asasuga(Ahd)U fcUfUfCfgggug uuuscsu	3856	asGfsaadAc(Agn) cccgaGfaUfucau usasu	4216	AUAUGAAUCU UCGGGUGUUUC C	2742
AD-1964118	usgsaau(Chd)U fuCfGfGfguguu	3857	asGfsggdAa(Agn) caccgAfaGfauuc	4217	AAUGAAUCUUC GGGUGUUUCCC	2739

	uccscsu		asusu		U	
AD-1964139	ususagc(Uhd)A faGfCfAfcagauc uascsu	3858	asGfsuadGa(Tgn) cugugcUfuAfgcua asasg	4218	CUUUAGCUAAG CACAGAUCUACC	2588
AD-1964140	usasgcu(Ahd)Af gCfAfCfagaucu acscsu	3859	asGfsgudAg(Agn) ucugugCfuUfagcu asasa	4219	UUUAGCUAAGC ACAGAUCUACCU	2635
AD-1964142	gscsuaa(Ghd)Cf aCfAfGfauciac cususu	3860	asAfsagdGu(Agn) gaucugUfgCfuuag csusa	4220	UAGCUAAGCAC AGAUCUACCUU G	2594
AD-1964143	csusaag(Chd)Af cAfGfAfucuaacc uusgsu	3861	asCfsaadGg(Tgn)a gaucuGfuGfcuuag scsu	4221	AGCUAAGCACAG AUCUACCUUGG	2600
AD-1964150	csasgau(Chd)Uf aCfCfUfugguga uususu	3862	asAfsaadTc(Agn)c caaggUfaGfaucug susg	4222	CACAGAUCUACC UUGGUGAUUUG	2580
AD-1964229	asasuua(Ahd)Af uGfUfGfaagacu agsasu	3863	asUfscudAg(Tgn)c uucacAfuUfuuau usasg	4223	CUAAUAAAUG UGAAGACUAGA C	2768
AD-1964267	ascsaac(Uhd)Gf cUfGfUfggcugg uusgsu	3864	asCfsaadCc(Agn)g ccacaGfcAfguugu sgsu	4224	ACACAACUGCUG UGGCUGGUUGG	2845
AD-1964274	csusgug(Ghd)Cf uGfGfUfuggugc uususu	3865	asAfsaadGc(Agn) ccaaccAfgCfcacag scsa	4225	UGCUGUGGCUG GUUGGUGCUUU G	2813
AD-1964284	ususggu(Ghd)C fuUfUfGfuuuau ggusasu	3866	asUfsacdCa(Tgn)a aaciaAfgCfaccas csc	4226	GGUUGGUGCUU UGUUUAUGGUA G	2651
AD-1964289	gscsuuu(Ghd)U fuUfAfUfpgguag uagsusu	3867	asAfscudAc(Tgn)a ccaauAfaCfaaagcs asc	4227	GUGCUUUGUUU AUGGUAGUAGU U	2604
AD-	ususugu(Uhd)U	3868	asAfsaadCu(Agn)	4228	GCUUUGUUUAU	2723

1964291	faUfGfGfuagua guususu		cuaccaUfaAfacaa asgsc		GGUAGUAGUUU U	
AD- 1964292	ususguu(Uhd)A fuGfGfUfaguag uuususu	3869	asAfsaadAc(Tgn)a cuaccAfuAfaacaa sasg	4229	CUUUGUUUAUG GUAGUAGUUUU U	2773
AD- 1964297	asusggu(Ahd)G fuAfGfUfuuuuc ugusasu	3870	asUfsacdAg(Agn) aaaacuAfcUfacca usasa	4230	UUAUGGUAGUA GUUUUUCUGUA A	2617
AD- 1964299	gsgsuag(Uhd)A fgUfUfUfuucug uaascsu	3871	asGfsuudAc(Agn) gaaaaaCfuAfcuac csasu	4231	AUGGUAGUAGU UUUUCUGUAAC A	2748
AD- 1964301	usasgua(Ghd)U fuUfUfUfcugua acascsu	3872	asGfsugdTu(Agn) cagaaaAfaCfuacu ascsc	4232	GGUAGUAGUUU UUCUGUAACAC A	2740
AD- 1964302	asgsuag(Uhd)U fuUfUfCfuguaa cacsasu	3873	asUfsgudGu(Tgn) acagaaAfaAfcuac usasc	4233	GUAGUAGUUUU UCUGUAACACA G	2709
AD- 1964303	gsusagu(Uhd)U fuUfCfUfguaac acasgsu	3874	asCfsugdTg(Tgn)u acagaAfaAfacuac susa	4234	UAGUAGUUUUU CUGUAACACAG A	2730
AD- 1964325	asasuaa(Ghd)A faUfAfafaguacc uusgsu	3875	asCfsaadGg(Tgn)a cuuuuUfuCfuauu ususc	4235	GAAUAAGAAU AAAGUACCUUG A	2708
AD- 1964328	asasgaa(Uhd)A faAfGfUfaccuu gacsusu	3876	asAfsgudCa(Agn) gguacuUfuAfuucu usasu	4236	AUAAGAAUAAA GUACCUUGACU U	2571
AD- 1964329	asgsaau(Ahd)Af aGfUfAfccuuga cususu	3877	asAfsagdTc(Agn)a gguacUfuUfauucu susa	4237	UAAGAAUAAAG UACCUUGACUU U	2572
AD- 1964331	asasuaa(Ahd)G fuAfCfCfuugacu uusgsu	3878	asCfsaadAg(Tgn)c aagguAfcUfuauu scsu	4238	AGAAUAAAGUA CCUUGACUUUG U	2706

AD-1964335	asasgua(Chd)Cf uUfGfAfcuuugu ucsasu	3879	asUfsgadAc(Agn) aagucaAfgGfuacu ususa	4239	UAAAGUACCUU GACUUUGUUCA C	2579
AD-1964337	gsusacc(Uhd)U fgAfCfUfuuguu cacsasu	3880	asUfsgudGa(Agn) caaaguCfaAfggua csusu	4240	AAGUACCUUGA CUUUGUUCACA G	2661
AD-1964338	usasccu(Uhd)G faCfUfUfuguuc acasgsu	3881	asCfsugdTg(Agn)a caaagUfcAfggua scsu	4241	AGUACCUUGAC UUUGUUCACAG C	2667
AD-1964340	csusuug(Ahd)Cf uUfUfGfuucaca gcsasu	3882	asUfsgcdTg(Tgn)g aaciaAfgUfcaagg susa	4242	UACCUUGACUU UGUUCACAGCA U	2618
AD-1964342	ususgac(Uhd)U fuGfUfUfcacag causgsu	3883	asCfsaudGc(Tgn)g ugaacAfaAfgucaa sgsg	4243	CCUUGACUUUG UUCACAGCAUG U	2615
AD-1964346	csusuug(Uhd)U fcAfCfAfgcaugu agsgsu	3884	asCfscudAc(Agn) ugcuguGfaAfcaaa gsusc	4244	GACUUUGUUCA CAGCAUGUAGG G	2707
AD-1964353	csascag(Chd)Af uGfUfAfggguga ugsasu	3885	asUfscadTc(Agn)c ccuacAfuGfcugug sasa	4245	UUCACAGCAUG UAGGGUGAUGA G	2790
AD-1964355	csasgca(Uhd)Gf uAfGfGfgugaug agscsu	3886	asGfscudCa(Tgn)c accuAfcAfugcug susg	4246	CACAGCAUGUA GGGUGAUGAGC A	2800
AD-1964356	asgscau(Ghd)U faGfGfGfugaug agcsasu	3887	asUfsgcdTc(Agn)u caccUfaCfaugcus gsu	4247	ACAGCAUGUAG GGUGAUGAGCA C	2797
AD-1964358	csasugu(Ahd)G fgGfUfGfaugag cacsusu	3888	asAfsgudGc(Tgn)c aucacCfcUfacaug scsu	4248	AGCAUGUAGGG UGAUGAGCACU C	2817
AD-1964388	gsascua(Ahd)Af aUfGfCfugcuuu	3889	asUfsuadAa(Agn) gcagcaUfuUfuagu	4249	UUGACUAAAAU GCUGCUUUUAA	2609

