

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035756**

(13) **B1**

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

- | | |
|--|---|
| (45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.05 | (51) Int. Cl. <i>C12N 15/11</i> (2006.01)
<i>C12N 15/113</i> (2010.01)
<i>A61K 31/7105</i> (2006.01)
<i>A61K 31/713</i> (2006.01)
<i>A61P 31/12</i> (2006.01) |
| (21) Номер заявки
201690497 | |
| (22) Дата подачи заявки
2012.06.28 | |

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В**

- | | |
|---|---|
| (31) 11172235.1; 13/535,454 | (56) RU-C2-2418068
US-A1-20030206887 |
| (32) 2011.06.30; 2012.06.28 | |
| (33) EP; US | |
| (43) 2016.08.31 | |
| (62) 201391394; 2012.06.28 | |
| (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭРРОУХЭД ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US) | |
| (72) Изобретатель:
Чин Дэниел (US), Деккерт Йохен,
Хоссбах Маркус, Йон Маттиас (DE) | |
| (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU) | |

-
- (57) Изобретение относится к двунитевой рибонуклеиновой кислоте (днРНК) для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В. Изобретение также относится к фармацевтической композиции, которая содержит днРНК, или молекулы нуклеиновой кислоты, или векторы, кодирующие их, вместе с фармацевтически приемлемым носителем; к способам для лечения заболеваний, вызванных инфекцией вируса гепатита В, с применением указанной фармацевтической композиции; и способам ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В в клетке.

035756
B1

035756
B1

Предпосылки создания изобретения

Настоящее изобретение относится к двунитевым рибонуклеиновым кислотам (днРНК) и к их применению при опосредовании РНК-интерференции для ингибирования экспрессии генов, необходимых для репликации и патогенеза вируса гепатита В, в частности, для ингибирования вирусной полимеразы, поверхностного антигена, антигена Е и белка Х. Более того, применение указанных днРНК для лечения или предотвращения хронических заболеваний/нарушений печени, воспалений, фиброзных состояний и нарушений пролиферации, таких как рак, образующихся в результате инфекции вирусом гепатита В, также является частью настоящего изобретения.

Вирус гепатита В представляет собой строго гепатотропный вирус, содержащий двунитевую ДНК. Хотя генетический материал представлен ДНК, цикл репликации включает этап обратной транскрипции с копированием прегеномной РНК в ДНК. Для выполнения этого важного этапа кодируемая вирусом полимеразой обладает обратнотранскриптазной активностью. Вирус гепатита В согласно классификации принадлежит к гепаднавирусам и относится к семейству *Hepadnaviridae*. Первичное заражение взрослых людей вирусом гепатита В вызывает острый гепатит с симптомами воспаления органов, лихорадкой, желтушностью и повышенным уровнем трансаминаз печени в крови. Около 95% случаев острого гепатита проходят без лечения. Пациенты, которые не способны побороть вирусную инфекцию, страдают от хронического развития заболевания в течение многих лет с повышенным риском развития цирроза печени или рака печени. Перинатальная передача новорожденным от матерей, инфицированных вирусом гепатита В, также приводит к хроническому гепатиту. Средства для лечения инфекции хроническим гепатитом В ограничены и только в некоторых случаях приводят к полной и длительной ремиссии. Дополнительные клинические и терапевтические осложнения возникают у пациентов с вирусом гепатита В, инфицированных вирусами гепатита С, гепатита D или вирусом иммунодефицита человека.

Вирус гепатита В передается через кровь или продукты крови, сперму, вагинальный секрет или слюну. Употребление наркотиков и половое сношение являются факторами риска и поддерживают распространение вируса. Для инфекции может быть достаточно контакта поврежденного слизистого эпителия с зараженными жидкостями организма.

Инкубационный период составляет от 40 до 200 дней. Риск инфекции пропорционален количеству полученных частиц вируса гепатита В. Младенцы часто заражаются перинатально от матерей, имеющих вирус гепатита В, что является основной проблемой здоровья на эндемичных территориях.

Приблизительно 2 млрд человек инфицированы вирусом гепатита В и 400 млн являются хроническими носителями. Территориями широкого распространения являются Африка и Юго-Восточная Азия с локальной концентрацией инфицированных лиц 20-80%.

Основываясь на гомологии последовательностей, вирусы гепатита В классифицируют на генотипы А-Н; наиболее важными из которых являются генотипы А-D. Генотип А часто встречается в Северо-Западной Европе, США, Южной и Центральной Америке. Генотипы В и С преобладают в Китае, Японии, Индонезии и других странах Восточной Азии. Генотип D обнаружен в Южной Европе, Северной Африке и Южной Африке. Течение заболевания и ответ на фармацевтическое лечение различаются между генотипами.

Инфекционные частицы вируса гепатита В имеют диаметр приблизительно 42 нм. Внешняя двуслойная мембрана содержит большой, средний и малый поверхностные белки. Когнатный рецептор на гепатоцитах для связывания поверхностных белков и интернализации неизвестен. Множество копий корового белка образуют сферическую нуклеокапсидную структуру внутри вирусной частицы. Каждый нуклеокапсид несет частичную двунитевую ДНК в качестве генетического материала вместе с вирусной полимеразой.

После захвата гепатоцитами нуклеокапсид переносится в ядро и ДНК высвобождается. Синтез цепи ДНК завершается, и двуцепочечные разрывы восстанавливаются для образования ковалентно замкнутой кольцевой (кзк) суперспирализованной ДНК размером 3,2 т.н. кзк ДНК выступает в качестве матрицы для транскрипции четырех основных вирусных мРНК, по 3,5; 2,4; 2,1 и 0,7 т.н. длиной. Все мРНК являются 5'-копированными и полиаденилированными на 3'-конце. Существует перекрывание последовательностей на 3'-конце между всеми четырьмя мРНК.

мРНК размером 3,5 т.н. выступает в качестве матрицы для образования корового белка и полимеразы. Дополнительно этот транскрипт выступает в качестве прегеномного промежуточного продукта репликации и позволяет вирусной полимеразе инициировать обратную транскрипцию ДНК. Коровый белок необходим для образования нуклеокапсида. Кроме того, последующие этапы процессинга преобразуют некоторые коровые белки в секретируемый антиген Е. Количество антигена Е в крови коррелирует с репликацией вируса гепатита В в печени и выступает важным диагностическим маркером для мониторинга течения болезни.

мРНК размером 2,4 и 2,1 т.н. несут открытые рамки считывания *pre-S1*, *pre-S2* и *S2* для экспрессии большого, среднего и малого поверхностного антигена вируса. Антиген S связан с полноценными инфекционными частицами. Дополнительно кровь инфицированного пациента также содержит неинфекционные частицы, образованные только из антигена S, свободного от геномной ДНК или полимеразы. Функция этих частиц не до конца понятна. Полное и устойчивое истощение обнаруживаемого антигена S

в крови рассматривают как надежный индикатор клиренса вируса гепатита В и, таким образом, успешного лечения.

мРНК размером 0,7 т.н. кодирует белок Х. Этот генный продукт важен для эффективной транскрипции вирусных генов, а также выступает трансактиватором экспрессии генов хозяина. Последняя активность представляется важной для трансформации гепатоцитов во время развития рака печени.

Рекомбинантный антиген S вируса гепатита В используют для вакцинации. Введение трех доз приготовленного в виде лекарственной формы антигена S во временных точках день 1, 4 недели и 6 месяцев обычно вызывает образование достаточного титра нейтрализующих антител. Вакцинированные пациенты защищены в течение 10 лет или дольше. Однако вакцины не являются заменителями терапии.

Пациентов с острой инфекцией вирусом гепатита В не подвергают лечению из-за высокого природного уровня ремиссии. Однако пациентов с обнаруживаемым антигеном S, антигеном Е или вирусной ДНК в крови в течение более чем 6 месяцев рассматривают как хронически инфицированных. Аналоги нуклеозидов в качестве ингибиторов активности обратной транскриптазы являются первым средством лечения для многих пациентов. Ламивудин, Тенофовир или Энтекавир подавляют репликацию вируса гепатита В, иногда до необнаруживаемого уровня. Наиболее важными эффектами являются улучшение функции печени и уменьшение воспаления печени. Однако только немногие пациенты достигают полной и длительной ремиссии после окончания лечения. Более того, вирус гепатита В развивает устойчивость к лекарственным препаратам с увеличением длительности лечения. Это особенно критично для пациентов, коинфицированных вирусами гепатита В и иммунодефицита человека. Оба вируса являются восприимчивыми к препаратам на основе аналогов нуклеозидов и могут совместно развивать устойчивость к ним.

Вторым средством для лечения является введение интерферона альфа. В данном случае пациент получает большие дозы интерферона альфа в течение 6 месяцев. В зависимости от генотипа вируса лечению поддаются более 50% хронических инфекций. Однако азиатский генотип В дает очень слабый уровень ответа. Коинфекция с гепатитом D или вирусом иммунодефицита человека делает терапию интерфероном альфа полностью неэффективной. Для пациентов с существенными повреждениями печени и тяжелыми фиброзными состояниями терапия интерфероном альфа не рекомендуется.

Несмотря на существенные достижения в области лечения вируса гепатита В остается потребность в агенте, способном селективно и эффективно подавлять экспрессию генов вируса, блокировать репликацию и последовательно снижать вирусную нагрузку у хронически инфицированных пациентов.

Было показано, что молекулы двунитевой РНК (днРНК) способны блокировать экспрессию генов в результате высоко консервативного регуляторного механизма, известного как РНК интерференция (РНКи). Настоящее изобретение обеспечивает молекулы двунитевой рибонуклеиновой кислоты (днРНК), а также композиции и способы для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В, в частности экспрессии гена вируса гепатита В, в клетке, в ткани или в млекопитающем с использованием таких днРНК. Настоящее изобретение также предусматривает композиции и способы для лечения или предотвращения патологических состояний и заболеваний, вызванных инфекцией вирусом гепатита В, таких как хронические заболевания/нарушения печени, воспаления, фиброзные состояния и нарушения пролиферации, такие как рак.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает молекулы двунитевой рибонуклеиновой кислоты (днРНК), способные селективно и эффективно снижать экспрессию гена вируса гепатита В. Применение РНКи вируса гепатита В обеспечивает способ для терапевтического и/или профилактического лечения заболеваний/нарушений, связанных с хроническими заболеваниями/нарушениями печени, воспалениями, фиброзными состояниями и нарушениями пролиферации, такими как рак; указанные способы включают введение днРНК, нацеленной на вирус гепатита В, в организм человека или животного.

В одном предпочтительном варианте реализации описанная молекула днРНК способна ингибировать экспрессию гена вируса гепатита В по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 80%.

В одном варианте реализации настоящее изобретение предусматривает молекулы двунитевой рибонуклеиновой кислоты (днРНК) для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В, в частности экспрессии генов, относящихся к репликации или патогенезу вируса гепатита В. днРНК включает по меньшей мере две последовательности, комплементарные друг другу. днРНК включает кодирующую цепь, включающую первую последовательность, и некодирующую цепь, включающую вторую последовательность, см. последовательности, представленные в перечне последовательностей, а также специфичные пары днРНК в прилагаемых табл. 1 и 2. В одном варианте реализации кодирующая последовательность включает последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по меньшей мере части мРНК вируса гепатита В. Указанная последовательность расположена в области комплементарности кодирующей цепи к некодирующей цепи, предпочтительно в пределах нуклеотидов 2-7 с 5'-конца некодирующей цепи. В одном предпочтительном варианте реализации днРНК специфически нацелена на ген вируса гепатита В, который кодирует коровый белок, вирусную полимеразу, поверхностный антиген, антиген Е или белок Х. Более того, предпочтительно, что днРНК специфически нацелена на консенсусную последовательность, которая имеет высоко консервативную последовательность нуклеиновой ки-

слоты среди геномных последовательностей генотипов А, В, С и D вируса гепатита В. Предпочтительно консенсусная последовательность представляет собой по меньшей мере 13 последовательных нуклеотидов в длину, более предпочтительно по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов. Предпочтительные высоко консервативные последовательности нуклеиновой кислоты представлены в табл. 5.

В одном варианте реализации, некодирующая цепь включает нуклеотидную последовательность, в значительной степени комплементарную по меньшей мере части мРНК, кодирующей указанный ген вируса гепатита В, и область комплементарности наиболее предпочтительно менее чем 30 нуклеотидов в длину. Более того, предпочтительно, что длина описанных в настоящей заявке молекул днРНК согласно настоящему изобретению (длина дуплекса) находится в диапазоне от 16 до 30 нуклеотидов, в частности, в диапазоне от 18 до 28 нуклеотидов. Особенно полезными в контексте настоящего изобретения являются длины дуплексов приблизительно 19, 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов. Наиболее предпочтительными являются участки дуплекса длиной 19, 21 или 23 нуклеотидов. днРНК после доставки в клетку, инфицированную вирусом гепатита В, ингибирует экспрессию гена вируса гепатита В *in vitro* по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70% и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 80%.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Табл. 1. Коровые последовательности днРНК, нацеленных на ген вируса гепатита В. Заглавные буквы обозначают нуклеотиды РНК.