	uasasu		csasa		A	
AD-1964392	asasaau(Ghd)C fuGfCfUfuuuuaa aacsasu	3890	asUfsgudTu(Tgn) aaaagcAfgCfauuu usasg	4250	CUAAAAUGCUG CUUUUAAAACA U	2596
AD-1964395	asusgcu(Ghd)Cf uUfUfUfaaaaca uasgsu	3891	asCfsuadTg(Tgn)u uuuuuAfgCfagcau susu	4251	AAAUGCUGCUU UUAAAACAUAG G	2549
AD-1964397	gscsugc(Uhd)Uf uUfAfAfaacaua ggsasu	3892	asUfscddTa(Tgn)g uuuuuAfaAfgcagc sasusu	4252	AUGCUGCUUUU AAAACAUAGGA A	2597
AD-1964398	csusgcu(Uhd)U fuAfAfafacauag gasasu	3893	asUfsucdCu(Agn) uguuuuAfaAfagca gscsa	4253	UGCUGCUUUUA AAACAUAGGAA A	2591
AD-1964399	usgscuu(Uhd)U faAfAfafcauagg aasasu	3894	asUfsuudCc(Tgn) auguuuUfaAfaagc asgsc	4254	GCUGCUUUUAA AACAUAGGAAA G	2582
AD-1964402	ususuuu(Ahd)A faCfAfUfaggaaa gusasu	3895	asUfsacdTu(Tgn)c cuaugUfuUfuaaa asgsc	4255	GCUUUUAAAAC AUAGGAAAGUA G	2719
AD-1964407	asasaca(Uhd)Af gGfAfAfaguaga ausgsu	3896	asCfsaudTc(Tgn)a cuuucCfuAfuguuu susa	4256	UAAAACAUAGG AAAGUAGAAUG G	2733
AD-1964428	ususgag(Uhd)G fcAfAfafuccaua gcsasu	3897	asUfsgcdTa(Tgn)g gauuuGfcAfcucaa scsc	4257	GGUUGAGUGCA AAUCCAUAGCAC	2711
AD-1964429	usgsagu(Ghd)C faAfAfUfccauag cascsu	3898	asGfsugdCu(Agn) uggauuUfgCfacuc asasc	4258	GUUGAGUGCAA AUCCAUAGCACA	2669
AD-1964449	asasgau(Ahd)Af aUfUfGfagcuag uusasu	3899	asUfsaadCu(Agn) gcucaaUfuUfaucu usgsu	4259	ACAAGAUAAAU UGAGCUAGUUA A	2587
AD-	asgsaua(Ahd)Af	3900	asUfsuadAc(Tgn)	4260	CAAGAUAAAUU	2641

1964450	uUfGfAfgcuagu uasasu		agcucaAfuUfuauc ususg		GAGCUAGUUAA G	
AD- 1964454	asasauu(Ghd)A fgCfUfAfguuaa ggcsasu	3901	asUfsgcdCu(Tgn)a acuagCfuCfaauuu sasusu	4261	AUAAAUUGAGC UAGUUAAGGCA A	2722
AD- 1964455	asasuug(Ahd)G fcUfAfGfuuaag gcasasu	3902	asUfsugdCc(Tgn) uaacuaGfcUfcaau ususa	4262	UAAAUUGAGCU AGUUAAGGCAA A	2676
AD- 1964459	gsasgcu(Ahd)Gf uUfAfAfggcaaa ucsasu	3903	asUfsgadTu(Tgn)g ccuuaAfcUfagcuc sasa	4263	UUGAGCUAGUU AAGGCAAAUCA G	2620
AD- 1964462	csusagu(Uhd)A faGfGfCfaaauc aggsusu	3904	asAfsccdTg(Agn)u uugccUfuAfacuag scsu	4264	AGCUAGUUAAAG GCAAUCAGGU A	2758
AD- 1964464	asgsuua(Ahd)G fgCfAfAfaucagg uasasu	3905	asUfsuadCc(Tgn)g auuugCfcUfuaacu sasg	4265	CUAGUUAAGGC AAAUCAGGUAA A	2638
AD- 1964467	usasagg(Chd)Af aAfUfCfagguaa aasusu	3906	asAfsuudTu(Agn) ccugauUfuGfccuu asasc	4266	GUUAAGGCAAA UCAGGUAAAAU A	2585
AD- 1964468	asasggc(Ahd)Af aUfCfAfgguaaa ausasu	3907	asUfsaudTu(Tgn) accugaUfuUfgccu usasa	4267	UUAAGGCAAAU CAGGUAAAAUA G	2628
AD- 1964471	gscsaaa(Uhd)Cf aGfGfUfaaaaua guscsu	3908	asGfsacdTa(Tgn)u uuaccUfgAfuuuugc scsu	4268	AGGCAAAUCAG GUAAAUAAGUC A	2695
AD- 1964472	csasaau(Chd)Af gGfUfAfaaaauag ucsasu	3909	asUfsgadCu(Agn) uuuuacCfuGfauu ugscsc	4269	GGCAAUCAGG UAAAUAAGUCA U	2670
AD- 1964473	asasauc(Ahd)Gf gUfAfAfaauagu casusu	3910	asAfsugdAc(Tgn)a uuuuuacfcUfgauu usgsc	4270	GCAAUCAGGU AAAUAAGUCAU G	2697

AD-1964475	asuscag(Ahd)U faAfAfafuaguca ugsasu	3911	asUfscadTg(Agn)c uauuuUfaCfcuga ususu	4271	AAAUCAGGUAA AAUAGUCAUGA U	2647
AD-1964477	csasggu(Ahd)Af aAfUfAfgucaug aususu	3912	asAfsaudCa(Tgn)g acuauUfuUfaccug sasu	4272	AUCAGGUAAAA UAGUCAUGAUU C	2626
AD-1964478	asgsgua(Ahd)Af aUfAfGfucauga uuscsu	3913	asGfsaadTc(Agn) ugacuaUfuUfuacc usgsa	4273	UCAGGUAAAAU AGUCAUGAUUC U	2660
AD-1964480	gsusaaa(Ahd)U faGfUfCfaugau ucusasu	3914	asUfsagdAa(Tgn)c augacUfaUfuuuac scsu	4274	AGGUAAAAUAG UCAUGAUUCUA U	2775
AD-1964481	usasaaa(Uhd)A fgUfCfAfugauu cuasusu	3915	asAfsuadGa(Agn) ucaugaCfuAfuuuu ascsc	4275	GGUAAAAUAGU CAUGAUUCUAU G	2765
AD-1964489	uscsaug(Ahd)U fuCfUfAfuguaa ugusasu	3916	asUfsacdAu(Tgn) acauagAfaUfcaug ascsu	4276	AGUCAUGAUUC UAUGUAAUGUA A	2598
AD-1964490	csasuga(Uhd)U fcUfAfUfguaau guasasu	3917	asUfsuadCa(Tgn) uacauaGfaAfucau gsasc	4277	GUCAUGAUUCU AUGUAAUGUAA A	2605
AD-1964493	gsasuuc(Uhd)A fuGfUfAfaugua aacscsu	3918	asGfsgudTu(Agn) cauuacAfuAfgaau csasu	4278	AUGAUUCUAUG UAAUGUAAACC A	2689
AD-1964551	asusgac(Uhd)U fuUfGfAfauuac agasgsu	3919	asCfsucdTg(Tgn)a auucaAfaAfgucau susa	4279	UAAUGACUUUU GAAUUACAGAG A	2654
AD-1964553	gsascuu(Uhd)U fgAfAfUfuacag agasusu	3920	asAfsucdTc(Tgn)g uaauuCfaAfaaguc sasu	4280	AUGACUUUUGA AUUACAGAGAU A	2716
AD-1964578	usasuaa(Uhd)U faGfAfGfuugug	3921	asGfsuadTc(Agn)c aacucUfaAfuuaa	4281	GUUAUAAUUAG AGUUGUGAUAC	2791

	auascsu		sasc		A	
AD- 1964580	usasauu(Ahd)G faGfUfUfgugau acasgsu	3922	asCfsugdTa(Tgn)c acaacUfcUfaauua susa	4282	UAUAAUUAGAG UUGUGAUACAG A	2786
AD- 1964581	asasuua(Ghd)A fgUfUfGfugaua cagsasu	3923	asUfscudGu(Agn) ucacaaCfuCfuaau usasu	4283	AUAAUUAGAGU UGUGAUACAGA G	2685
AD- 1964582	asusuag(Ahd)G fuUfGfUfgauac agasgsu	3924	asCfsucdTg(Tgn)a ucacaAfcUfcuaau susa	4284	UAAUUAGAGUU GUGAUACAGAG U	2714
AD- 1964584	usasgag(Uhd)U fgUfGfAfuacag agusasu	3925	asUfsacdTc(Tgn)g uaucaCfaAfcucua sasusu	4285	AUUAGAGUUUGU GAUACAGAGUA U	2668
AD- 1964586	gsasguu(Ghd)U fgAfUfAfcagagu ausasu	3926	asUfsaudAc(Tgn)c uguauCfaCfaacuc susa	4286	UAGAGUUUGUGA UACAGAGUAUA U	2666
AD- 1964588	gsusugu(Ghd)A fuAfCfAfgagua uaususu	3927	asAfsaudAu(Agn) cucuguAfuCfaca csusc	4287	GAGUUGUGAUA CAGAGUAUAUU U	2639
AD- 1964610	csasuuc(Ahd)Gf aCfAfAfuauauc ausasu	3928	asUfsaudGa(Tgn) auauugUfcUfgaa ugsgsa	4288	UCCAUUCAGACA AUUAUCAUAA	2550
AD- 1964611	asusuca(Ghd)A fcAfAfUfauauc auasasu	3929	asUfsuadTg(Agn) uauauuGfuCfuga ausgsg	4289	CCAUUCAGACAA UAUAUCAUAAC	2555

### Пример 2. Скрининг миРНК к СА2 *in vitro*

#### Методики экспериментов

#### Культура клеток и трансфекции:

Клетки Нер3b или RPE-J (ATCC, Манассас, Виргиния) выращивали практически до конfluence при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в минимальной питательной среде Игла (Gibco) с добавкой 10% FBS (ATCC), а затем высвобождали с планшета путем трипсинизации. Трансфекцию проводили путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса миРНК в отдельную лунку в 96-луночном планшете.

Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем в смесь миРНК добавляли восемьдесят мкл полной среды для выращивания без антибиотика, содержащей  $\sim 2 \times 10^4$  клеток Нер3В. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперименты с однократной дозой проводили при конечной концентрации дуплекса 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

#### **Выделение тотальной РНК с помощью набора для выделения мРНК DYNABEADS:**

Клетки лизировали в 75 мкл буфера для лизиса/связывания, содержащего 3 мкл гранул на лунку, и смешивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере. Стадии промывки проводили автоматически на Biotek EL406 с использованием магнитной подложки для планшета. Гранулы промывали (в 90 мкл) один раз в буфере А, один раз в буфере В и два раза в буфере Е с аспирацией между этими этапами. После последней аспирации в каждую лунку добавляли полную смесь RT объемом 10 мкл, как описано ниже.

#### **Синтез кДНК с помощью набора для обратной транскрипции кДНК высокой производительности ABI (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, № по каталогу 4368813):**

Добавляли на лунку мастер-микс 1 мкл 10X буфера, 0,4 л 25X dNTP, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H<sub>2</sub>O на реакционную смесь. Планшеты закрывали, встряхивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере и затем инкубировали при 37 градусах Цельсия в течение 2 часов. После этого планшеты встряхивали при 80 градусах С в течение 8 минут.

#### **ПЦР в реальном времени:**

Два микролитра (мкл) кДНК добавляли в мастер-микс, содержащий 0,5 мкл зонда TaqMan GAPDH человека, 0,5 мкл зонда CA2 человека, 2 мкл воды без нуклеазы и 5 мкл мастер-микса зонда Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночном планшете (Roche, № по каталогу 04887301001). ПЦР в реальном времени проводили в системе для ПЦР в реальном времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали по меньшей мере два раза и данные нормировали к клеткам, трансфицированным ненацеленной контрольной миРНК. Для расчета относительной кратности изменения данные в реальном времени анализировали с применением способа  $\Delta\Delta C_t$  и нормировали к анализам, проведенным с клетками, трансфицированными ненацеленной контрольной миРНК.

#### **Пример 3. Скрининг однократной дозы *in vitro* миРНК к СА**

##### **Культура клеток и трансфекции:**

Клетки A253 или клетки Hela выращивали практически до конfluence при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в минимальной питательной среде Игла (Gibco) с добавкой 10% FBS (ATCC), а затем высвобождали с планшета путем трипсинизации. Трансфекцию проводили путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по каталогу 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса миРНК в отдельную лунку в 96-луночном планшете. Затем смесь инкубировали

при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем в смесь миРНК добавляли восемьдесят мкл полной среды для выращивания без антибиотика, содержащей  $\sim 1,5 \times 10^4$  клеток A253. Клетки инкубировали в течение 24 часов перед очисткой РНК. Эксперимент с однократной дозой проводили при конечной концентрации дуплекса 10 нМ в клетках A253. Для клеток Hela проводили многодозовый эксперимент при конечной концентрации дуплекса 0,1 нМ, 1 нМ и 10 нМ.

#### **Выделение тотальной РНК с помощью набора для выделения мРНК DYNABEADS:**

Клетки лизировали в 75 мкл буфера для лизиса/связывания, содержащего 3 мкл гранул на лунку, и смешивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере. Стадии промывки проводили автоматически на Biotek EL406 с использованием магнитной подложки для планшета. Гранулы промывали (в 90 мкл) один раз в буфере А, один раз в буфере В и два раза в буфере Е с аспирацией между этими этапами. После последней аспирации в каждую лунку добавляли полную смесь RT объемом 10 мкл, как описано ниже.

#### **Синтез кДНК с помощью набора для обратной транскрипции кДНК высокой производительности ABI (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, № по каталогу 4368813):**

Добавляли на лунку мастер-микс 1 мкл 10X буфера, 0,4 л 25X dNTP, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 л  $H_2O$  на реакционную смесь. Планшеты закрывали, встряхивали в течение 10 минут на электростатическом шейкере и затем инкубировали при 37 градусах Цельсия в течение 2 часов. После этого планшеты встряхивали при 80 градусах С в течение 8 минут.

#### **ПЦР в реальном времени:**

Два микролитра (мкл) кДНК добавляли в мастер-микс, содержащий 0,5 мкл зонда TaqMan GAPDH человека, 0,5 мкл зонда CA2 человека, 2 мкл воды без нуклеазы и 5 мкл мастер-микса зонда Lightcycler 480 (Roche, № по каталогу 04887301001) на лунку в 384-луночном планшете (Roche, № по каталогу 04887301001). ПЦР в реальном времени проводили в системе для ПЦР в реальном времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали по меньшей мере два раза и данные нормировали к клеткам, трансфицированным ненацеленной контрольной миРНК. Для расчета относительной кратности изменения данные в реальном времени анализировали с применением способа  $\Delta\Delta C_t$  и нормировали к анализам, проведенным с клетками, трансфицированными ненацеленной контрольной миРНК. Результаты для клеток A253 показаны в таблице 11, а результаты для клеток Hela показаны в таблице 12. Результаты представлены в виде оставшегося процента мессенджера.

**Таблица 11. Скрининг однократной дозы CA2 в клетках A253**

Название дуплекса	% оставшегося мессенджера CA		Название дуплекса	% оставшегося мессенджера CA	
	Среднее	SD		Среднее	SD

	<b>значение</b>			<b>значение</b>	
AD-1447598	7,20	0,47	AD-1561130	70,78	12,81
AD-1561703	6,89	0,25	AD-1561122	7,10	1,78
AD-1561694	9,47	0,96	AD-1561116	7,00	1,56
AD-1561686	11,90	0,80	AD-1561112	8,15	5,14
AD-1561679	9,05	0,73	AD-1561106	26,09	6,97
AD-1561651	8,50	0,24	AD-1561100	3,10	0,99
AD-1561613	9,92	0,47	AD-1561092	3,09	0,86
AD-1561601	10,70	1,11	AD-1475424	18,12	4,10
AD-1561591	8,82	0,65	AD-1561072	28,20	2,22
AD-1561581	8,17	0,73	AD-1561066	6,47	1,72
AD-1561570	9,46	1,69	AD-1561056	6,94	1,51
AD-1561562	9,92	1,09	AD-1561050	5,54	1,17
AD-1561551	6,50	1,45	AD-1561043	21,07	1,67
AD-1561542	9,21	0,97	AD-1561037	9,53	1,21
AD-1561534	9,59	0,36	AD-1561031	33,42	2,51
AD-1561527	9,25	1,54	AD-1561015	7,38	0,60
AD-1561521	8,37	0,27	AD-1561009	15,37	1,80
AD-1561513	13,07	1,38	AD-1561002	50,31	2,37
AD-1561504	9,70	0,78	AD-1560996	7,63	0,53
AD-1561498	8,73	1,80	AD-1560989	74,31	4,13
AD-1561489	10,24	1,19	AD-1560976	5,17	0,44
AD-1561478	10,18	1,11	AD-1560970	8,59	3,64
AD-1561471	11,22	1,21	AD-1560963	6,77	3,46
AD-1561465	15,01	1,09	AD-1560954	27,23	5,41
AD-1561456	40,43	3,66	AD-1560948	26,42	0,76
AD-1561450	24,74	1,42	AD-1560941	6,44	1,39
AD-1561444	17,51	2,01	AD-1560930	27,16	6,71
AD-1561433	11,61	0,78	AD-1560921	5,44	1,37
AD-1561422	8,20	0,63	AD-1560915	5,44	1,54
AD-1561414	10,20	0,58	AD-1560904	89,40	10,68
AD-1561408	6,88	0,89	AD-1560895	37,15	2,86