Фиг. 2 Табл. 2. Характеристика днРНК, нацеленных на вирус гепатита В: Исследование активности с единичной дозой. Заглавные буквы обозначают нуклеотиды РНК, строчные буквы "c", "g", "a" и "u" обозначают 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, "s" обозначает фосфотиоат, "dT" обозначает дезокситимидин, заглавные буквы A, C, G, U, за которыми следует "f", обозначают 2'-фтор нуклеотид. Строчная "p" обозначает 5'-фосфат. (invdT) обозначает инвертированный дезокситимидин (3'-3'-связанный).

Фиг. 3. Табл. 3. Характеристика днРНК, нацеленных на вирус гепатита В: Стабильность. $t^{1/2}$ = период полужизни цепи, как определено в примерах.

Фиг. 4. Табл. 4. Коровые последовательности днРНК, нацеленных на ген вируса гепатита В, и их модифицированные копии. Заглавные буквы обозначают нуклеотиды РНК, строчные буквы "c", "g", "a" и "u" обозначают 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, "s" обозначает фосфотиоат, "dT" г обозначает дезокситимидин, заглавные буквы A, C, G, U, за которыми следует "f", обозначают 2'-фтор нуклеотид. Строчная "p" обозначает 5'-фосфат. (invdT) обозначает инвертированный дезокситимидин (3'-3'-связанный).

Фиг. 5. Табл. 5. Последовательности сайта-мишени днРНК, нацеленных на вирус гепатита В, и их степень перекрытия по отношению к генотипам А, В, С и D вируса гепатита В. n = количество доступных последовательностей вируса гепатита В (ВГВ) каждого генотипа.

Фиг. 6. Табл. 6. Учетные номера в базе NCBI Genbank геномных последовательностей вируса гепатита В.

Фиг. 7. Табл. 7. Сравнение эффективности нокдауна и перекрытия геномов ВГВ для единичной днРНК и их комбинаций. Изучение активности для комбинации двух днРНК проводили в конечной концентрации 10 нМ и 1 нМ с наибольшей эффективностью днРНК в соответствии с табл. 2 и сравнивали с соответствующими данными.

Фиг. 8. Табл. 8. Последовательности отрицательного контроля днРНК, использованные в скрининговом анализе psiCHECK™-2.

Подробное описание изобретения

Прилагаемая табл. 1 относится к предпочтительным молекулам, используемым в качестве днРНК в соответствии с настоящим изобретением. Также в настоящей заявке предусматриваются модифицированные молекулы днРНК, которые являются, в частности, раскрытыми в прилагаемой табл. 2, представляющей иллюстративные примеры модифицированных молекул днРНК согласно настоящему изобретению. Как указано выше по тексту, табл. 2 содержит иллюстративные примеры модифицированных днРНК согласно настоящему изобретению (тем самым, соответствующие кодирующая цепь и некодирующая цепь приведены в данной таблице). Взаимосвязь предпочтительных немодифицированных молекул, приведенных в табл. 1, с модифицированными днРНК из табл. 2 проиллюстрирована в табл. 4. При этом иллюстративные модификации этих компонентов днРНК согласно настоящему изобретению приведены в настоящей заявке в качестве примеров модификаций.

В табл. 3 приведены селективные биологически, клинически и фармацевтически значимые параметры определенных молекул днРНК согласно настоящему изобретению.

Некоторые из предпочтительных молекул днРНК представлены в прилагаемой табл. 1, где, среди прочего и предпочтительно, кодирующая цепь выбрана из группы, состоящей из последовательностей нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 26. Некодирующая цепь выбрана из группы, состоящей из последовательностей нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NO: 157, 158, 160, 161, 162, 163, 164 и 186. Соответственно молекула днРНК согласно настоящему изобретению

может, среди прочего, включать пары последовательностей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/157, 2/158, 3/160, 4/161, 5/162, 6/163, 7/164 и 26/186. В контексте специфичных молекул днРНК, предусмотренных настоящей заявкой, пары номеров SEQ ID NO относятся к соответствующим последовательностям кодирующей и не кодирующей цепи (от 5' до 3'), как показано в таблицах.

В одном варианте реализации молекулы днРНК включают не кодирующую цепь с 3' липким концом длиной 1-5 нуклеотидов, предпочтительно длиной 1-2 нуклеотида. Предпочтительно липкий конец не кодирующей цепи содержит урацил или нуклеотиды, которые являются комплементарными мРНК, кодирующей белок, который необходим для репликации или патогенеза вируса гепатита В, в частности коровый белок, вирусную полимеразу, поверхностный антиген, антиген Е и белок Х. В другом предпочтительном варианте реализации указанные молекулы днРНК включают кодирующую цепь с 3' липким концом длиной 1-5 нуклеотидов, предпочтительно длиной 1-2 нуклеотида. Предпочтительно указанный липкий конец кодирующей цепи содержит урацил или нуклеотиды, которые являются идентичными мРНК, кодирующей белок, необходимый для репликации или патогенеза вируса гепатита В.

В другом предпочтительном варианте реализации молекулы днРНК включают кодирующую цепь с 3' липким концом длиной 1-5 нуклеотидов, предпочтительно длиной 1-2 нуклеотида и не кодирующую цепь с 3' липким концом длиной 1-5 нуклеотидов, предпочтительно длиной 1-2 нуклеотида. Предпочтительно указанный липкий конец кодирующей цепи содержит урацил или нуклеотиды, которые являются по меньшей мере на 90% идентичными прегеномной РНК и/или мРНК, кодирующей белок, необходимый для репликации или патогенеза вируса гепатита В, и указанный липкий конец не кодирующей цепи содержит урацил или нуклеотиды, которые являются по меньшей мере на 90% комплементарными мРНК, кодирующей белок, необходимый для репликации или патогенеза вируса гепатита В.

Молекулы днРНК согласно настоящему изобретению могут состоять из нуклеотидов, существующих в природе, или могут состоять из по меньшей мере одного модифицированного нуклеотида, такого как 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, инвертированный дезокситимидин, нуклеотид, включающий 5'-фосфотиоатную группу, и концевой нуклеотид, связанный с производным холестерина или бисдециламидной группой додекановой кислоты. 2'-модифицированные нуклеотиды могут иметь дополнительное преимущество, заключающееся в том, что происходит подавление определенных иммуностимулирующих факторов или цитокинов при применении молекул днРНК согласно настоящему изобретению *in vivo*, например, в медицинском учреждении. В качестве альтернативы и без ограничений, модифицированный нуклеотид может быть выбран из группы, состоящей из: 2'-дезоксидеокси-2'-фтормодифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, замкнутого нуклеотида, нуклеотида, лишённого азотистого основания, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-алкилмодифицированного нуклеотида, нуклеотида морфолино, фосфорамидата и нуклеотида, включающего основание, не встречающееся в природе. В одном предпочтительном варианте реализации, молекулы днРНК содержат по меньшей мере один из следующих модифицированных нуклеотидов: 2'-О-метилмодифицированный нуклеотид, нуклеотид, включающий 5'-фосфотиоатную группу, и дезокситимидин. Предпочтительные молекулы днРНК, который содержат модифицированные нуклеотиды, представлены в табл. 2. В другом предпочтительном варианте реализации, один из нуклеотидов дезокситимидина на 3'-конце обеих цепей представляет собой инвертированный дезокситимидин.

В предпочтительном варианте реализации молекулы днРНК согласно настоящему изобретению содержат модифицированные нуклеотиды, подробно описанные в последовательностях, представленных в табл. 2. В одном предпочтительном варианте реализации молекула днРНК согласно настоящему изобретению включает пары последовательностей, которые выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/157, 2/158, 3/160, 4/161, 5/162, 6/163, 7/164 и 26/186, и включает липкие концы на не кодирующей и/или кодирующей цепи, состоящие из 1-2 дезокситимидинов. В одном предпочтительном варианте реализации, молекула днРНК согласно настоящему изобретению включает пары последовательностей, которые выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/157, 2/158, 3/160, 4/161, 5/162, 6/163, 7/164 и 26/186, и содержит модификации, детально описанные в табл. 2. Предпочтительные молекулы днРНК, включающие модифицированные нуклеотиды, перечислены в табл. 2-4, из них наиболее предпочтительные молекулы днРНК представлены в SEQ ID NO: 321/485, 322/486, 324/488, 325/489, 326/490, 327/491, 328/492 и 350/514.

В другом варианте реализации днРНК согласно настоящему изобретению содержат модифицированные нуклеотиды в положениях, отличных от тех, которые раскрыты в табл. 2. В одном предпочтительном варианте реализации, два дезокситимидиновых нуклеотида находятся на 3'-концах обеих цепей молекулы днРНК. Предпочтительно указанные дезокситимидиновые нуклеотиды образуют липкий конец.

В одном варианте реализации молекулы днРНК согласно настоящему изобретению включают кодирующую и не кодирующую цепи, причём обе цепи имеют период полужизни, который составляет по меньшей мере 0,9 ч. В одном предпочтительном варианте реализации, молекулы днРНК согласно настоящему изобретению включают кодирующую и не кодирующую цепи, где обе цепи имеют период полужизни, который составляет по меньшей мере 48 ч, предпочтительно в сыворотке крови человека.

В другом варианте реализации предусматривается последовательность нуклеиновой кислоты, кото-

рая кодирует кодирующую цепь и/или некодирующую цепь, включенную в днРНК, как определено в настоящей заявке.

Изобретение также предусматривает клетки, которые содержат по меньшей мере одну из днРНК согласно настоящему изобретению. Клетки предпочтительно представляют собой клетки млекопитающих, такие как клетки человека. Более того, ткани и/или организмы, не относящиеся к человеку, которые включают определенные в настоящей заявке молекулы днРНК, представляют собой варианты реализации настоящего изобретения, при условии, что указанный организм, не относящийся к человеку, является особенно полезным для использования в исследовательских целях или в качестве инструмента исследования, например, при исследовании лекарственных препаратов.

Помимо этого настоящее изобретение относится к способу ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В, в частности, гена вируса гепатита В, который кодирует коровый белок, вирусную полимеразу, поверхностный антиген, антиген Е или белок Х, в клетке, ткани или организме, включая следующие этапы:

(а) введение в клетку, ткань или организм двунитевой рибонуклеиновой кислоты (днРНК), как определено в настоящей заявке; и

(b) поддержание указанной клетки, ткани или организма, полученного на этапе (а), в течение времени, достаточного для достижения деградации мРНК транскрипта гена вируса гепатита В, тем самым ингибируя экспрессию гена вируса гепатита В в данной клетке.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, который содержат по меньшей мере один вид днРНК согласно настоящему изобретению. Эти фармацевтические композиции являются особенно полезными для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В в клетке, ткани или организме.

Предпочтительно указанный по меньшей мере один вид молекул двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению нацелен на область прегеномной РНК и/или мРНК, кодирующей белок, необходимый для репликации или патогенеза гена вируса гепатита В. Более предпочтительно указанная область-мишень для молекул двуцепочечной рибонуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению включает консенсусную последовательность, которая является высоко консервативной среди геномных последовательностей генотипов А, В, С и D вируса гепатита В, и указанная консенсусная последовательность представляет собой по меньшей мере 13 последовательных нуклеотидов в длину, предпочтительно по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов, наиболее предпочтительно по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов. Предпочтительные высоко консервативные последовательности нуклеиновых кислот перечислены в табл. 5. Фармацевтические композиции можно использовать для лечения пациентов, инфицированных вирусом гепатита В любого генотипа или коинфицированных различными генотипами вируса гепатита В.

В случае если фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере два вида молекул двуцепочечной рибонуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, предпочтительно, что мишени указанных молекул двуцепочечной рибонуклеиновой кислоты отличаются друг от друга. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно применять для лечения пациентов и для предотвращения развития устойчивости вируса гепатита В к фармацевтическим композициям. В предпочтительном варианте реализации, фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат комбинацию молекул днРНК, детально описанных в последовательностях, представленных в табл. 7. В одном предпочтительном варианте реализации фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению содержат комбинации пар днРНК, которые выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 322/486 и 333/497, 322/486 и 346/510, 322/486 и 330/494 и 322/486 и 324/488.

Фармацевтические композиции, описанные выше, могут также содержать фармацевтически приемлемый/приемлемые носитель/носители, растворитель/растворители и/или вспомогательное вещество/вспомогательные вещества.

В другом варианте реализации настоящее изобретение предусматривает способы лечения, предотвращения или контроля над хроническими заболеваниями/нарушениями печени, воспалениями, фиброзными состояниями и/или пролиферативными нарушениями, такими как рак, обусловленными вирусом гепатита В; указанный способ, включающий введение субъекту, нуждающемуся в таком лечении, предотвращении или контроле, терапевтически или профилактически эффективного количества одной или более днРНК согласно настоящему изобретению. Предпочтительно указанный субъект представляет собой млекопитающее, наиболее предпочтительно пациента - человека.

В одном варианте реализации настоящее изобретение предусматривает способ лечения субъекта, имеющего патологическое состояние, вызванное инфекцией вируса гепатита В. Такие состояния включают нарушения, связанные с хроническими заболеваниями/нарушениями печени, воспалениями, фиброзными состояниями и/или нарушениями пролиферации, такими как рак, как описано выше. В данном варианте реализации днРНК выступает в качестве терапевтического агента для контроля экспрессии гена вируса гепатита В. Способ включает введение пациенту (например, человеку) фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, в результате чего подавляется экспрессия гена вируса гепатита В. Благодаря своей высокой специфичности днРНК согласно настоящему изобретению специфичным

образом нацелена на мРНК гена вируса гепатита В. В одном предпочтительном варианте реализации описанная днРНК специфически снижает уровень мРНК вируса гепатита В и не влияет непосредственно на экспрессию и/или уровень мРНК нецелевых генов в клетке.