AD-1561402	8,58	1,21	AD-1560892	5,67	1,90
AD-1561396	20,33	6,80	AD-1560880	48,60	7,79
AD-1561390	7,95	1,75	AD-1560874	10,82	1,27
AD-1561384	15,34	3,97	AD-1560862	14,92	1,69
AD-1561378	16,76	4,22	AD-1560843	33,98	3,79
AD-1561366	20,14	5,16	AD-1560851	4,79	0,38
AD-1561360	11,28	1,92	AD-1560845	20,26	2,36
AD-1561349	10,47	3,67	AD-1560837	9,58	0,89
AD-1561342	19,22	2,75	AD-1560816	11,19	0,83
AD-1561336	6,48	2,35	AD-1560810	10,58	1,27
AD-1561327	7,80	0,93	AD-1560804	9,93	1,78
AD-1561319	5,93	1,03	AD-1560798	11,16	1,31
AD-1561313	6,39	0,67	AD-1560792	5,26	0,83
AD-1561306	6,03	0,49	AD-1560783	2,91	0,76
AD-1561300	5,62	0,50	AD-1560777	6,73	1,62
AD-1561294	3,77	1,38	AD-1560765	31,74	3,45
AD-1561285	6,79	0,61	AD-1560759	7,85	2,77
AD-1561279	5,80	0,61	AD-1560752	23,53	6,36
AD-1561272	5,68	0,49	AD-1560745	13,34	2,85
AD-1561261	6,74	1,09	AD-1560735	53,63	10,67
AD-1561254	5,60	1,23	AD-1560726	6,10	0,45
AD-1561245	7,01	1,68	AD-1560720	43,72	14,97
AD-1561239	6,15	1,94	AD-1560711	6,65	0,92
AD-1561231	6,36	1,73	AD-1560701	29,81	3,54
AD-1561225	8,26	1,82	AD-1560693	5,41	0,94
AD-1561218	4,88	1,54	AD-1560684	4,00	0,86
AD-1561210	3,65	0,76	AD-1560678	20,06	5,49
AD-1561203	4,31	0,92	AD-1560672	11,26	3,35
AD-1561196	7,63	1,46	AD-1560665	11,82	2,15
AD-1561190	10,83	1,95	AD-1560655	21,40	3,19
AD-1561181	7,36	1,12	AD-1560644	18,35	1,71
AD-1561175	2,23	0,49	AD-1560638	27,36	7,62

AD-1561168	6,44	1,74	AD-1560628	22,60	5,09
AD-1446763	4,73	1,43	AD-1560622	40,19	10,35
AD-1561158	4,31	1,24	AD-1560617	21,41	5,73
AD-1561152	11,35	3,57	AD-1560600	19,85	2,56
AD-1561146	9,71	2,38			

**Таблица 12. Многодозовый скрининг СА2 в клетках HeLa**

Название дуплекса	% оставшегося мессенджера СА					
	Среднее значение 10 нМ	SD 10 нМ	Среднее значение 1 нМ	SD 1 нМ	Среднее значение 0,1 нМ	SD 0,1 нМ
AD-1784188.1	7,4	3,9	10,7	1,5	12,3	2,5
AD-1784196.1	13,2	2,7	15,8	6,5	32,2	9,4
AD-1784204.1	15,1	4,8	21	4,8	37,4	7,7
AD-1784211.1	10,4	3,2	10,1	3,7	16,5	3,5
AD-1784218.1	6,4	1,6	13,3	3,2	21,4	2,9
AD-1784226.1	23,8	2	21,9	4,3	46	9,3
AD-1784233.1	15,7	3,2	19,1	5,9	34,6	6
AD-1784241.1	30,1	5,7	39	6,6	48,9	16,8
AD-1784249.1	12,6	3,1	13,9	4	28,2	8,1
AD-1784256.1	15,6	3,3	19,4	4,4	23,8	1,9
AD-1784263.1	22,8	5,4	25	6,5	31,2	11
AD-1784271.1	14,7	4,4	10,8	1,8	15,6	2,3
AD-1784189.1	17,4	4,3	12,2	3,8	25,9	1
AD-1784197.1	24,4	4,7	29	6,7	33	5,5
AD-1784205.1	18	2,7	22,2	9,6	40,1	9,3
AD-1784212.1	23,8	3,8	13,9	2	30,6	6,8
AD-1784219.1	13,1	5,1	12,4	2,4	26,9	4,1
AD-1784227.1	20,3	4,4	15,1	2,9	28,9	9,1
AD-1784234.1	22,1	3,9	24,6	10,6	35,3	12
AD-1784242.1	38	3,1	41,7	8,6	50,6	7,7
AD-1784250.1	18,2	3,5	20,4	8,5	31,7	9,6
AD-1784257.1	15	4,8	14,4	5,9	24,5	9,9

AD-1784264.1	23,5	6,6	22,8	9	30,6	6,1
AD-1784272.1	15,3	5,1	13,8	7,1	26,8	6
AD-1784190.1	8,8	3,4	10,5	1,5	18,2	4,8
AD-1784198.1	24,4	4,1	25,4	5,1	23,4	8,2
AD-1955	79,5	6,1				
AD-1784220.1	25,3	7,3	25,3	6,2	48,8	10,5
AD-1784228.1	20,2	4,6	16,5	3,4	31,8	6,7
AD-1784235.1	23,4	5,9	23,6	5,8	24,3	2,5
AD-1784243.1	23	6,9	26,4	1,6	24,6	5,9
AD-1784265.1	28,5	9,4	24,1	2,9	31,7	2,4
AD-1784273.1	16,4	5,2	14,4	1,1	31,6	6,1
AD-1784191.1	9,1	4,9	8,7	2,2	20,2	1,2
AD-1784199.1	26,6	8,7	18	2,8	44,8	14,2
AD-1784206.1	25,3	6,8	30,1	9,6	74,8	17,3
AD-1784213.1	25,9	9,1	12,7	1,5	33,3	5,8
AD-1784221.1	29,8	6	34,4	7,6	70,4	14,3
AD-1784229.1	39,8	5,5	36,9	8,1	56,2	5,6
AD-1784236.1	26,9	10	24,6	9	39,8	10,6
AD-1784244.1	22,4	4,9	32,7	10,2	30	5,1
AD-1784251.1	72,8	13,6	77,5	12,6	95,7	34
AD-1784258.1	21,6	7,6	20,8	1,8	24	6,7
AD-1784266.1	16,1	3,4	25,6	2,1	19,4	7,5
AD-1784274.1	53,4	6,3	51,4	14,9	51,5	11,2
AD-1784192.1	15,5	6	12,7	2,9	18,1	4,6
AD-1784200.1	25,1	4,2	22	3,6	26,4	7,7
AD-1784207.1	60,8	8,8	48,1	5,8	98,4	18,9
AD-1784214.1	42,6	9,9	50,2	17,4	120,6	40,2
AD-1784222.1	52,6	10,7	56,4	4,1	85,1	17,5
AD-1784230.1	69,9	5,9	63,4	12,5	123,9	38,2
AD-1784237.1	20,8	2,8	26,7	15,9	50,3	13,8
AD-1784245.1	25	3,9	25,8	8,6	70,6	19,9
AD-1784252.1	46,8	8,5	60,2	16,7	101,9	24,6

AD-1784259.1	29,4	4,6	19,1	3,5	23,1	5
AD-1784267.1	32,3	3,4	29,1	4,5	34,3	12,5
AD-1784275.1	24,9	6,8	38,6	9,8	34,9	10,6
AD-1784193.1	19,5	5,2	19	4,1	23,6	9
AD-1784201.1	32,3	1,2	22,8	3,4	34,4	5,3
AD-1784208.1	66,4	7,8	63,2	20,5	90,2	21,9
AD-1784215.1	52,8	10,5	56,7	12,6	72,6	7,7
AD-1784223.1	77,3	25,6	69,2	17,5	87	29,8
AD-1784231.1	29,8	6,5	27,9	4,4	32,1	13,3
AD-1784238.1	13,1	1,8	25,9	8,8	37,9	7,4
AD-1784246.1	35,5	8,8	41,9	15,7	38,3	10,6
AD-1784253.1	23,8	5,2	21,3	2,6	34,7	9,7
AD-1784260.1	33,1	9,8	18,8	6,1	23,1	6,8
AD-1784268.1	25,1	3	18,6	7,5	29,7	13,2
AD-1784276.1	29,1	12,1	24,7	7,8	50	10,4
AD-1784194.1	18,7	6,1	16,1	5,8	29,1	9,3
AD-1784202.1	63	4,5	53,5	5,7	56,6	5,7
AD-1784209.1	19,2	5,4	16,2	2	25,7	3
AD-1784216.1	23,4	4,8	19,9	5,1	33,1	8,1
AD-1784224.1	49,9	6,3	33,8	6	38,7	11
AD-1784232.1	34,9	1,9	60,7	12,4	54,5	12,2
AD-1784239.1	15,9	5,5	17,9	7,2	21,9	7,2
AD-1784247.1	15,8	2,2	17	4,2	28,1	3,6
AD-1784254.1	42,5	10,2	39,8	14,8	46,6	13,5
AD-1784261.1	38,9	6,3	31,5	11,6	35,8	9,1
AD-1784269.1	36,1	8,3	29,6	10,6	40,4	7,7
AD-1784277.1	15,5	4,4	19,8	8,5	20	8,6
AD-1784195.1	13,1	5,3	13	5,1	19,6	2,6
AD-1784203.1	43,5	5,1	24,6	2,5	43,5	13,4
AD-1784210.1	18,7	2,3	17,4	6,4	36,2	8,5
AD-1784217.1	44	7,8	33,4	10,7	61,5	19,7
AD-1784225.1	49,9	9,5	53,3	17,1	59,7	18,9