В одном предпочтительном варианте реализации описанная днРНК уменьшает уровень мРНК вируса гепатита В в печени *in vivo* по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 80%. В другом варианте реализации описанные днРНК уменьшают уровень мРНК вируса гепатита В *in vivo* в течение по меньшей мере 4 дней. В другом предпочтительном варианте реализации, днРНК согласно настоящему изобретению применяют для приготовления фармацевтической композиции для лечения хронических заболеваний/нарушений печени, воспалений, фиброзных состояний и/или нарушений пролиферации, таких как рак. Заболевания, которые можно подвергать лечению с помощью указанной фармацевтической композиции, включают, но не ограничиваются ими: хронический гепатит (ХГ), цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярную карциному (ГПК).

В другом варианте реализации настоящее изобретение предусматривает векторы для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В в клетке, в частности, гена вируса гепатита В, которые содержат регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует по меньшей мере одну цепь молекул днРНК согласно настоящему изобретению.

В другом варианте реализации настоящее изобретение предусматривает клетку, которая содержит вектор для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В в клетке. Указанный вектор содержит регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует по меньшей мере одну цепь молекулы днРНК согласно настоящему изобретению. При этом предпочтительно, что указанный вектор содержит помимо указанной регуляторной последовательности последовательность, которая кодирует по меньшей мере одну "кодирующую цепь" днРНК согласно настоящему изобретению и по меньшей мере одну "некодирующую цепь" указанной днРНК. Также предусмотрено, что заявленная клетка содержит два или более векторов, которые содержат, помимо указанных регуляторных последовательностей, определенную в настоящей заявке последовательность, которая кодирует (или последовательности, которые кодируют) по меньшей мере одну цепь молекул днРНК согласно настоящему изобретению.

В одном варианте реализации способ включает введение композиции, которая содержит днРНК, причём днРНК включает нуклеотидную последовательность, которая является комплементарной по меньшей мере части РНК транскрипта гена вируса гепатита В млекопитающего, которого подвергают лечению. Как указано выше, векторы и клетки, включающие молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют по меньшей мере одну цепь молекул днРНК, определенных в настоящей заявке, также можно применять в качестве фармацевтических композиций и можно вследствие этого также применять в способах лечения субъекта, нуждающегося в медицинском вмешательстве, описанных в настоящей заявке. Примечательно также, что эти варианты реализации, относящиеся к фармацевтическим композициям и к соответствующим способам лечения субъекта (человека), также относятся к таким подходам, как подходы генной терапии.

Молекулы днРНК, специфичные к гену вируса гепатита В, предусмотренные в настоящей заявке, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие отдельные цепи этих молекул днРНК согласно настоящему изобретению, можно также встраивать в векторы и применять в качестве векторов генной терапии для пациентов людей. Векторы генной терапии можно доставлять субъекту посредством, например, внутривенной инъекции, местного введения (см. Патент США 5328470) или посредством стереотаксической инъекции (см., например Chen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 91:3054-3057). Фармацевтический препарат вектора генной терапии может включать вектор генной терапии в подходящем растворителе или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включен наполнитель для доставки генов. В качестве альтернативы, если полноценный вектор доставки генов можно в готовом виде получить из рекомбинантных клеток, например ретровирусные векторы, фармацевтические препараты могут включать одну или более клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

В другом аспекте настоящего изобретения молекулы днРНК, специфичные к вирусу гепатита В, которые модулируют активность экспрессии генов вируса гепатита В, экспрессируют из транскрипционных единиц, встроенных в векторы на основе ДНК или РНК (см., например, Skillern A et al., международная заявка РСТ № WO 00/22113). Эти трансгены можно вводить в качестве линейной конструкции, циклической плазмиды или вирусного вектора, который можно встраивать в геном хозяина и который будет передаваться по наследству в качестве трансгена, встроенного в геном хозяина. Трансген также можно сконструировать таким образом, чтобы он обладал способностью наследоваться в виде экстрахромосомальной плазмиды (Gassmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

Отдельные цепи днРНК можно транскрибировать с помощью промоторов в двух отдельных векторах экспрессии и котрансфицировать в клетки-мишени. В качестве альтернативы каждую отдельную цепь днРНК можно транскрибировать с помощью промоторов, оба из которых расположены на одной и той же экспрессирующей плазмиде. В предпочтительном варианте реализации, днРНК экспрессируют в виде инвертированного повтора, объединенного линкерной полинуклеотидной последовательностью, в

результате чего днРНК образует структуру "стебель-петля".

Векторы, экспрессирующие рекомбинантную днРНК, предпочтительно представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Вирусные векторы, экспрессирующие днРНК, можно сконструировать на основе, но не ограничиваясь ими, аденоассоциированного вируса (для обзора, см. Muzyczka et al., *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129); аденовируса (см., например, Berkner et al., *BioTechniques* (1998) 6:616; Rosenfeld et al. *Science* (1991) 252:431-434; и Rosenfeld et al. *Cell* (1992) 68:143-155); или альфавируса, а также других, известных в данной области техники. Ретровирусы использовали для введения множества генов в клетки различных типов, включая эпителиальные клетки, *in vitro* и/или *in vivo* (см., например, Danos and Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 85:6460-6464). Рекомбинантные ретровирусные векторы, способные трансдуцировать и экспрессировать гены, встроенные в геном клетки, можно получать путем трансфицирования рекомбинантного ретровирусного генома в подходящие пакующие клеточные линии, такие как PA317 и Psi-CRIP (Comette et al., *Human Gene Therapy* (1991) 2:5-10; Cone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81:6349). Рекомбинантные аденовирусные векторы можно использовать для инфицирования широкого разнообразия клеток и тканей в восприимчивых хозяевах (например, крыса, хомяк, собака и шимпанзе) (Hsu et al., *J. Infectious Disease*, (1992) 166:769); они обладают преимуществом, которое заключается в отсутствии потребности в миотически активных клетках для инфицирования.

Промотор, управляющий экспрессией днРНК в ДНК-плазмидном или вирусном векторе согласно настоящему изобретению, может представлять собой эукариотическую РНК-полимеразу I (например, рибосомальный РНК промотор), РНК-полимеразу II (например, ранний промотор CMV или актиновый промотор, или промотор мРНК U1) или предпочтительно промотор РНК-полимеразы III (например, промотор U6 мРНК или 7SK РНК) или прокариотический промотор, например, промотор T7; предусмотренная экспрессирующая плаزمид также кодирует РНК-полимеразу T7, необходимую для транскрипции промотора T7. Промотор может также направлять экспрессию трансгена в поджелудочную железу (см., например, регуляторную последовательность инсулина для поджелудочной железы (Vucchini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83:2511-2515).

Экспрессию трансгена можно также точно регулировать, например, используя индуцибельную регуляторную последовательность и экспрессирующие системы, такие как регуляторная последовательность, чувствительная к определенным физиологическим регуляторам, например к уровню циркулирующей глюкозы в крови, или к гормонам (Docherty et al., *FASEB J.* (1994) 8:20-24). Такие индуцибельные системы экспрессии, подходящие для контроля экспрессии трансгена в клетках или в млекопитающих, включают регуляцию с помощью экдизона, эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D1-тиогаляктопиранозиды (IPTG). Специалист в данной области техники способен выбрать подходящую регуляторную последовательность/последовательность промотора на основании предполагаемого применения днРНК трансгена.

Рекомбинантные векторы, обеспечивающие экспрессию молекул днРНК, предпочтительно доставляют, как описано ниже, и поддерживают в клетках-мишенях. В качестве альтернативы, можно использовать вирусные векторы, которые обеспечивают временную экспрессию молекул днРНК. Такие векторы при необходимости можно вводить неоднократно. Один раз экспрессированная днРНК связывается с РНК-мишенью и модулирует ее функцию или экспрессию. Доставка векторов, экспрессирующих днРНК, может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения в клетки-мишени, отобранные от пациента, с последующим повторным введением пациенту, или может осуществляться любым другим способом, который позволяет введение в желаемую клетку-мишень.

ДНК плазмиды, экспрессирующие днРНК, обычно трансфицируют в клетки-мишени в виде комплекса с катионными липидными носителями (например, олигофектамино) или некаатионными носителями на основе липидов (например, Transit-ТКО™). Настоящее изобретение также рассматривает множественные липидные трансфекции для днРНК-опосредованных нокдаунов, нацеленные на различные области единичного гена вируса гепатита В или нескольких генов вируса гепатита В, в течение недели или более. Успешное введение векторов согласно настоящему изобретению в клетки хозяина можно изучать, используя различные известные способы. Например, временную трансфекцию можно идентифицировать с помощью репортера, такого как флуоресцентный маркер, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильную трансфекцию клеток *ex vivo* можно подтвердить, используя маркеры, которые передают трансфицированным клеткам устойчивость к специфическим факторам окружающей среды (например, антибиотикам или лекарственным препаратам), такую как устойчивость к гиромоцину В.

Следующее подробное описание раскрывает процессы создания и применения днРНК и композиций, содержащих днРНК, для ингибирования экспрессии целевого гена вируса гепатита В, а также композиции и способы для лечения заболеваний и нарушений, вызванных инфекцией указанного вируса гепатита В.

Определения

Для удобства ниже представлено значение некоторых терминов и фраз, используемых в настоящей заявке, в примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если существует видимое расхождение между применением термина в других частях настоящей заявки и его значением, представленным в данной сек-

ции, должно превалировать определение из данной секции.

Каждый из "G", "C", "A", "U" и "T" или "dT" соответственно обычно означает нуклеотид, который содержит в качестве основания гуанин, цитозин, аденин, урацил и дезокситимидин соответственно. Однако термин "рибонуклеотид" или "нуклеотид" может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более детально описано ниже, или к заместительной группе-заменителю. Последовательности, включающие такие заместительные группы, представляют собой варианты реализации настоящего изобретения. Как детально описано ниже, описанные в настоящей заявке молекулы днРНК могут также включать "липкие концы", т.е. неспаренные выступающие нуклеотиды, которые не вовлечены непосредственно в двунитевую структуру РНК, в норме образуемую определенной в настоящей заявке парой "кодирующей цепи" и "некодирующей цепи". Часто такой выступающий участок содержит нуклеотид дезокситимидин, а в большинстве вариантов реализации - два дезокситимидина на 3'-конце. Такие липкие концы будут описаны и проиллюстрированы ниже.

Термин "ген вируса гепатита В", используемый в настоящей заявке, относится к генам, необходимым для репликации и патогенеза вируса гепатита В, в частности к генам, которые кодируют коровый белок, вирусную полимеразу, поверхностный антиген, антиген Е или белок Х, и к генам, которые кодируют их функциональные фрагменты. Термин "ген/последовательность вируса гепатита В" относится не только к последовательности/последовательностям дикого типа, но также и к мутациям и изменениям, которые могут быть включены в указанный ген/последовательность. Соответственно, настоящее изобретение не ограничивается специфичными молекулами днРНК, предусмотренными в настоящей заявке. Настоящее изобретение также относится к молекулам днРНК, которые включают некодирующую цепь, которая по меньшей мере на 85% комплементарна соответствующему участку нуклеотидов РНК транскрипта гена вируса гепатита В, который содержит такие мутации/изменения.

Термин "консенсусная последовательность", используемый в настоящей заявке, относится к по меньшей мере 13 последовательным нуклеотидам, предпочтительно по меньшей мере 17 последовательным нуклеотидам, наиболее предпочтительно по меньшей мере 19 последовательным нуклеотидам, которые являются высоко консервативными среди геномных последовательностей генотипов А, В, С и D вируса гепатита В.

Используемый в настоящей заявке термин "последовательность-мишень" относится к последовательной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной при транскрипции гена вируса гепатита В, включая мРНК, которая представляет собой результат процессинга первичного транскрипционного продукта РНК.

Термин "цепь, включающая последовательность", используемый в настоящей заявке, относится к олигонуклеотиду, включающему цепь нуклеотидов, которые описаны с помощью последовательности со ссылкой на использование стандартной нуклеотидной номенклатуры. Однако, как детально описано в настоящей заявке, такая "цепь, включающая последовательность" может также включать модификации, такие как модифицированные нуклеотиды.

Термин "комплементарный", используемый в настоящей заявке, если не указано обратное, при применении для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать структуру дуплекса при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим первую нуклеотидную последовательность. "Комплементарные" последовательности, при применении в настоящей заявке, могут также включать (или могут быть образованными исключительно ими) пары не уотсон-криковских оснований, образованные не существующими в природе и модифицированными нуклеотидами, при условии, что выполнены вышеизложенные требования относительно их способности к гибридизации.

Последовательности, обозначаемые как "полностью комплементарные", включают спаривание оснований олигонуклеотидов или полинуклеотидов, включающих первую последовательность нуклеотидов, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую последовательность нуклеотидов, по всей длине первой и второй нуклеотидной последовательности.

Однако если первую последовательность именуют в настоящей заявке как "в значительной степени комплементарную" по отношению ко второй последовательности, эти две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать в ходе гибридизации одну или более, но предпочтительно не более 13 пар оснований, спаренных не по принципу комплементарности.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "в значительной степени комплементарный" в настоящей заявке могут использоваться в отношении соответствия оснований между кодирующей цепью и некодирующей цепью днРНК или между некодирующей цепью днРНК и последовательностью-мишенью, что будет понятно из контекста их использования.

Термин "двунитевая РНК", "молекула днРНК" или "днРНК", используемый в настоящей заявке, относится к молекуле рибонуклеиновой кислоты или к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющих структуру дуплекса, включающую две антипараллельные и в значительной степени комплементарные цепи нуклеиновой кислоты. Две цепи, образующие структуру дуплекса, могут представлять

собой различные части одной большей молекулы РНК или могут представлять собой отдельные молекулы РНК. Когда две цепи являются частями одной большей молекулы, в результате чего являются соединенными непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя структуру дуплекса, соединяющую цепь РНК обозначают как "петля шпилька". Когда две цепи связаны ковалентно с помощью цепи, не являющейся непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя структуру дуплекса, соединяющую структуру обозначают как "линкер". Цепи РНК могут иметь одинаковое или различное количество нуклеотидов. В дополнение к структуре дуплекса, днРНК может включать один или более липких концов нуклеотидов. Нуклеотиды в указанных "липких концах" могут включать от 0 до 5 нуклеотидов, где "0" означает отсутствие дополнительного нуклеотида/нуклеотидов, образующего "липкий конец", и где "5" означает пять дополнительных нуклеотидов на отдельных цепях дуплекса днРНК. Эти дополнительные "липкие концы" расположены на 3'-конце отдельных цепей. Как будет детально описано ниже, молекулы днРНК, которые включают только "липкий конец" на одной из двух цепей, также могут быть полезными и даже предпочтительными в контексте настоящего изобретения. "Липкий конец" содержит предпочтительно от 0 до 2 нуклеотидов. Наиболее предпочтительно два нуклеотида "dT" (дезокситимидин) обнаружены на 3'-конце обеих цепей днРНК. Также два нуклеотида "U" (урацил) можно использовать в качестве липких концов на 3'-конце обеих цепей днРНК. Соответственно, термин "нуклеотиды липкого конца" относится к неспаренному нуклеотиду или нуклеотидам, которые выступают из структуры дуплекса днРНК, когда 3'-конец одной цепи днРНК выступает более 5'-конца другой цепи, или наоборот. Например, некодирующая цепь содержит 23 нуклеотида и кодирующая цепь содержит 21 нуклеотид, образуя два нуклеотида липкого конца на 3'-конце некодирующей цепи. Предпочтительно, два нуклеотида липкого конца являются полностью комплементарными мРНК гена-мишени. "Тупой" или "тупой конец" означает отсутствие неспаренных нуклеотидов на конце днРНК, т.е., отсутствие нуклеотидов липкого конца. днРНК с "тупым концом" представляет собой днРНК, которая является двунитовой по всей ее длине, т.е., нуклеотиды липкого конца отсутствуют на обоих концах молекулы.

Термин "некодирующая цепь" относится к цепи днРНК, которая включает область, в значительной степени комплементарную последовательности-мишени. Термин "область комплементарности", используемый в настоящей заявке, относится к области некодирующей цепи, которая в значительной степени комплементарна последовательности, например, последовательности-мишени. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, нарушения комплементарности наиболее допустимы за пределами нуклеотидов 2-7 от 5'-конца некодирующей цепи.

Термин "кодирующая цепь", используемый в настоящей заявке, относится к цепи днРНК, которая включает область, которая в значительной степени комплементарна области некодирующей цепи. "В значительной степени комплементарна" означает, что предпочтительно по меньшей мере 85% перекрывающихся нуклеотидов в кодирующей и некодирующей цепях являются комплементарными.

"Введение в клетку" по отношению к днРНК означает содействие захвату или абсорбции в клетку, как это понимают специалисты в данной области техники. Абсорбция или захват днРНК может возникнуть в результате спонтанного диффузионного или активного клеточного процессов или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Значение данного термина не ограничивается клетками *in vitro*; днРНК можно также "вводить в клетку", если клетка представляет собой часть живого организма. В таком случае введение в клетку будет включать доставку в организм. Например, для доставки *in vivo* днРНК можно инъектировать в участок ткани или вводить системно. Предусматривается, что, например, молекулы днРНК согласно настоящему изобретению вводят субъекту, нуждающемуся в медицинском вмешательстве. Такое введение может включать инъекцию днРНК, вектора или клетки согласно настоящему изобретению в участок, пораженный болезнью, в указанном субъекте, например, в ткань/клетки печени или в раковые ткани/клетки, такие как ткань рака печени. Также предусматривается инъекция предпочтительно в тесной близости к ткани, пораженной болезнью. Введение в клетку *in vitro* включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция.

Используемый в настоящей заявке термин "хронические заболевания/нарушения печени" относится к функциональным отклонениям печени, длящимся более чем шесть месяцев, которые могут быть вызваны инфекцией вирусом. Примером хронических заболеваний/нарушений печени является хронический гепатит (ХГ).

Термин "воспаление", используемый в настоящей заявке, относится к биологическому ответу тканей тела на повреждение, раздражение или заболевание, которые могут быть вызваны вредным стимулом, например, патогенами, поврежденными клетками или раздражителями. Воспаление обычно характеризуется болью и отеком. Термин "воспаление" призван охватить как острые ответы, в которых воспалительный процесс является активным (например, нейтрофилы и лейкоциты), так и хронические ответы, которые характеризуются медленным течением, изменением типа клеток, представленных в участке воспаления, и образованием соединительной ткани. Одним из примеров заболевания, вызванного воспалением, является фиброз.

Термин "фиброзные состояния", используемый в настоящей заявке, относится к функциональной проблеме органов, которая может быть вызвана ростом фиброзной ткани. Примером такого типа заболе-

вания является цирроз печени (ЦП).

Термин "пролиферативный" и "пролиферация", используемый в настоящей заявке, относится к клеткам, осуществляющим митоз. Во всем объеме настоящей заявки термин "нарушение пролиферации" относится к любому заболеванию/нарушению, которое характеризуется нежелательной или неправильной пролиферацией ткани. Используемый в настоящей заявке термин "нарушение пролиферации" также относится к условиям, в которых нерегулируемый и/или ненормальный рост клеток может привести к развитию нежелательного состояния или заболевания, которое может являться злокачественным или доброкачественным.

Рак, который подвергают лечению, включает, но не ограничивается им, рак печени, где указанный рак печени можно, среди прочего, выбирать из группы, состоящей из гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК), гепатобластомы, смешанного рака печени, рака, происходящего из мезенхимальной ткани, саркомы печени или холангиокарциномы.

Термины "подавлять", "ингибировать экспрессию" и "нокдаун" по отношению к гену вируса гепатита В относятся в настоящей заявке к по меньшей мере частичному подавлению экспрессии гена вируса гепатита В, что проявляется в уменьшении количества мРНК, транскрибируемой с гена вируса гепатита В, которую можно выделить из первой клетки из группы клеток, в которых транскрибируется ген вируса гепатита В и которую обработали/которые обработали таким образом, что экспрессия гена вируса гепатита В была ингибирована, в сравнении со второй клеткой из группы клеток, в значительной степени идентичных первой клетке из группы клеток, но которые не подвергали такой обработке (клетки контроля). Степень ингибирования обычно выражают в значениях:

$$\frac{(\text{мРНК в клетках контроля})}{(\text{мРНК в обработанных клетках})} \times 100\%$$

В качестве альтернативы, степень ингибирования можно представить в контексте уменьшения параметра, функционально связанного с транскрипцией гена вируса гепатита В, например, количества белка, кодируемого геном вируса гепатита В, который секретируется клеткой, или числом клеток, демонстрирующих определенный фенотип.

Как проиллюстрировано в прилагаемых примерах и прилагаемых таблицах, представленных в настоящей заявке, молекулы днРНК согласно настоящему изобретению способны ингибировать экспрессию вируса гепатита В по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 80% в анализе *in vitro*, т.е. *in vitro*. Термин "*in vitro*", используемый в настоящей заявке, включает, но не ограничивается им, анализ на культуре клеток. Специалист в данной области техники может легко определить степень такого ингибирования и связанных с ним эффектов, в частности в свете анализов, представленных в настоящей заявке.

Термин "нецелевой", используемый в настоящей заявке, относится ко всем нецелевым мРНК транскриптома, которые, как прогнозируют с помощью методов *in silico*, способны гибридизоваться с описанной днРНК на основании комплементарности последовательности. днРНК согласно настоящему изобретению предпочтительно специфически ингибирует экспрессию гена вируса гепатита В, т.е. не ингибирует экспрессию любого нецелевого гена.

Термин "период полужизни", используемый в настоящей заявке, представляет собой измерение стабильности соединения или молекулы; его можно оценить способами, известными специалисту в данной области техники, особенно в свете анализов, предусмотренных в настоящей заявке.

Термин "неиммуностимулирующий", используемый в настоящей заявке, относится к отсутствию любой индукции иммунного ответа молекулами днРНК согласно настоящему изобретению. Способы для определения иммунных ответов хорошо известны специалисту в данной области техники, например, определение путем оценки высвобождения цитокинов, как описано в разделе примеров.

Термины "лечить", "лечение" и тому подобные означают в контексте настоящего изобретения облегчение или уменьшение нарушения, связанного с инфекцией вирусом гепатита В, такого как хронические заболевания/нарушения печени, воспаления, фиброзные состояния и нарушения пролиферации, такие как рак.

Используемый в настоящей заявке термин "фармацевтическая композиция" содержит фармакологически эффективное количество по меньшей мере одного вида днРНК и фармацевтически приемлемый носитель. Однако такая "фармацевтическая композиция" может также включать отдельные цепи таких молекул днРНК или вектора/векторов, описанных в настоящей заявке, включающих регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует по меньшей мере одну цепь из кодирующей или некодирующей цепи, включенной в днРНК согласно настоящему изобретению. Также предусматривается, что клетки, ткани или изолированные органы, которые экспрессируют или включают определенные в настоящей заявке днРНК, могут быть использованы в качестве "фармацевтических композиций". Используемый в настоящей заявке термин "фармакологически эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" или просто "эффективное количество" относится к такому количеству РНК, которое является эффективным для получения предполагаемого фармакологического, терапевтического или превентивного результата.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к носителю для введения терапевтиче-

ского агента. Такие носители включают, но не ограничиваются ими, солевой раствор, буферный солевой раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. Термин специфически исключает культуральную клеточную среду. Для препаратов, которые вводят орально, фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как инертные растворители, разрыхлители, связывающие агенты, смазывающие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты, как известно специалистам в данной области техники.

В частности предусматривается, что фармацевтически приемлемый носитель позволяет осуществлять системное введение днРНК, векторов или клеток согласно настоящему изобретению. Поскольку также предусмотрено кишечное введение, возможными путями введения пациенту, нуждающемуся в медицинском вмешательстве соединений согласно настоящему изобретению, является парентеральное введение, а также трансдермальное или трансмукозальное введение (например, инсуффляция, буккальное, вагинальное, анальное введение), а также ингаляция препарата. Если применяют парентеральное введение, оно может включать прямую инъекцию соединений согласно настоящему изобретению в ткань, подверженную заболеванию, или по меньшей мере в тесной близости от нее. Однако также и внутривенное, внутриартериальное, подкожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутрикожное, внутриоболочечное и другие пути введения соединений согласно настоящему изобретению находятся в рамках компетенции специалиста в данной области техники, например, лечащего врача.

Фармацевтические композиции для внутримышечного, подкожного и внутривенного применения согласно настоящему изобретению будут обычно поставляться в стерильных водных растворах или суспензиях, забуференных до подходящего рН и изотоничности. В предпочтительном варианте реализации носитель состоит исключительно из водного буфера. В данном контексте, "исключительно" означает отсутствие вспомогательных агентов или инкапсулирующих субстанций, которые могут влиять или опосредовать захват днРНК клетками, экспрессирующими ген вируса гепатита В. Водные суспензии в соответствии с настоящим изобретением могут включать суспендирующие агенты, такие как производные целлюлозы, альгинат натрия, поливинил-пирролидон и трагантовую камедь, и увлажняющий агент, такой как лецитин. Подходящие консерванты для водных суспензий включают этил и *n*-пропил *p*-гидроксibenзоат. Фармацевтические композиции, полезные в соответствии с настоящим изобретением, также включают инкапсулированные составы для защиты днРНК от быстрого выведения из организма, такие как составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфир и полимолочную кислоту. Способы приготовления таких составов будут очевидными специалистам в данной области техники. В качестве фармацевтически приемлемых носителей можно также использовать липосомальные суспензии и биспецифические антитела. Их можно приготовить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, описанными в публикации РСТ WO91/06309 и WO 2011/003780, которые включены посредством ссылки в настоящую заявку.

Используемый в настоящей заявке термин "трансформированная клетка" представляет клетку, в которую был встроены по меньшей мере один вектор, с которого может экспрессироваться молекула днРНК или по меньшей мере одна цепь такой молекулы днРНК. Такой вектор предпочтительно представляет собой вектор, включающий регуляторную последовательность, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью, которая кодирует по меньшей мере одну кодирующую цепь или некодирующую цепь днРНК согласно настоящему изобретению.