AD-1784240.1	25	7,5	21,4	11,6	46,1	9
AD-1784248.1	36,8	10,1	20,4	4,5	76,8	12
AD-1784255.1	60,4	14,7	54,7	21,1	65,3	16,7
AD-1784262.1	13,4	3	27,9	8	40	12
AD-1784270.1	39,5	11,6	41,7	12,8	28,2	4,8
AD-1784458.1	26,6	1	22,6	7	22,6	7
AD-1784466.1	26	3,1	18	4,6	24,1	6
AD-1784474.1	12,5	2,3	18,1	5,2	16,5	4
AD-1784481.1	13,8	3,9	17,3	3	25,2	6
AD-1784488.1	10,2	4,6	14,4	5,8	21,4	4,2
AD-1784496.1	24,7	5,8	50,6	4	69,1	14,9
AD-1784503.1	31,4	4,6	64,7	18,4	67,8	10,3
AD-1784511.1	17,8	0,7	23,5	4,8	54	13,8
AD-1784519.1	39,7	9,7	52,2	12,3	56,2	10,2
AD-1784526.1	37	6,1	48,6	12,4	51,2	2,4
AD-1784533.1	12	3,5	16,4	6	38,2	10
AD-1784541.1	59,3	13,2	34,8	5,8	42,1	10,2
AD-1784459.1	42,7	10,2	38,4	3,4	51	7,4
AD-1784467.1	16,9	4,3	27,8	4,5	46,5	13
AD-1784475.1	16,9	1,8	14,4	4,8	21,2	3,9
AD-1784482.1	24,8	4,6	29,8	6,6	59,6	15,2
AD-1784489.1	25,7	5,1	20,6	5	38,5	6,4
AD-1784497.1	66,4	18,4	67,3	7,6	74	15,3
AD-1784504.1	13,5	4,5	25,1	9,6	24,3	3,4
AD-1784512.1	37,7	10,7	41,8	10,5	46,7	15,9
AD-1784520.1	11,1	3,9	22,5	4,7	28,1	7,2
AD-1784527.1	30,6	9,3	36,9	9,6	45,4	22,2
AD-1784534.1	13,9	5,7	20,4	4,7	32,5	8,9
AD-1784542.1	22,2	4,1	13,8	5,1	28,3	11,9
AD-1784460.1	13,5	1,3	21,2	2,6	24,3	5,6
AD-1784468.1	36,4	8,5	44,7	8,5	53,6	13,7
AD-1784490.1	29,2	9,6	24,4	6,3	38,9	5,5

AD-1784498.1	51,8	4,2	71,4	5,6	96,9	3,5
AD-1784505.1	31	9,6	50,9	5,9	46,1	3,5
AD-1784513.1	57,4	14,8	51,5	9,9	63	4,5
AD-1784535.1	42,5	8,8	30,3	5,2	53,9	5,1
AD-1784543.1	14	0,5	28,9	4,1	46,4	4,1
AD-1784461.1	18	5,7	17,5	5,4	23	6,2
AD-1784469.1	72,7	13,2	65,3	10	44,9	8,2
AD-1784476.1	29,9	5,5	36,7	4,8	54,1	7,2
AD-1784483.1	34,4	3,4	52,9	12,9	71,4	10,3
AD-1784491.1	30,9	8,7	44,5	11,3	78,2	16,1
AD-1784499.1	132,2	30,7	91,9	28,5	114,8	20,2
AD-1784506.1	51	16,8	78,8	22	108,9	26,3
AD-1784514.1	26,4	8,4	38,8	4,9	36,9	15,8
AD-1784521.1	58,5	16	71,2	12,6	98,8	18
AD-1784528.1	47,6	6,6	56,7	13	69,4	9
AD-1784536.1	74,9	11,5	43,2	9,4	107,7	31,8
AD-1784544.1	39,1	6,3	74,5	3,5	65,1	21,6
AD-1784462.1	19,1	1,2	22,1	0,5	25,4	2,8
AD-1784470.1	35,1	10	45,4	11,7	64,1	11,1
AD-1784477.1	33,1	7,8	45,5	7,3	60,3	6,7
AD-1784484.1	24,3	2,4	28,7	3,4	39,9	1,8
AD-1784492.1	48,1	13,1	56,6	12	82,4	10,4
AD-1784500.1	40,3	6,9	33,4	16,8	58,6	1
AD-1784507.1	47,2	13,5	62,6	20,5	71,9	13,1
AD-1784515.1	29,1	1,9	59,6	19,7	86,9	25,1
AD-1784522.1	29,6	4,9	38,4	0,8	61,1	20,6
AD-1784529.1	98,4	22,8	88,5	20,4	64,6	15,5
AD-1784537.1	20,5	8,2	18,2	6,6	55,7	5,6
AD-1784545.1	38	10,1	26	2,8	58,3	10,4
AD-1784463.1	50	15,3	58	10,4	52,4	6,6
AD-1784471.1	30,1	2,1	47,8	10,7	50,3	7,1
AD-1784478.1	53,8	8,6	64,9	8,3	68,1	15,6

AD-1784485.1	23,8	7,1	28,5	8,5	32,9	4,9
AD-1784493.1	34,5	10,1	33,5	11,7	48,4	14,7
AD-1784501.1	78,8	20,3	70,4	28,6	89,6	23,1
AD-1784508.1	21,4	5,8	46	9,5	42,5	19,5
AD-1784516.1	31,1	5,7	66,3	17,3	76	24,5
AD-1784523.1	40,9	13	60,2	12,3	70,1	21,4
AD-1784530.1	61,2	18,8	62,2	10,8	63,8	18,8
AD-1784538.1	79,1	26,9	73,2	13,2	73,8	38,3
AD-1784546.1	21,9	7,1	17,3	7,3	40	13,6
AD-1784464.1	44,3	8,1	50,6	15,3	71,4	11,4
AD-1784472.1	26,5	3,8	29,7	8,7	29,5	6,5
AD-1784479.1	26,6	3,9	38,9	6,4	58,9	16,9
AD-1784486.1	26,2	8,9	50,5	10,7	47,6	11,2
AD-1784494.1	25,2	6,6	54,1	16,8	40,7	10,5
AD-1784502.1	93,8	15,5	74,6	20,4	92,5	26,3
AD-1784509.1	45	6,2	41,3	11,5	60,7	15,7
AD-1784517.1	29	7,6	30,4	6,9	48,9	11,3
AD-1784524.1	77	23,1	75	23,6	75,9	26,8
AD-1784531.1	43,8	7,1	38	12,8	92,8	22,1
AD-1784539.1	30,5	4	27,7	22	50	16,9
AD-1784547.1	25,3	1,2	22,8	6,8	46,3	18,8
AD-1784465.1	30,6	7,8	45,5	11,9	46,5	15,2
AD-1784473.1	27,4	5,4	26,3	7,3	44,9	6,6
AD-1784480.1	47,5	9,9	67,9	13,8	60,1	13,6
AD-1784487.1	34	12,8	37,3	7,1	45,5	13
AD-1784495.1	37	6,7	79,2	22,2	74,7	6
AD-1784510.1	26,5	6,6	23	4,8	36,1	11,5
AD-1784518.1	48,2	13,8	82,2	12,4	82,7	23,5
AD-1784525.1	78,7	25,6	103	34,2	88,9	21,9
AD-1784532.1	29,5	4,2	32,4	8,7	53,5	24,5
AD-1784540.1	106,9	27,5	86,8	21	94,4	31,8
AD-1784278.1	15	3,3	15	8,5	23,3	7,1