Можно обоснованно ожидать, что более короткие днРНК, включающие одну из последовательностей из табл. 1 и 4 за вычетом нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут иметь подобную эффективность в сравнении с днРНК, описанной выше.

В одном предпочтительном варианте реализации молекулы днРНК согласно настоящему изобретению включают нуклеотиды 1-19 последовательностей, представленных в табл. 1.

Как было указано выше, в большинстве вариантов реализации настоящего изобретения молекулы днРНК, предусмотренные в настоящей заявке, включают дуплекс (без "липких концов") длиной от приблизительно 16 до приблизительно 30 нуклеотидов. Особенно полезные дуплексы днРНК имеют длину от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов. Наиболее предпочтительными являются дуплексные структуры длиной 19 нуклеотидов. В молекулах днРНК согласно настоящему изобретению некодирующая цепь является по меньшей мере частично комплементарной кодирующей цепи.

днРНК согласно настоящему изобретению могут содержать одно или более нарушений комплементарности к последовательности-мишени. В предпочтительном варианте реализации, днРНК согласно настоящему изобретению содержит не более 13 нарушений комплементарности. Если некодирующая цепь днРНК содержит нарушения комплементарности к последовательности-мишени, предпочтительно, что участок нарушения комплементарности не располагается в пределах нуклеотидов 2-7 от 5' конца некодирующей цепи. В другом варианте реализации предпочтительно, чтобы участок нарушения комплементарности не располагался в пределах нуклеотидов 2-9 от 5' конца некодирующей цепи.

Как указано выше, по меньшей мере один конец/одна цепь днРНК может иметь одноцепочечный липкий конец, состоящий из от 1 до 5, предпочтительно 1 или 2 нуклеотидов. днРНК, имеющая по

меньшей мере один липкий конец, имеет неожиданно превосходящие ингибиторные свойства, чем ее копия с тупыми концами. Более того, авторы настоящего изобретения установили, что наличие липкого конца из всего лишь одного нуклеотида усиливает интерферирующую активность днРНК без влияния на ее общую стабильность. Было доказано, что днРНК, имеющая только один липкий конец, является чрезвычайно стабильной и эффективной *in vivo*, также как в разнообразии клеток, культуральных сред клеток, крови и сыворотки. Предпочтительно одноцепочечный липкий конец расположен на 3'-конце некодирующей цепи или, в качестве альтернативы, на 3'-конце кодирующей цепи. днРНК может также иметь тупой конец, предпочтительно расположенный на 5'-конце некодирующей цепи. Предпочтительно некодирующая цепь днРНК имеет липкий конец на 3'-конце, и 5'-конец является тупым. В другом варианте реализации один или более из нуклеотидов на липком конце заменены на нуклеозидтрифосфат.

днРНК согласно настоящему изобретению можно также химически модифицировать для повышения стабильности. Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению можно синтезировать и/или модифицировать с помощью методов, прочно установившихся в данной области техники. Химические модификации могут включать, но не ограничиваться ими, 2'-модификации, введение оснований, не существующих в природе, ковалентное присоединение к лиганду и замену фосфатных связей тифосфатными связями, инвертированные дезокситимидины. В данном варианте реализации целостность структуры дуплекса усилена по меньшей мере одной, а предпочтительно двумя химическими связями. Химические связи можно образовать с помощью любой из разнообразия хорошо известных методик, например, путем введения ковалентных, ионных или водородных связей; гидрофобных взаимодействий, вандерваальсовых или стекинг-взаимодействий, с помощью координации ионами металлов или посредством использования аналогов пурина. Предпочтительно химические группы, которые можно использовать для модификации днРНК, включают, без ограничения, метиленовый синий; бифункциональные группы, предпочтительно бис-(2-хлорэтил)амин; N-ацетил-N'-(p-глиоксибензоил)цистамин; 4-тиоурацил и псорален. В одном предпочтительном варианте реализации линкер представляет собой гексаэтиленгликолевый линкер. В данном случае днРНК получают с помощью твердофазного синтеза, и гексаэтиленгликолевый линкер встраивают в соответствии со стандартными способами (например, Williams DJ and Hall KB, *Biochem.* (1996) 35:14665-14670). В частном варианте реализации 5'-конец некодирующей цепи и 3'-конец кодирующей цепи химически связаны посредством гексаэтиленгликолевого линкера. В другом варианте реализации по меньшей мере один нуклеотид днРНК содержит фосфотиоатную или фосфодитиоатную группы. Химическая связь на концах днРНК предпочтительно образована связями тройной спирали.

В некоторых вариантах реализации химическая связь может быть образована с помощью одной или нескольких связывающих групп, где такие связывающие группы являются предпочтительно поли-(оксифосфиникокси-1,3-пропандиолом) и/или цепями полиэтиленгликоля. В других вариантах реализации химическая связь может также быть образована с помощью аналогов пурина, введенного в двунитевую структуру вместо пуринов. В дальнейших вариантах реализации химическая связь может быть образована единицами азабензена, которые вводят в двунитевую структуру. В еще других вариантах реализации химическая связь может быть образована разветвленными аналогами нуклеотидов, введенными в двунитевую структуру вместо нуклеотидов. В определенных вариантах реализации образование химической связи может быть индуцировано воздействием ультрафиолетового света.

В других вариантах реализации нуклеотиды на одной или на обеих из двух отдельных цепей могут быть модифицированы для предотвращения или ингибирования активации клеточных ферментов, например определенных нуклеаз. Методики для ингибирования активации клеточных ферментов известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, 2'-аминомодификации, 2'-аминомодификации сахаров, 2'-F-модификации сахаров, 2'-F-модификации, 2'-алкил-модификации сахаров, незаряженные модификации остова, модификации морфолино, 2'-O-метил-модификации и фосфорамидат (см., например, Wagner, *Nat. Med.* (1995) 1:1116-8). Таким образом, по меньшей мере одну 2'-гидроксильную группу нуклеотидов днРНК заменяют химической группой, предпочтительно 2'-амино или 2'-метильной группой. Также по меньшей мере один нуклеотид можно модифицировать для образования замкнутого нуклеотида. Такой замкнутый нуклеотид содержит метиленовый мостик, который соединяет 2'-кислород рибозы с 4'-углеродом рибозы. Введение замкнутого нуклеотида в олигонуклеотид улучшает аффинность комплементарных последовательностей и повышает температуру плавления на несколько градусов.

Модификации молекул днРНК, предусмотренных в настоящей заявке, могут положительно влиять на их стабильность *in vivo*, как же как *in vitro*, а также улучшить их доставку к (подверженному заболеванию) участку-мишени. Более того, такие структурные и химические модификации могут положительно влиять на физиологические реакции на молекулы днРНК во время введения, т.е. высвобождение цитокинов, которое предпочтительно угнетается. Такие химические и структурные модификации известны в данной области техники и, среди прочего, освещены в *Nawrot Current Topics in Med Chem*, (2006) 6:913-925.

Конъюгирование лиганда с днРНК может повысить клеточную абсорбцию последней, а также нацеленность на конкретную ткань. В некоторых случаях, гидрофобный лиганд конъюгируют с днРНК для

облегчения прямого проникновения через клеточную мембрану. В качестве альтернативы, лиганд, конъюгированный с днРНК, является субстратом для рецептор-опосредованного эндоцитоза. Эти подходы использовали для облегчения клеточного проникновения антисмысловых нуклеотидов. Например, холестерин конъюгировали с различными антисмысловыми нуклеотидами, приводя к образованию соединений, которые являются существенно более активными в сравнении с их неконъюгированными аналогами (см. Manoharan M, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* (2002) 12:103). Другие липофильные соединения, которые конъюгировали с олигонуклеотидами, включают 1-пиренмасляную кислоту, 1,3-бис-О-(гексадецил)глицерин и ментол. Одним из примеров лиганда для рецептор-опосредованного эндоцитоза является фолиевая кислота. Фолиевая кислота проникает в клетки в результате эндоцитоза, опосредованного рецептором фолиевой кислоты. Соединения днРНК, несущие фолиевую кислоту, будут эффективно транспортироваться в клетку в результате эндоцитоза, опосредованного рецептором фолиевой кислоты. Присоединение фолиевой кислоты к 3'-концу олигонуклеотида приводит к увеличению эффективности клеточного захвата олигонуклеотида (Li S, Deshmukh NM, and Huang L, *Pharm. Res.* (1998) 15:1540). Другие лиганды, которые конъюгировали с олигонуклеотидами, включают полиэтиленгликоли, кластеры углеводов, перекрестносшивающие агенты, конъюгаты порфирина и пептиды для доставки.

В некоторых случаях конъюгация катионного лиганда с олигонуклеотидами часто приводит к улучшенной устойчивости к нуклеазам. Типичными примерами катионных лигандов являются пропиламмоний и диметилпропиламмоний. Примечательно, что антисмысловые нуклеотиды, как было сообщено, сохраняют свою высокую связывающую аффинность к мРНК, когда катионный лиганд диспергируют по всей длине олигонуклеотида. См. Manoharan M, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* (2002) 12:103 и включенные в нее ссылки.

днРНК согласно настоящему изобретению, конъюгированную с лигандом, можно синтезировать с применением днРНК, которая поддерживает реактивные функциональные свойства, такие как свойства, происходящие от присоединения связывающей молекулы к днРНК. Этот реактивный олигонуклеотид может вступить в реакцию непосредственно с коммерчески доступными лигандами, синтезированными лигандами, несущими любую из множества защитных групп, или лигандами, несущими связывающую группу, присоединенную к ним. Способы согласно настоящему изобретению облегчают синтез днРНК, конъюгированной с лигандом, с использованием в некоторых предпочтительных вариантах реализации мономеров нуклеозидов, которые были соответствующим образом конъюгированы с лигандами, которые можно затем присоединить к материалу твердой подложки. Такие лиганд-нуклеозидные конъюгаты, при необходимости присоединенные к материалу твердой подложки, готовят в соответствии с некоторыми предпочтительными вариантами реализации способов согласно настоящему изобретению посредством реакции выбранного связывающегося сывороткой лиганда со связывающей группой, расположенной в 5'-части нуклеозида или олигонуклеотида. В некоторых случаях днРНК, несущая аралкильный лиганд, присоединенный к 3'-концу днРНК, готовят с помощью первоначального ковалентного присоединения блока, связывающего мономер, к подложке из стекла с контролируемыми порами через длинноцепочечную аминоалкильную группу. Затем нуклеотиды присоединяют посредством стандартных методик твердофазного синтеза к блоку, связывающему мономер, присоединенному к твердой подложке. Блок, связывающий мономер, может представлять собой нуклеозид или другое органическое соединение, совместимое с твердофазным синтезом.

днРНК, используемую в конъюгатах согласно настоящему изобретению, можно беспрепятственно в установленном порядке создавать посредством хорошо известной методики твердофазного синтеза. Также известно применение подобных методик для подготовки других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

Указания, относящиеся к синтезу конкретных модифицированных олигонуклеотидов, можно найти в следующих Патентах США: Патенте США № 5218105, который описывает нуклеотиды, конъюгированные с полиамином, Патент США № 5541307, который описывает олигонуклеотиды с модифицированными остовами; Патент США № 5521302, который описывает процессы для приготовления олигонуклеотидов, имеющих хиральные фосфорные связи; Патент США № 5539082, который описывает пептидо-нуклеиновые кислоты; Патент США № 5554746, который описывает олигонуклеотиды с Р-лактамными остовами; Патент США № 5,571,902, который описывает способы и материалы для синтеза олигонуклеотидов; Патент США № 5578718, который описывает нуклеотиды, имеющие алкилтиольные группы, где такие группы можно использовать в качестве линкеров к другим группам, присоединенным к любому из множества положений нуклеозида; Патент США № 5587361, который описывает олигонуклеотиды, имеющие фосфотиоатные связи высокой хиральной чистоты; Патент США № 5506351, который описывает процессы приготовления 2'-О-алкилгуанозина и родственных соединений, включая соединения 2,6-диаминопурина; Патент США № 5587469, который описывает олигонуклеотиды, имеющие N-2-замещенные пурины; Патент США № 5587470, который описывает олигонуклеотиды, имеющие 3-дезапурины; Патент США № 5608046, который описывает конъюгированные с аналогами 4'-десметильного нуклеозида; Патент США № 5610289, который описывает остов-модифицированные аналоги нуклеотидов; Патент США № 6262241, который описывает, среди прочего, способы синтеза 2'-фторолигонуклеотидов.

В днРНК, конъюгированной с лигандом, и в связанных нуклеозидах согласно настоящему изобретению, специфичных к последовательности, несущих молекулы лиганда, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды можно объединить на подходящем синтезаторе олигонуклеотидов, используя стандартные предшественники нуклеотидов или нуклеозидов или предшественники конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающую группу, предшественники конъюгатов лиганд-нуклеотид или нуклеозид, которые уже несут молекулу лиганда, или связывающие блоки, несущие лиганд и не несущие нуклеозид.

При использовании предшественников, конъюгированных с нуклеотидом, которые уже несут связывающую группу, синтез специфичных к последовательности связывающих нуклеозидов завершают обычным образом, и молекула лиганда затем реагирует со связывающей группой с образованием нуклеотида, конъюгированного с лигандом. Конъюгаты олигонуклеотидов, несущие разнообразие молекул, таких как стероиды, витамины, липиды и репортерные молекулы, были описаны ранее (см. Manoharan et al., Заявка РСТ WO 93/07883). В предпочтительных вариантах реализации олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды согласно настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора, используя фосфорамидиты, происходящие от конъюгатов лиганд-нуклеозид в дополнение к коммерчески доступным фосфорамидитам.

Включение 2'-О-метил, 2'-О-этил, 2'-О-пропил, 2'-О-аллил, 2'-О-аминоалкил или 2'-дезоксид-2'-фтор группы в нуклеозиды нуклеотида повышает гибридационные свойства олигонуклеотида. Также олигонуклеотиды, содержащие фосфотиоатные остовы, имеют повышенную стабильность к воздействию нуклеаз. Таким образом, замещенные связанные нуклеозиды согласно настоящему изобретению могут быть дополнены для включения одного или обоих фосфотиоатных остовов или 2'-О-метил, 2'-О-этил, 2'-О-пропил, 2'-О-аллил, 2'-О-аминоалкил или 2'-дезоксид-2'-фтор групп.

В некоторых предпочтительных вариантах реализации, последовательности замещенных нуклеозидов согласно настоящему изобретению, обладающие аминогруппой на 5'-конце, готовят, используя синтезатор ДНК, и затем проводят реакцию с активным производным эфира выбранного лиганда. Активные производные эфиров являются хорошо известными специалистам в данной области техники. Типичные активные эфиры включают эфиры N-гидросукцинимида, тетрафторофеноловые эфиры, пентафторофеноловые эфиры и пентахлорофеноловые эфиры. В результате реакции аминогруппы и активного эфира образуется олигонуклеотид, в котором выбранный лиганд присоединен к 5'-положению посредством линкерной группы. Аминогруппа на 5'-конце может быть приготовлена, используя реагент 5'-аминомодификатор С6. В предпочтительных вариантах реализации молекулы лигандов можно конъюгировать с олигонуклеотидами в положении 5' с применением фосфорамидита лиганд-нуклеозид, где лиганд связан с 5'-гидроксигруппой непосредственно или опосредованно через линкер. Такие фосфорамидиты лиганд-нуклеозид обычно используют по окончании процедуры автоматизированного синтеза для получения олигонуклеотида, конъюгированного с лигандом, несущего лиганд на 5'-конце.

В одном предпочтительном варианте реализации способов согласно настоящему изобретению получение олигонуклеотидов, конъюгированных с лигандом, начинают с выбора молекул подходящего предшественника, на основании которого конструируют молекулу лиганда. Обычный предшественник представляет собой соответствующим образом защищенное производное широко используемых нуклеозидов. Например, синтетические предшественники для синтеза олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению, конъюгированных с лигандом, включают, но не ограничиваются ими, 2'-аминоалкилокси-5'-ODMT-нуклеозиды, 2'-6-аминоалкиламино-5'-ODMT-нуклеозиды, 5'-6-аминоалкокси-2'-дезоксинуклеозиды, 5'-6-аминоалкокси-2'-защищенные-нуклеозиды, 3'-6-аминоалкокси-5'-ODMT-нуклеозиды и 3'-аминоалкиламино-5'-ODMT-нуклеозиды, которые могут быть защищены в части нуклеинового основания молекулы. Способы синтеза таких аминосвязанных защищенных предшественников нуклеозидов известны среднему специалисту в данной области техники.

Во многих случаях, в ходе получения соединений согласно настоящему изобретению используют защитные группы. Используемый в настоящей заявке термин "защищенный" означает, что указанная группа имеет защитную группу, присоединенную к ней. В некоторых предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения, соединения содержат одну или более защитную группу. Широкое разнообразие защитных групп можно применять в способах согласно настоящему изобретению. В общем виде защитные группы делают химические функциональные группы инертными к специфическим условиям реакции, и могут быть введены в или удалены из таких функциональных групп в молекуле без существенного повреждения остальной части молекулы.

Защитные группы в целом и гидроксильные защитные группы в частности хорошо известны в данной области техники (Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Chapter 2, 2d ed., John Wiley & Sons, New York, 1991). Аминозащитные группы, стабильные по отношению к обработке кислотой, можно селективно удалить обработкой основанием; данные группы применяют, чтобы сделать реактивные аминогруппы селективно доступными для замещения. Примерами таких групп являются Fmoc и различные замещенные сульфонилэтилкарбаматы, примером которых является группа Nsc.

Дополнительно защитные группы для аминогрупп включают, но не ограничиваются ими, карбаматные защитные группы, такие как 2-триметилсилилэтоксикарбонил (Теос), 1-метил-1-(4-бифенилил)-

этоксикарбонил (Boc), *t*-бутоксикарбонил (BOC), аллилкарбонил (Alloc), 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc) и бензилоксикарбонил (Cbz); амидные защитные группы, такие как формил, ацетил, тригалоацетил, бензоил и нитрофенилацетил; сульфонамидные защитные группы, такие как 2-нитробензенсульфонил; и имино- и циклические имидные защитные группы, такие как фталимид и дитиасукциноил. Соединения и способы согласно настоящему изобретению также предусматривают эквиваленты этих аминозащитных групп.

Многие твердые подложки являются коммерчески доступными, и средний специалист в данной области техники может легко выбрать твердую подложку для использования на этапах твердофазного синтеза. В определенных вариантах реализации используют универсальные подложки. Универсальная подложка, хорошо известная в данной области техники, позволяет получать олигонуклеотиды, имеющие необычные или модифицированные нуклеотиды, расположенные на 3'-конце олигонуклеотида. В дополнение, было сообщено, что олигонуклеотид можно удалить с универсальной подложки под действием более мягких условий реакции, если олигонуклеотид присоединен к твердой подложке посредством син-1,2-ацетоксифосфатной группы, которая легче подвергается щелочному гидролизу. См. Guzaev AI, and Manoharan M.J. *Am. Chem. Soc.* (2003) 125:2380.

Нуклеозиды связаны фосфорсодержащими или не содержащими фосфор ковалентными внутринуклеозидными связями. С целью идентификации такие конъюгированные нуклеозиды можно охарактеризовать как лиганд-несущие нуклеозиды или конъюгаты лиганд-нуклеозид. Связанные нуклеозиды, имеющие аралкильный лиганд, конъюгированный с нуклеозидом в рамках их последовательности, будут демонстрировать повышенную активность днРНК в сравнении с соединениями днРНК, которые не являются конъюгированными.

Олигонуклеотиды согласно настоящему изобретению, конъюгированные с лигандом аралкилом, также включают конъюгаты олигонуклеотидов и связанных нуклеозидов, где лиганд присоединен непосредственно к нуклеозиду или нуклеотиду без посредничества линкерной группы. Лиганд может предпочтительно быть присоединен посредством связывающих групп через его карбоксильную, амино- или оксогруппу. Типичными связывающими группы могут быть сложноэфирные, амидные или карбаматные группы.

Конкретные примеры предпочтительных модифицированных олигонуклеотидов, предусмотренных для применения в нуклеотидах согласно настоящему изобретению, конъюгированных с лигандом, включают олигонуклеотиды, содержащие модифицированные остовы или внутринуклеозидные связи, не существующие в природе. Как определено в настоящей заявке, олигонуклеотиды, имеющие модифицированные остовы или внутринуклеозидные связи, включают олигонуклеотиды, которые содержат атом фосфора в остове, и олигонуклеотиды, которые не содержат атома фосфора в остове. Для целей настоящего изобретения модифицированные олигонуклеотиды, которые не содержат атома фосфора во внутрисахаридном остове, можно также рассматривать в качестве олигонуклеотидов.

Конкретные химические модификации олигонуклеотидов описаны ниже. Не обязательно все положения в представленном соединении должны быть единообразно модифицированными. Напротив, в отдельное соединение днРНК или даже в ее отдельный нуклеотид можно включать более чем одну модификацию.

Предпочтительные модифицированные внутринуклеозидные связи или остовы включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5' связи, их 2'-5' связанные аналоги, и аналоги, имеющие инвертированную полярность, где смежные пары нуклеозидных единиц связаны от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот.

Типичные Патенты Соединенных Штатов, имеющие отношение к получению вышеописанных связей, содержащих атом фосфора, включают, но не ограничиваются ими, Патенты США №№ 4469863, 5023243, 5264423, 5321131, 5399676, 5405939, 5453496, 5455233 и 5466677, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки.

Предпочтительные модифицированные внутринуклеозидные связи или остовы, которые не включают атом фосфора (т.е., олигонуклеозиды), имеют остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными внутрисахаридными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными внутрисахаридными связями или одной или более короткоцепочечной гетероатомной или гетероциклической внутрисахаридными связями. Они включают остовы, которые имеют связи морфолино (образованные частично сахаридной частью нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы, метиленаформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкеносодержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленимино и метиленигидразино остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, имеющие смешанные части компонентов N, O, S и CH₂.

Типичные Патенты Соединенных Штатов, имеющие отношение к получению вышеописанных оли-

гонуклеотидов, включают, но не ограничиваются ими, Патенты США №№ 5034506, 5214134, 5216141, 5264562, 5466677, 5470967, 5489677, 5602240 и 5663312, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки.

В других предпочтительных миметиках олигонуклеотидов, как сахар, так и внутринуклеозидная связь (т.е. остов) единиц нуклеозидов замещены новыми группами. Единицы нуклеинового основания поддерживаются для гибридизации с соответствующим соединением-мишенью нуклеиновой кислоты. Один такой нуклеотид, миметик олигонуклеотида, для которого были продемонстрированы превосходные гибридизационные свойства, называют пептидо-нуклеиновой кислотой (ПНК). В соединениях ПНК сахарный остов олигонуклеотида замещен амидосодержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания сохраняются и являются связанными непосредственно или опосредованно с атомами амидной части остова. Указания относительно соединений ПНК можно найти, например, в Патенте США № 5539082.

Некоторые предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения применяют олигонуклеотиды с фосфотиоатными связями и олигонуклеотиды с гетероатомными остовами, в частности $\text{CH}_2\text{NHOCH}_2$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{OCH}_2$ [известный как метиленовый (метилимико) или ММ1 остов], $\text{CH}_2\text{ON}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$, $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2$ и $\text{ON}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2$ [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как OPOCH_2] согласно данной выше ссылке на Патент США № 5489677, и амидные остовы согласно данной выше ссылке на Патент США № 5602240. Также предпочтительными являются олигонуклеотиды, имеющие остов из структур морфолино согласно данной выше ссылке на Патент США № 5034506.

Олигонуклеотиды, применяемые в олигонуклеотидах согласно настоящему изобретению, конъюгированных с лигандами, могут дополнительно или в качестве альтернативы включать модификации или замены нуклеотидного основания (часто обозначаемого в данной области техники просто как "основание"). Используемый в настоящей заявке термин "немодифицированные" или "существующие в природе" нуклеотидные основания включает пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают другие синтетические и существующие в природе нуклеиновые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоурацил и цитозин, 5-пропинил урацил и цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-гало, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-гало, в особенности 5-бромо, 5-трифторметил и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин и 3- деазагуанин и 3- деазааденин.

Другие нуклеиновые основания включают основания, раскрытые в Патенте США № 3,687,808, или каким-либо другим образом известные в данной области техники или коммерчески доступные. Некоторые из этих нуклеиновых оснований являются особенно полезными для повышения связывающей аффинности олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Замены на 5-метилцитозин, как было показано, повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C и являются в настоящее время предпочтительными заменами оснований, даже более предпочтительными при комбинации с 2'-метоксиэтиловыми модификациями сахара.

Примеры патентов Соединенных Штатов, имеющие отношение к получению некоторых из вышеупомянутых модифицированных нуклеиновых оснований, также как и других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, но не ограничиваются ими, Патент США № 3687808, а также Патенты США №№ 5134066, 5459255, 5552540, 5594121 и 5596091, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

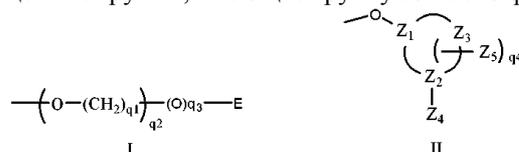
В некоторых вариантах реализации, олигонуклеотиды, применяемые в олигонуклеотидах согласно настоящему изобретению, конъюгированных с лигандами, могут дополнительно или в качестве альтернативы включать одну или более замещенных групп сахаров. Предпочтительные олигонуклеотиды включают одну из следующих групп в положении 2': OH; F; O-, S- или N-алкил, O-, S- или N-алкенил или O, S- или N-алкенил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенные или незамещенные с C_1 - C_{10} -алкил или C_2 - C_{10} -алкенил и алкинил. Особенно предпочтительными являются $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ и $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, где n и m представляют собой числа от 1 до приблизительно 10. Другие предпочтительные олигонуклеотиды включают одну из следующих групп в положении 2': C_1 - C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂ CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силлил и ПНК-расцепляющая группа, репортерная группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств олигонуклеотида или группа для улучшения фармакодинамических свойств олигонуклеотида и другие заместители, имеющие подобные свойства. Предпочтительная моди-

фикация включает 2'-метоксиэтокси (2'-OCH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ), т.е., алкоксиалкоксигруппу. Еще одна предпочтительная модификация включает 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е., группу O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известную как 2'-DMAOE, как описано в Патенте США № 6127533.