AD-1784286.1	12,7	4,1	16,3	5,2	24,7	2,7
AD-1784294.1	31,7	2,9	41,4	6,9	36,7	6,6
AD-1784301.1	60,4	9,6	73,2	11,8	71,4	13
AD-1784308.1	11	3,4	18	3,2	38,8	10
AD-1784316.1	15,4	4,2	20,5	3,3	40,3	2,7
AD-1784323.1	21,2	7,5	36,4	7,3	33,9	6,6
AD-1784331.1	17,2	7,4	31,7	8,2	31	4,5
AD-1784339.1	17,6	5,5	19,4	2,8	8,4	3,2
AD-1784346.1	13,1	3,3	13,6	3	23,4	6,1
AD-1784353.1	12,1	8,1	10,2	3,6	13,3	3,2
AD-1784361.1	14,9	5,8	12,1	2,5	24,5	7,5
AD-1784279.1	12,3	3,6	20,4	6,3	31,4	7
AD-1784287.1	47,8	10,5	45,7	1,1	45,4	7,3
AD-1784295.1	13,3	4	14,5	6,5	15,5	4,9
AD-1784302.1	19,3	2,7	20,5	3,4	22,7	6,8
AD-1784309.1	26,9	4,8	26,6	4,2	39,7	8,7
AD-1784317.1	14,4	7,6	20	3	64,2	16,2
AD-1784324.1	30,4	7,3	53,2	11,4	24,8	6,9
AD-1784332.1	9,6	4,1	23	9,5	37,7	8
AD-1784340.1	29,8	10,4	38,4	14	43,4	28,7
AD-1784347.1	14,4	4	17,4	7,3	37,9	15
AD-1784354.1	28,4	11,4	29,5	7,4	31,9	5,5
AD-1784362.1	12,1	8,6	22,4	10,6	29,3	12,1
AD-1784280.1	19,6	6,7	22,4	3,1	33,9	11,5
AD-1784288.1	26,4	6,3	44,4	8,1	60,3	12,2
AD-1784310.1	19,6	5,7	51,2	12,8	60,7	14,6
AD-1784318.1	53	9,7	114,8	43,9	84,4	10,1
AD-1784325.1	26,7	5,8	36,3	11,1	38,3	12,7
AD-1784333.1	18,6	5,9	35,7	4,7	38,1	7,4
AD-1784355.1	23,2	6,1	28,6	6,8	50,3	8,3
AD-1784363.1	11,2	5,6	19,2	7,6	28,5	4,7
AD-1784281.1	15,1	5,9	16,4	4,3	23,1	3,1

AD-1784289.1	53,4	10,1	43,7	7,6	60,6	12,1
AD-1784296.1	60,6	10,9	36,5	9,4	85,8	22
AD-1784303.1	32,1	6,8	38,6	1	38,6	4,1
AD-1784311.1	40,2	4	43,2	13,1	81,6	8,8
AD-1784319.1	28,7	2,4	26,5	0,3	50	17,6
AD-1784326.1	35,8	8,3	41,8	5,9	65,1	16,4
AD-1784334.1	36	9	55,2	12,1	46,5	10,9
AD-1784341.1	38,6	8,8	40,7	8,4	40,2	8,8
AD-1784348.1	23	9,2	28,2	3	44,5	7,6
AD-1784356.1	18,1	8,1	23	7,4	39,7	6,8
AD-1784364.1	14,2	6,5	18,3	10,7	36,7	21,7
AD-1784282.1	20,5	3,7	24,7	2	25	4,1
AD-1784290.1	32,9	6,2	34	7,9	36,1	6
AD-1784297.1	56,2	6,6	52,3	8,1	50,5	13,6
AD-1784304.1	98,2	9,8	101,8	9,5	103,8	13,7
AD-1784312.1	42,8	2,3	43,7	9,7	72,8	15
AD-1784320.1	41,8	4,3	39,3	7,5	83,3	18,2
AD-1784327.1	26,3	2,8	32,9	6,2	59,8	4,9
AD-1784335.1	21,6	2	48,9	9,4	46,4	11,9
AD-1784342.1	24,9	9,4	36,3	6,1	34,4	8,4
AD-1784349.1	19,7	7,5	22,5	3,5	35,8	7,1
AD-1784357.1	17	4,8	31	8,8	51,7	14,1
AD-1784365.1	31,2	1,9	59,4	3,9	58,6	5,5
AD-1784283.1	25,7	4,6	27,4	10,2	22,1	6,4
AD-1784291.1	24,8	5,1	19,6	7,4	34,5	10,2
AD-1784298.1	23,1	6,2	29,6	11,7	27,2	4,1
AD-1784305.1	28,8	7,3	23,2	2,8	27,8	9,7
AD-1784313.1	34,9	7,8	31,9	7,4	43,1	6,1
AD-1784321.1	31,1	9,4	39,2	2,6	55,4	8,6
AD-1784328.1	40,5	9,9	50,2	8,3	60,2	11,1
AD-1784336.1	20	5,8	36	5,3	33,7	9,5
AD-1784343.1	20,7	1,8	30,4	9,1	61,8	7,4

AD-1784350.1	17,4	9,9	34,4	7,8	84,8	9,2
AD-1784358.1	20,2	11	19,2	1,7	42,8	11,8
AD-1784366.1	20,4	10,9	19,2	4,6	38	13,3
AD-1784284.1	33,2	9,7	32	1,1	33,5	0,6
AD-1784292.1	23,7	6,8	31,7	6,1	38,5	12,6
AD-1784299.1	30,4	6,8	34,9	10,4	36,9	1,9
AD-1784306.1	34,2	8,6	45,3	8,1	52,9	6,8
AD-1784314.1	46,2	11,5	87,7	7,7	54,5	3,2
AD-1784322.1	43	9,2	83,4	10	94,9	20,4
AD-1784329.1	15,8	6,1	30,4	10,4	39,8	11,8
AD-1784337.1	29,3	7,8	42,1	10,5	46,3	15,9
AD-1784344.1	45,4	15,2	33,3	1,3	50,7	22,5
AD-1784351.1	20,5	10,4	28,2	8,4	47,8	12,7
AD-1784359.1	14,2	1,3	42,2	12,6	33,8	4,8
AD-1784367.1	16,3	7,9	25,2	9	27,4	5,7
AD-1784285.1	24	3,7	19,1	1,5	21,5	3,3
AD-1784293.1	26,2	5,4	21,3	5	18	3,7
AD-1784300.1	24,3	6,9	38,7	6	36,8	7,1
AD-1784307.1	32,9	8,2	52,5	8,6	44,3	10,1
AD-1784315.1	25	12,1	64,4	10,2	69,2	18,3
AD-1784330.1	27,8	8,9	35,1	2,7	45,7	1,2
AD-1784338.1	24,4	10,8	36	7,2	49,5	13,8
AD-1784345.1	23,7	9,6	45,3	10,6	64,7	19
AD-1784352.1	16,5	7,1	26,5	7,6	46,6	12,4
AD-1784360.1	23,4	1,2	66,1	14,9	66,1	21
AD-1784368.1	8,6	2,2	12,6	3,6	21,5	2,2
AD-1784384.1	14,5	5,4	37,3	9,8	34	1
AD-1784391.1	16,2	1,8	24,6	5,6	22,9	4,1
AD-1784398.1	18,9	4,3	18,8	2,3	8,4	2,1
AD-1784406.1	36,1	9,8	45	18,6	38,2	7,6
AD-1784413.1	23	3,3	16	3	36,4	7,9
AD-1784421.1	22,8	3,3	16,1	3,3	25	1,9

AD-1784429.1	16,9	3,4	18,1	5	34	6,9
AD-1784436.1	13,5	6,2	35,1	3,6	32,5	9,4
AD-1784443.1	22	9	28,9	6,6	50,3	11,5
AD-1784451.1	16,9	7,2	19,3	5,7	21,4	4,2
AD-1784369.1	15	2,7	12,4	1,8	22,6	2,8
AD-1784377.1	32,5	2,8	33,4	8	33,1	9,4
AD-1784385.1	25,6	3,2	65,1	20,8	41,5	11,3
AD-1784392.1	20,2	4,1	59,2	11,1	43,3	18,8
AD-1784399.1	30,8	9,1	31,2	3,8	19,9	4,9
AD-1784407.1	35,6	9,6	35,1	2,8	31,5	4,6
AD-1784414.1	35,5	7,8	30,7	3,5	34	13
AD-1784422.1	10,8	1,4	17,8	3,2	21,8	8,1
AD-1784430.1	13,5	3,5	21,2	7,5	21,2	4,9
AD-1784437.1	25,3	8,1	37,8	5,8	35,1	8,3
AD-1784444.1	11,2	5,6	18,3	3	15,4	3,5
AD-1784452.1	10,7	4,9	12,4	6,2	22,5	9,2
AD-1784370.1	24,4	6,4	24,3	3,1	34,7	11
AD-1784378.1	14,2	5,7	41,9	13,1	32,7	7,7
AD-1784400.1	55,7	12,3	87,4	16,5	66,6	14
AD-1784408.1	81,7	21,8	88	18,2	46,2	1,5
AD-1784415.1	74,8	15,3	74,9	18,4	89	12,7
AD-1784423.1	30,1	5	30,7	4,7	43,6	6,3
AD-1784445.1	25,5	2,7	39,5	11,1	39,3	10,9
AD-1784453.1	31,2	6,5	26,4	11,6	17,6	7
AD-1784371.1	24,2	1,9	25,7	7,1	36,4	5
AD-1784379.1	32,9	3,3	60	13,9	59,7	12,1
AD-1784386.1	32,7	2,9	54,2	15,7	48,7	21,5
AD-1784393.1	33,8	3,6	46,8	15,6	34,8	7,6
AD-1784401.1	51,3	15,2	63,4	28,2	45,8	7
AD-1784409.1	72,2	8,5	79,6	20,1	54,6	12,5
AD-1784416.1	42,4	12,3	55,9	16,2	48,9	2,7
AD-1784424.1	22,9	7,1	49,6	21,5	50,4	10,4

AD-1784431.1	20,1	3,5	36,3	6,3	52,1	10,2
AD-1784438.1	34,1	9,1	36,6	9,3	39,7	8,4
AD-1784446.1	43,4	8,7	63,9	10,2	88	24,2
AD-1784454.1	33,2	9,2	22,5	3,3	33,8	11,6
AD-1784372.1	22,8	3,7	29,4	6,7	24,2	3,2
AD-1784380.1	53,5	18,4	80,5	9,8	70,8	13,8
AD-1784387.1	28,5	5,4	53,4	27,4	51	1,9
AD-1784394.1	34	5,9	92,8	24,5	70,6	8,4
AD-1784402.1	43,7	6,3	65,4	16,2	42,8	14,7
AD-1784410.1	77,9	12,3	106,6	26,1	82,8	7,8
AD-1784417.1	25,2	6,8	45,4	7,9	53,3	12,4
AD-1784425.1	30,4	9	40,5	12	39,3	8,8
AD-1784432.1	63	17,4	64	19,8	70,6	13,2
AD-1784439.1	37,6	9,1	46,9	15,2	44,7	12,9
AD-1784447.1	32,4	8,1	50,5	19,1	44,2	2,2
AD-1784455.1	42,7	11,6	60,9	3,1	75,9	12,2
AD-1784373.1	15,7	5,9	37,1	13,7	40,8	4,7
AD-1784381.1	47,1	12,1	106,9	9,6	71,4	9,2
AD-1784388.1	32,2	5,6	38,4	8,6	27,9	8,8
AD-1784395.1	31	8,3	69,2	8,8	32,7	9,5
AD-1784403.1	27,2	10,8	88	15,5	40,6	6,6
AD-1784411.1	27,8	3,2	47,3	3,6	48,6	7,1
AD-1784418.1	22,6	0,5	62,9	8,9	68,7	23,1
AD-1784426.1	26,2	8	37,5	9,8	33,7	9,7
AD-1784433.1	70,9	22,4	76,7	28,8	55	13,4
AD-1784440.1	29,5	8,3	36,7	11,7	43,7	12,9
AD-1784448.1	47,4	15	43,2	16,8	62,6	21,7
AD-1784456.1	15	0,8	35,8	6,5	25	7
AD-1784382.1	26	7,1	57,6	27	45,1	11,4
AD-1784389.1	29,6	8,3	64,5	11,1	55,9	2,4
AD-1784396.1	33,6	8,3	73,3	13,1	46,8	7,8
AD-1784404.1	28,3	5,6	45,7	10,2	58,1	10,2

AD-1784412.1	46,9	16,2	97,1	12,2	79,9	16,7
AD-1784419.1	20,5	5,4	58	6,9	36,9	7,6
AD-1784427.1	55,7	13,1	56,5	5,6	67,5	11,8
AD-1784434.1	37,8	0	41	13,1	45,1	8,4
AD-1784441.1	64,6	22	106,3	18,5	79,5	23,7
AD-1784449.1	18,9	3,4	55,5	5,4	35,6	4
AD-1784457.1	24,8	10,7	39,5	16,5	54,1	10,8
AD-1784375.1	23,4	10,5	32	1,7	45,8	11,2
AD-1784383.1	23,3	5,7	42,7	18,5	54	12,9
AD-1784390.1	30,9	6,4	72,2	22,6	50	16,2
AD-1784397.1	25,4	4,2	33,6	9,5	30,1	6,1
AD-1784405.1	65,2	19	143,6	50,9	110,5	38,4
AD-1784420.1	22,4	3,6	29,8	6,2	52,2	11,2
AD-1784428.1	22,1	2,2	55,9	15,1	54,5	2,3
AD-1784435.1	26,4	11,1	81,9	10,3	43,4	0,5
AD-1784442.1	23,9	7,1	46,6	13,4	40,5	13,5
AD-1784450.1	20	0,8	46,5	12	47,3	14,6

### Последовательности CA2

SEQ ID NO:1

> NM\_000067.3 Карбоангидраза 2 Homo sapiens (CA2), вариант транскрипта 1, мРНК

ACACAGTGCAGGCGCCCAAGCCGCCGCCAGATCGGTGCCGATTCCTGCC  
CTGCCCCGACCGCCAGCGCGACCATGTCCCATCACTGGGGGTACGGCAAACAAC  
GGACCTGAGCACTGGCATAAGGACTTCCCCATTGCCAAGGGAGAGCGCCAGTCCCC  
TGTTGACATCGACACTCATACAGCCAAGTATGACCCTTCCCTGAAGCCCCTGTCTGT  
TTCCTATGATCAAGCAACTTCCCTGAGGATCCTCAACAATGGTCATGCTTTCAACGT  
GGAGTTTGATGACTCTCAGGACAAAGCAGTGCTCAAGGGAGGACCCCTGGATGGCA  
CTTACAGATTGATTCAGTTTCACTTTCCTGAGGATCCTCAACAATGGTCATGCTTTCAACGT  
AGCATACTGTGGATAAAAAGAAATATGCTGCAGAACTTCACTTGGTTCCTGGAAC  
ACCAAATATGGGGATTTTGGGAAAGCTGTGCAGCAACCTGATGGACTGGCCGTTCT  
AGGTATTTTTTTGAAGGTTGGCAGCGCTAAACCGGGCCTTCAGAAAGTTGTTGATGT  
GCTGGATTCCATTAACAAGGGCAAGAGTGCTGACTTCACTAACTTCGATCCTCG  
TGGCCTCCTTCCCTGAATCCTTGGATTACTGGACCTACCCAGGCTCACTGACCACCCCT  
CCTCTTCTGGAATGTGTGACCTGGATTGTGCTCAAGGAACCCATCAGCGTCAGCAGC  
GAGCAGGTGTTGAAATTCGTAACCTTCAATGGGGAGGGTGAACCCGAAGA  
ACTGATGGTGGACAACCTGGCGCCCAGCTCAGCCACTGAAGAACAGGCAAATCAAAG  
CTTCTTCAAATAAGATGGTCCCATAGTCTGTATCCAAATAATGAATCTTCGGGTGT

TTCCCTTTAGCTAAGCACAGATCTACCTTGGTGATTTGGACCCTGGTTGCTTTGTGTC  
 TAGTTTTCTAGACCCTTCATCTCTTACTTGATAGACTTACTAATAAAAATGTGAAGACT  
 AGACCAATTGTCATGCTTGACACAACCTGCTGTGGCTGGTTGGTGCTTTGTTTATGGT  
 AGTAGTTTTTCTGTAACACAGAATATAGGATAAGAAATAAGAATAAAGTACCTTGA  
 CTTTGTTCACAGCATGTAGGGTGATGAGCACTACAATTGTTGACTAAAATGCTGCT  
 TTAAAACATAGGAAAGTAGAATGGTTGAGTGCAAATCCATAGCACAAAGATAAATT  
 GAGCTAGTTAAGGCAAATCAGGTAAAATAGTCATGATTCTATGTAATGTAAACCAG  
 AAAAAATAAATGTTTCATGATTTCAAGATGTTATATTAAGAAAACTTTAAAAATTA  
 TTATATATTTATAGCAAAGTTATCTTAAATATGAATTCTGTTGTAATTTAATGACTTT  
 TGAATTACAGAGATATAAATGAAGTATTATCTGTAAAAATTGTTATAATTAGAGTTG  
 TGATACAGAGTATATTTCCATTCAGACAATATATCATAACTTAATAAATATTGTATTT  
 TAGATATATTCTCTAATAAAAATTCAGAATTCTA