Другие предпочтительные модификации включают 2'-метокси(2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации можно также осуществить в других положениях олигонуклеотида, особенно в положении 3' сахара на 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5' связанных олигонуклеотидах.

Используемый в настоящей заявке термин "замещающая группа сахара" или "2'-замещающая группа" включает группы, присоединенные к положению 2' рибофуранозильной группы с или без атома кислорода. Замещающие группы сахара включают, но не ограничиваются ими, фтор, O-алкил, O-алкиламино, O-алкилалкокси, защищенную O-алкиламино, O-алкиламиноалкил, O-алкилимидазол и полиэферы формулы (O-алкил)_m, где m представляет собой число от 1 до приблизительно 10. Предпочтительными среди этих полиэфиров являются линейные и циклические полиэтиленгликоли (PEG) и (PEG)-содержащие группы, такие как краун-эферы и, среди прочего, раскрытые Delgado с соавт. (Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems (1992) 9:249). Дополнительные модификации сахаров были раскрыты Cook (Anti-fibrosis Drug Design, (1991) 6:585-607). Фтор, O-алкил, O-алкиламино, O-алкилимидазол, O-алкиламиноалкил и алкиламино-заместители описаны в Патенте США № 6166197 под названием "Олигомерные соединения, имеющие пиримидиновый(ые) нуклеотид(ы) с 2' и 5'-заместителями", включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

Дополнительные замещающие группы сахара, соответствующие настоящему изобретению, включают группы 2'-SR и 2'-NR₂, где каждый R представляет собой независимо водород, защитную группу или замещенный или незамещенный алкил, алкенил или алкинил. Нуклеозиды 2'-SR раскрыты в Патенте США № 5670633, включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Включение синтонов мономера 2'-SR раскрыто Hamm с соавторами (J. Org. Chem., (1997) 62:3415-3420). Нуклеозиды 2'-NR раскрыты Thomson JB, J. Org. Chem., (1996) 61:6273-6281; и Polushin с соавторами, Tetrahedron Lett., (1996) 37:3227-3230. Еще одни типичные 2'-замещенные группы, соответствующие настоящему изобретению, включают замещенные группы, имеющие группу согласно формуле I или II



где

E представляет собой C₁-C₁₀-алкил, N(Q3)(Q4) или N=C(Q3)(Q4);

каждый из Q3 и Q4 представляет собой, независимо, H, C₁-C₁₀-алкил, диалкиламиноалкил, защитную группу азота, связанную или несвязанную группу конъюгата, линкер к твердой подложке, или Q3 и Q4, оба, вместе образуют защитную группу азота или кольцевую структуру, дополнительно включающую по меньшей мере один дополнительный гетероатом, который выбирают из N и O;

q1 представляет собой число от 1 до 10;

q2 представляет собой число от 1 до 10;

q3 представляет собой 0 или 1;

q4 представляет собой 0, 1 или 2;

каждый из Z1, Z2 и Z3 представляет собой, независимо, C₄-C₇-циклоалкил, C₅-C₁₄-арил или C₃-C₁₅-гетероцикл, где гетероатом в указанной гетероциклической группе выбирают из кислорода, азота и серы;

Z4 представляет собой OM1, SM1 или N(M1)₂;

каждый M1 представляет собой, независимо, H, C₁-C₈-алкил, C₁-C₈-галоалкил, C(=NH)N(H)M2, C(=O)N(H)M2 или OC(=O)N(H)M2;

M2 представляет собой H или C₁-C₈-алкил и

Z5 представляет собой C₁-C₁₀-алкил, C₁-C₁₀-галоалкил, C₂-C₁₀-алкенил, C₂-C₁₀-алкинил, C₆-C₁₄-арил, N(Q3)(Q4), OQ3, гало, SQ3 или CN.

Типичные замещающие группы для 2'-O-сахаров согласно формуле I раскрыты в Патенте США № 6172209 под названием "Копированные 2'-оксиэтоксиолигонуклеотиды", включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Типичные циклические замещающие группы для 2'-O-сахаров согласно формуле II раскрыты в Патенте США № 6271358 под названием "Нацеленные на РНК 2'-модифицированные олигонуклеотиды, которые являются конформационно предварительно организованными", включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

Сахара, имеющие O-заместители на рибозильном кольце, также соответствуют настоящему изобретению. Типичные заместители для O кольца включают, но не ограничиваются ими, S, CH₂, CHF и CF₂.

Олигонуклеотиды могут также иметь миметики сахара, такие как циклобутиловые группы, вместо пентофуранозного сахара. Типичные Патенты Соединенных Штатов, относящиеся к получению таких

модифицированных сахаров, включают, но не ограничиваются ими, Патенты США №№ 5359044, 5466786, 5519134, 5591722, 5597909, 5646,265 и 5700920, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Дополнительные модификации можно также вводить в других положениях олигонуклеотида, особенно в положении 3' сахара на 3'-концевом нуклеотиде. Например, одна дополнительная модификация олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению, конъюгированных с лигандом, включает химическое связывание с олигонуклеотидом одной или более дополнительных нелигандных групп или конъюгатов, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточный захват олигонуклеотида. Такие группы включают, но не ограничиваются ими, липидные группы, такие как группа холестерина (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, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., (1991) 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., (1990) 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, (1993) 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., (1995) 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., (1990) 18:3777), полиаминовую или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, (1995) 14:969) или уксусную кислоту адамантана (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., (1995) 36:3651), палмитильную группу (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, (1995) 1264:229), или октадециламин- или гексиламинокарбонил-оксихолестериновую группу (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., (1996) 277:923).

Настоящее изобретение также охватывает композиции, в которых используют олигонуклеотиды, которые являются в значительной степени хирально чистыми по отношению к конкретным положениям олигонуклеотидов. Примеры в значительной степени хирально чистых олигонуклеотидов включают, но не ограничиваются ими, олигонуклеотиды, имеющие фосфотиоатные связи, которые по меньшей мере на 75% являются Sp или Rp (Cook et al., Патент США № 5587361), и олигонуклеотиды, имеющие в значительной степени хирально чистые (Sp или Rp) алкилфосфонатные, фосфорамидатные или фосфотриэфирные связи (Cook, Патенты США №№ 5212295 и 5521302).

В некоторых случаях олигонуклеотид можно модифицировать с помощью нелигандной группы. Количество нелигандных молекул, конъюгированных с олигонуклеотидами с целью повышения активности, улучшения клеточного распределения или клеточного захвата олигонуклеотида, и процедуры для осуществления такого конъюгирования доступны в научной литературе. Такие нелигандные группы включают липидные группы, такие как холестерин (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, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., (1991) 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., (1990) 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, (1993) 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., (1995) 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., (1990) 18:3777), полиаминовую или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, (1995) 14:969) или уксусную кислоту адамантана (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., (1995) 36:3651), палмитильную группу (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, (1995) 1264:229), или октадециламин- или гексиламинокарбонил-оксихолестериновую группу (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., (1996) 277:923). Типичные процедуры конъюгации включают синтез олигонуклеотидов, несущих аминоклипер в одном или более положениях последовательности. Аминогруппа затем реагирует с конъюгируемой молекулой, при участии соответствующего связывающего или активирующего агента. Реакцию конъюгации можно осуществлять с олигонуклеотидом, который остается связанным с твердой подложкой, или после отделения олигонуклеотида в жидкой фазе. Очистка конъюгата олигонуклеотидов с помощью ВЭЖХ обычно позволяет получать чистый конъюгат.

В качестве альтернативы, молекулу, которую необходимо конъюгировать, можно преобразовать в структурный элемент, такой как фосфорамидит, посредством спиртовой группы, присутствующей в молекуле, или путем присоединения линкера, несущего спиртовую группу, которая может быть фосфорилирована.

Важно, что каждый из этих подходов можно применять для синтеза олигонуклеотидов, конъюгированных с лигандом. Аминосвязанные олигонуклеотиды можно объединить непосредственно с лигандом посредством использования связывающих реагентов или после активации лиганда в качестве NHS N-гидроксисукцинимид или пентфторфенолатным сложным эфиром. Лиганды фосфорамидиты можно синтезировать посредством присоединения аминоксанольного линкера к одной из карбоксильных групп с последующим фосфитилированием терминальной спиртовой функциональной группы. Можно также использовать другие линкеры, такие как цистамин, для конъюгирования с хролацетильным линкером, присутствующим на синтезированном олигонуклеотиде.

Специалисту в данной области техники хорошо известны способы включения молекул согласно настоящему изобретению в клетки, ткани и организмы. Соответствующие примеры были также предоставлены выше в детальном описании настоящего изобретения. Например, молекулы нуклеиновой кислоты или векторы согласно настоящему изобретению, кодирующие по меньшей мере одну цепь днРНК согласно настоящему изобретению, могут быть включены в клетки или ткани с помощью способов, известных в данной области техники, таких как трансфекции и т.п.

Также были представлены пути и способы введения молекул днРНК. Например, направленная доставка с помощью гликозилированных и модифицированных фолиевой кислотой молекул, включая использование полимерных носителей с лигандами, такими как галактоза и лактоза, или присоединение фолиевой кислоты к различным макромолекулам, позволяет осуществлять связывание молекул, которые необходимо доставить, с рецепторами фолиевой кислоты. Известна направленная доставка с помощью пептидов и белков, отличных от антител, например, включая RGD-модифицированные наночастицы для доставки миРНК *in vivo* или мультикомпонентные (невирусные) системы доставки, включая короткие циклодекстрины, адамантин-РЕG. Также предусмотрена направленная доставка с использованием антител или фрагментов антител, включая (моновалентные) Fab-фрагменты антитела (или другие фрагменты такого антитела) или одноцепочечные антитела. Подходы для инъекций для целевой направленной доставки включают, среди прочего, гидродинамическую внутривенную инъекцию. Также для направленной доставки можно использовать холестеринные конъюгаты днРНК, где конюгация с липофильными группами повышает клеточный захват и улучшает фармакокинетику и биораспределение олигонуклеотидов в тканях. Также известны катионные системы доставки, в соответствии с которыми синтетические векторы с результирующим положительным (катионным) зарядом облегчают образование комплекса с полианионной нуклеиновой кислотой и взаимодействие с отрицательно заряженной мембраной клетки. Такие катионные системы доставки включают также катионные липосомальные системы доставки, катионные системы доставки на основе полимеров и пептидов. Другие системы доставки для клеточного захвата днРНК/миРНК представляют собой аптамерные дс/миРНК. Также подходы генной терапии могут быть использованы для доставки молекул днРНК согласно настоящему изобретению или молекул нуклеиновой кислоты, их кодирующих. Такие системы включают использование непатогенных вирусов, модифицированных вирусных векторов, а также доставку посредством наночастиц или липосом. Другие способы доставки для клеточного захвата днРНК являются экстракорпоральными, например, обработка клеток, органов и тканей *ex vivo*. Некоторые из этих технологий описаны и обобщены в публикациях, таких как Akhtar, *Journal of Clinical Investigation* (2007) 117:3623-3632, Nguyen et al., *Current Opinion in Molecular Therapeutics* (2008) 10:158-167, Zamboni, *Clin Cancer Res* (2005) 11:8230-8234 or Ikeda et al., *Pharmaceutical Research* (2006) 23:1631-1640.

Если не определено обратное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, можно использовать на практике или при тестировании изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки и патенты включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Предусмотренные выше варианты реализации и пункты настоящего изобретения иллюстрируются следующими не ограничивающими примерами.

Примеры

Идентификация днРНК для терапевтического применения. Конструирование днРНК проводили для идентификации днРНК, специфически нацеленной на генотипы А, В, С и D вируса гепатита В для терапевтического применения.

Сначала известные геномные последовательности вируса гепатита В загружали из базы NCBI Genbank (учетные номера приведены в табл. 6). Информацию о генотипах брали из файлов NCBI Genbank или определяли с помощью компьютерного полуавтоматического сравнения с базовыми геномами (учетные номера приведены в табл. 6).

Геномные последовательности генотипов А-D вируса гепатита В изучали с помощью компьютерного анализа для идентификации оптимальных областей-мишеней для агентов РНКи, а именно высоко консервативных последовательностей участков длиной 17 нуклеотидов, которые были бы идентичны по меньшей мере на 90% для всех последовательностей.

При идентификации агентов иРНК выбор ограничивали последовательностями 17меров, имеющих по меньшей мере два нарушения комплементарности по отношению к любой последовательности в базе данных человека Ref Seq (версия 41), которая, как мы предполагаем, представляет полный транскриптом человека, используя соответствующий алгоритм.

Все последовательности 17меров, содержащие четыре или более последовательных G (поли-G последовательности), исключали из синтеза.

Последовательности длиной 19 нуклеотидов определяли как скрывающие выбранные 17меры в по-

ложениях со 2 по 18.

Эти последовательности 19 меров дали агенты РНК интерференции (РНКи), перекрестно-реактивные с геномными последовательностями генотипов А-Д вируса гепатита В, и образовали основу для синтеза агентов РНКи в прилагаемых табл. 1 и 2.

Синтез днРНК.