SEQ ID NO:2

>Обратный комплемент SEQ ID NO:1

TAGAATTCTGAATTTTATTAGAGAATATATCTAAAATACAATATTTATTAAGT  
 TATGATATATTGTCTGAATGGAAATATACTCTGTATCACAACCTCTAATTATAACAAT  
 TTTTACAGATAATACTTCATTTATATCTCTGTAATTCAAAAGTCATTAATTAACAACA  
 GAATTCATATTTAAGATAACTTTGCTATAAATATATAATAATTTTTAAAGTTTTTCTT  
 TAATATAACATCTTGAAATCATGAACATTTATTTTTTCTGGTTTACATTACATAGAAT  
 CATGACTATTTTACCTGATTTGCCTTAACTAGCTCAATTTATCTTGTGCTATGGATTT  
 GCACTCAACCATTCTACTTTTCTATGTTTTAAAAGCAGCATTTTAGTCAACAATTGTG  
 AGTGCTCATCACCTACATGCTGTGAACAAAGTCAAGGTACTTTATTCTTATTTCTTA  
 TCCTATATTCTGTGTTACAGAAAACTACTACCATAAACAAAGCACCAACCAGCCAC  
 AGCAGTTGTGTCAAGCATGACAATTGGTCTAGTCTTCACATTTTATTAGTAAGTCTAT  
 CAAGTAAGAGATGAAGGGTCTAGAAAACCTAGACACAAAGCAACCAGGGTCCAAAT  
 CACCAAGGTAGATCTGTGCTTAGCTAAAGGGAAACACCCGAAGATTCATTATTTGG  
 ATACAGACTATGGGACCATCTTATTTGAAGGAAGCTTTGATTTGCCTGTTCTTCAGT  
 GGCTGAGCTGGGCGCCAGTTGTCCACCATCAGTTCTTCGGGTTACCCCTCCCCATTG  
 AAGTTAAGTTTACGGAATTTCAACACCTGCTCGCTGCTGACGCTGATGGGTTCTTG  
 AGCACAATCCAGGTCACACATTCCAGAAGAGGAGGGGTGGTCAGTGAGCCTGGGTA  
 GGTCCAGTAATCCAAGGATTCAGGAAGGAGGCCACGAGGATCGAAGTTAGTGAAGT  
 CAGCACTCTTGCCCTTTGTTTTAATGGAATCCAGCACATCAACAACCTTTCTGAAGGC  
 CCGGTTTAGCGCTGCCAACCTTCAAAAAAATACCTAGAACGGCCAGTCCATCAGGTT  
 GCTGCACAGCTTTCCAAAATCCCCATATTTGGTGTTCAGTGAACCAAGTGAAGTT  
 CTGCAGCATATTTCTTTTTATCCACAGTATGCTCTGAACCTTGTCCATCAAGTGAACC  
 CCAGTGAAAGTGAACTGAATCAATCTGTAAGTGCCATCCAGGGGTCTCCCTTGAG  
 CACTGCTTTGTCCTGAGAGTCATCAAACCTCACGTTGAAAGCATGACCATTGTTGAG  
 GATCCTCAGGGAAGTTGCTTGATCATAGGAAACAGACAGGGGCTTCAGGGAAGGGT  
 CATACTTGGCTGTATGAGTGTGATGTCAACAGGGGACTGGCGCTCTCCCTTGGCAA  
 TGGGGAAGTCCTTATGCCAGTGCTCAGGTCCGTTGTGTTTGCCGTACCCCCAGTGAT

GGGACATGGTCGCGCTGGCGGTCGGGGCAGGGCAGGAATCGGCACCGATCTGGCGG  
CGGCGGCTTGGGCGCCTGCACTGTGT

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии карбоангидразы 2 (CA2), где указанный агент на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, из одной из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 3-10, и где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, с 0, 1, 2, или 3 ошибками спаривания, из смысловой последовательности, приведенной в любой из таблиц 3-10, которая соответствует указанной антисмысловой последовательности, и где указанный агент на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

2. Агент на основе дцРНК по п. 1, где по меньшей мере одна из смысловой цепи и антисмысловой цепи конъюгирована с одним или более липофильными фрагментами.

3. Агент на основе дцРНК по п. 2, где липофильный фрагмент конъюгирован посредством линкера или носителя.

4. Агент на основе дцРНК по п. 2 или п. 3, где один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи.

5. Агент на основе дцРНК по п. 4, где один или более липофильных фрагментов конъюгированы с одним или более внутренними положениями на по меньшей мере одной цепи посредством линкера или носителя.

6. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 2-5, где липофильный фрагмент представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

7. Агент на основе дцРНК по п. 6, где липофильный фрагмент содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

8. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 2-7, где липофильный фрагмент конъюгирован посредством носителя, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении (положениях) двухцепочечной области.

9. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 2-7, где липофильный фрагмент конъюгирован с агентом на основе двухцепочечной иРНК посредством линкера, содержащего простой эфир, простой тиоэфир, мочевины, карбонат, амин, амид, малеимид-простой тиоэфир, дисульфид, сложный фосфодиэфир, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

10. Агент на основе двухцепочечной иРНК по любому из пп. 2-8, где липофильный фрагмент конъюгирован с азотистым основанием, сахарным фрагментом или межнуклеозидной связью.

11. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-10, где не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи являются немодифицированными нуклеотидами

12. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-11, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

13. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-12, где по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситимидинового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, незамкнутого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогексит-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

14. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-13, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 2 нуклеотидов.

15. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-14, где двухцепочечная область имеет длину 15-30 пар нуклеотидов.

16. Агент на основе дцРНК по п. 15, где двухцепочечная область имеет длину 17-23 пары нуклеотидов.

17. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-16, где каждая цепь имеет 19-30 нуклеотидов.

18. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-17, где агент содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

19. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 2-18, дополнительно содержащий нацеливающий лиганд, например, лиганд, который нацелен на ткань глаза.

20. Агент на основе дцРНК по п. 19, где ткань глаза представляет собой ресничный эпителий, зрительный нерв, трабекулярную сеть, юкстаканаликулярную ткань, ганглий (например, включая ганглий сетчатки), эписклеральные вены или канал Шлемма (например, включая эндотелиальную клетку).

21. Агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-20, дополнительно содержащий фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи.

22. Агент на основе дцРНК по п. 21, где миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

23. дцРНК по любому из пп. 1-22, где агент на основе дцРНК нацелен на область «горячей точки» мРНК, кодирующей СА2.

24. Агент на основе дцРНК, который нацелен на область «горячей точки» мРНК карбоангидразы 2 (CA2).

25. Клетка, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-24.

26. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии CA2, содержащая агент на основе дцРНК по любому из пп. 1-24 и фармацевтически приемлемый буфер.

27. Способ ингибирования экспрессии CA2 в клетке, включающий:

а. приведение указанной клетки в контакт с агентом на основе дцРНК по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композицией по п. 26; и

б. выдерживание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК CA2, белка CA2 или как мРНК, так и белка CA2, с осуществлением, таким образом, ингибирования экспрессии CA2 в клетке.

28. Способ по п. 27, где клетка находится в организме субъекта.

29. Способ по п. 28, где субъект представляет собой человека.

30. Способ по п. 29, где у субъекта было диагностировано CA2-ассоциированное нарушение.

31. Способ лечения субъекта, у которого диагностировано CA2-ассоциированное нарушение, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества агента на основе дцРНК по любому из пп. 1-24 или фармацевтической композиции по п. 26, с осуществлением, таким образом, лечения указанного нарушения.

32. Способ по п. 31, где CA2-ассоциированное нарушение представляет собой глаукому.

33. Способ по п. 31 или п. 32, где лечение включает облегчение по меньшей мере одного признака или симптома нарушения.

34. Способ по любому из пп. 31-33, где лечение включает одно или более из (а) подавления или снижения внутриглазного давления; (б) ингибирования или снижения экспрессии или активности CA2; (в) снижения количества водянистой влаги; (д) подавления или снижения повреждения зрительного нерва; (е) подавления или снижения гибели ганглиозных клеток сетчатки; (ф) лекарственного препарата для снижения внутриглазного давления; (г) лазерного лечения; (h) хирургического вмешательства; (i) или трабекулэктомии.

35. Способ по любому из пп. 24-34, где агент на основе дцРНК вводят субъекту внутриглазным способом, внутривенно или местно.

36. Способ по п. 35, где внутриглазное введение включает интравитреальное введение (например, интравитреальную инъекцию); транссклеральное введение (например, транссклеральную инъекцию); субконъюнктивальное введение (например, субконъюнктивальную инъекцию); ретробульбарное введение (например, ретробульбарную инъекцию); интракамеральное введение (например, интракамеральную инъекцию) или субретинальное введение (например, субретинальную инъекцию).

37. Способ по любому из пп. 24-36, дополнительно включающий введение

субъекту дополнительного агента или терапии, включающих одно или более из аналога простагландина, бета-блокатора, агониста альфа-адренергических рецепторов, ингибитора карбоангидразы или агента против СА2, подходящих для лечения или предупреждения СА2-ассоциированного нарушения.

По доверенности