Олигонуклеотиды синтезировали в соответствии с фосфорамидитной технологией на твердой фазе. В зависимости от масштаба использовали синтезатор ABI 394 (Applied Biosystems) или АКТА oligopilot 100 (GE Healthcare, Фрайбург, Германия). Синтез осуществляли на твердой подложке, изготовленной из стекла с контролируемым размером пор (CPG, 520Å, с нагрузкой 75 микроМоль/г, полученной от Prime Synthesis, Астон, Пенсильвания, США). Все 2'-модифицированные фосфорамидиты РНК, а также вспомогательные реактивы заказывали у SAFC (Гамбург, Германия). Использовали следующие 2'-О-метилфосфорамидиты: (5'-О-диметокситритил-N⁶-(бензоил)-2'-О-метиладенозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфорамидит, 5'-О-диметокситритил-N⁴-(ацетил)-2'-О-метилцитидин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфорамидит, (5'-О-диметокситритил-N²-(изобутирил)-2'-О-метилгуанозин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино)фосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-О-метилуридин-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропиламино) фосфорамидит. 2'-дезоксид-2'-фтор-фосфорамидиты несли те же защитные группы, что 2'-О-метил РНК амидиты. Все амидиты растворяли в безводном ацетонитриле (100 мМ) и добавляли молекулярные сита (3Å). Для образования 5'-фосфата использовали 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]этил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)фосфорамидит производства Glen Research (Стерлинг, Вирджиния, США). Для введения С-6 аминоконектора на 5'-конец олигомеров применяли 6-(трифторацетиламино)гексил-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит производства Thermo Fisher Scientific (Милуоки, Висконсин, США) 5'-модификации вводили без каких-либо изменений цикла синтеза. В качестве активирующего раствора использовали 5-этилтиотетразол (ЕТТ, 500 мМ в ацетонитриле). Время контакта составляло 6 мин. Для введения фосфотиоатных связей применяли 50 мМ раствор 3-((диметиламино-метил)иден)амино-3Н-1,2,4-дитиазол-3-тиона (DDTT, полученный от AM Chemicals, Оушенсайд, Калифорния, США) в безводном ацетонитриле/пиридине (1:1 об./об.).

Отделение и снятие защитных групп с присоединенного к подложке олигомера. После окончания твердофазного синтеза удаляли цианоэтильные защитные группы с помощью 30-минутной обработки 20% диэтиламино в ацетонитриле без отделения олигонуклеотидов от подложки. Затем высушенную твердую подложку переносили в пробирку вместимостью 15 мл и обрабатывали концентрированным водным аммиаком (Aldrich) в течение 18 ч при 40°C. После центрифугирования супернатант переносили в новую пробирку и промывали стекла с контролируемым размером пор водным аммиаком. Объединенные растворы испаряли, твердый остаток растворяли в буфере А (см. ниже).

Очистка олигонуклеотидов.

Неочищенные олигомеры очищали с помощью анионообменной ВЭЖХ, используя колонку, заполненную Source Q15 (GE Healthcare), и систему АКТА Explorer (GE Healthcare). Буфер А представлял собой 10 мМ перхлорат натрия, 20 мМ Трис, 1 мМ EDTA, pH 7,4 (Fluka, Букс, Швейцария) и содержал 20% ацетонитрила, буфер В представлял собой буфер А за исключением 500 мМ перхлората натрия. Применяли градиент от 22%В до 42%В в 32 объемах колонки (CV). Регистрировали УФ-поглощение при 280 нм Соответствующие фракции объединяли и преципитировали с помощью 3М NaOAc, pH=5,2 и 70% этанола. Затем осадок промывали 70% этанолом. В качестве альтернативы проводили обессоливание, используя колонки Sephadex HiTrap (GE Healthcare) в соответствии с инструкцией производителя.

Отжиг олигонуклеотидов для образования мРНК. Комплементарные цепи смешивали с помощью объединения эквимольных растворов РНК. Смесь лиофилизировали и восстанавливали соответствующим объемом буфера для отжига (100 мМ NaCl, 20 мМ фосфат натрия, pH 6,8) для достижения желаемой концентрации. Раствор помещали на водяную баню при 80°C, которую охлаждали до комнатной температуры в течение 3 ч.

Скрининг ВГВ мРНК-направленной днРНК *in vitro*. Вектор psiCHECK™-2 (Promega) содержит два репортерных гена для мониторинга активности РНКи: синтетическую версию гена люциферазы *genilla* (hRluc) и синтетический ген люциферазы светлячков (hLuc+). Измерение активности люциферазы светлячков позволяет оценивать изменения, не связанные с активностью РНКи исследуемой днРНК. Активность люциферазы *genilla* и светлячков измеряли, используя систему анализа люциферазы Dual-Glo® (Promega). Интересующие сайты-мишени ВГВ встраивали после клонирования в вектор psiCHECK™-2, во множественную клонирующую область, расположенную на 3' от стоп-кодона трансляции и полиА хвоста синтетического гена люциферазы *genilla*. Линию клеток COS-7 трансфицировали вектором и последовательно обрабатывали липоплексами днРНК-липофектамин 2000, направленными на последовательности ВГВ. Эффект РНКи, которым обладает днРНК в отношении клонированного сайта-мишени ВГВ, определяли, измеряя активность слитого гена люциферазы *genilla*.

Создание векторов psiCHECK, содержащих последовательности-мишени.

С целью изучения активности днРНК в отношении ВГВ, конструировали двойной люциферазный

ВГВ репортер. Области с 84 по 805, с 1075 по 1992, с 2165 по 2530 и с 2718 по 2940 геномной последовательности вируса гепатита В с учетным номером EU554538.1 (генотип С) объединяли *in silico*. Преднамеренно вводили две мутации (128 А→Т, 598 Т→С, положения относятся к EU554538.1). Одна мутация была необходима для удаления внутреннего сайта XhoI. Вторая мутация привела к удалению единичного нарушения комплементарности к днРНК. Эту ВГВ конструкцию-мишень удлиняли добавлением рестрикционных сайтов как на 5', так и на 3'-конце. Искусственную последовательность ДНК химически синтезировали в Geneart (Регенсбург, Германия) и клонировали в сайт XhoI/NotI двойного люциферазного вектора psiCHECK™-2.

Трансфекция и количественное определение люциферазы. Клетки Cos-7 (DSMZ, Брауншвейг, Германия, каталожный №. АСС-60) высевали с плотностью $2,25 \times 10^4$ клеток/лунка на 96-луночные планшеты. Трансфекцию плазмидой осуществляли в концентрации 50 нг/лунка с 0,5 мкл/лунка Липофектамина 2000 (Invitrogen GmbH, Карлсруэ, Германия, каталожный № 11668-019), как описано производителем. Через 4 ч после трансфекции вектора среду отбирали и добавляли свежую среду. После этого к клеткам добавляли днРНК в концентрации 10 нМ или 1 нМ, используя Липофектамин 2000, как описано выше. С целью оптимизации перекрытия генотипа ВГВ и минимизации развития резистентности к днРНК можно использовать две различные днРНК в комбинации одновременно. Для демонстрации обоснованности такого подхода пары двух различных днРНК выбирали из наиболее эффективных днРНК с дополнительной склонностью к оптимизированному перекрытию генотипа.

днРНК добавляли к клеткам в концентрации 5 или 0,5 нМ для каждой днРНК, получая в результате суммарную концентрацию днРНК 10 или 1 нМ, используя Липофектамин 2000, как описано выше. Клетки лизировали через 48 ч, используя реактивы люциферазы, как описано производителем. Уровень белка люциферазы *genilla* нормировали по отношению к уровню люциферазы светлячков для оценки эффективности трансфекции. Для каждой днРНК собирали данные с четырех отдельных точек. По меньшей мере одну днРНК, неродственную ко всем сайтам-мишеням, использовали в качестве отрицательного контроля для определения относительного уровня белка люциферазы *genilla* в клетках, обработанных днРНК (табл. 8). Для сравнения подавляющей активности в условиях полной комплементарности синтезировали днРНК с полной комплементарностью открытой рамке считывания *genilla* и изучали в параллели с ВГВ днРНК.

Данные относительно ингибирования представлены в прилагаемой табл. 2.

Стабильность днРНК. Стабильность днРНК, нацеленной на вирус гепатита В человека, определяли в анализе *in vitro* с любой одной из сыворотки человека, яванского макака или мыши с помощью измерения периода полужизни каждой отдельной цепи.

Измерения проводили в трех повторах для каждой временной точки, используя 3 мкл образца 50 мкМ днРНК, смешанного с 30 мкл сыворотки человека (Sigma), сыворотки яванского макака (Sigma) или сыворотки мыши (Sigma). Смеси инкубировали в течение 0, 30 мин., 1, 3, 6, 24 или 48 ч при 37°C. В качестве контроля неспецифической дегградации днРНК инкубировали с 30 мкл 1х ФБР pH 6,8 в течение 48 ч. Реакции останавливали добавлением 4 мкл протеиназы К (20 мг/мл), 25 мкл "Раствора для лизиса тканей и клеток" (Epicentre) и 38 мкл воды Миллипор в течение 30 мин при 65°C. Образцы затем фильтровали через 0,2 мкм 96-луночный фильтровальный планшет при 1400 об./мин в течение 8 мин, дважды промывали с помощью 55 мкл воды миллипор и снова фильтровали.

Для разделения отдельных цепей и анализа оставшегося полноразмерного продукта (ПРП) образцы разделяли методом ионообменной ВЭЖХ на хроматографе Dionex Summit в денатурирующих условиях, используя в качестве элюента А 20 мМ Na₃PO₄ в 10% ацетонитриле pH=11 и в качестве элюента В 1М NaBr в элюенте А.

Применяли следующий градиент:

Время (мин.)	%А	%В
1,0	75	25
1,00	75	25
19,0	38	62
19,5	0	100
21,5	0	100
22,0	75	25
24,0	75	25

Для каждой инъекции хроматограммы интегрировали автоматически с помощью программного обеспечения ВЭЖХ Dionex Chromeleon 6.60 и при необходимости оценивали вручную. Все площади пиков корректировали относительно пика внутреннего стандарта (ВС) и нормировали по отношению ко времени инкубации $t = 0$ мин. Площадь пика и полученное значение ПРП рассчитывали для каждой отдельной цепи и трех повторов отдельно. Период полужизни ($t^{1/2}$) цепи определяли по средней временной точке (h) для трех повторов, в которой деградировала половина ПРП. Результаты представлены в прилагаемой табл. 3.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты, способная ингибировать экспрессию гена вируса гепатита В, причем указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты включает некодирующую цепь, содержащую по порядку нуклеотиды 2-18 SEQ ID NO: 158, 159, 160 или 163, и кодирующую последовательность, в значительной степени комплементарную указанной некодирующей последовательности, где указанная кодирующая последовательность содержит любую из SEQ ID NO: 2, 3 или 6, и при этом указанная последовательность имеет длину менее чем 30 нуклеотидов.
2. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.1, отличающаяся тем, что некодирующая цепь дополнительно включает 3' липкий конец длиной 1-5 нуклеотидов.
3. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.2, отличающаяся тем, что указанный липкий конец некодирующей цепи содержит урацил или нуклеотиды, комплементарные прегеномной РНК и/или мРНК, кодирующей белок, необходимый для репликации или патогенеза вируса гепатита В.
4. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.1, отличающаяся тем, что кодирующая цепь дополнительно включает 3' липкий конец длиной 1-5 нуклеотидов.
5. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.4, отличающаяся тем, что указанный липкий конец кодирующей цепи содержит урацил или нуклеотиды, идентичные прегеномной РНК и/или мРНК, кодирующей белок, необходимый для репликации или патогенеза вируса гепатита В.
6. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.1, отличающаяся тем, что указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.
7. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.6, отличающаяся тем, что указанный модифицированный нуклеотид содержит 2'-модифицированный нуклеотид.
8. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.7, отличающаяся тем, что указанный 2'-модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, 2'-аминомодифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида.
9. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.6, отличающаяся тем, что указанный модифицированный нуклеотид содержит 5'-фосфотиоатную группу, терминальный нуклеотид, связанный с производным холестерина, терминальный нуклеотид, связанный с бисдециламидной группой додекановой кислоты, замкнутый нуклеотид, нуклеотид, лишенный азотистого основания, дезокситимидин, инвертированный дезокситимидин, нуклеотид морфолино, фосфорамидат и нуклеотид, включающий основание, не встречающееся в природе.
10. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.8, отличающаяся тем, что указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты содержит 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, включающий 5'-фосфотиоатную группу, и дезокситимидин.
11. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно любому из пп.1-10, отличающаяся тем, что указанная кодирующая цепь или указанная некодирующая цепь включает липкий конец из 1-2 дезокситимидинов.
12. Фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одну молекулу двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно любому из пп.1-11.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку, ткань или отличный от человека организм, включающие по меньшей мере одну молекулу двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно любому из пп.1-11.
14. Фармацевтическая композиция согласно п.12 или 13, дополнительно содержащая вторую молекулу двунитевой рибонуклеиновой кислоты, способную ингибировать экспрессию вируса гепатита В.
15. Фармацевтическая композиция согласно любому из пп.12-14, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель, стабилизатор и/или растворитель.
16. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.1, отличающаяся тем, что некодирующая цепь с SEQ ID NO: 158 модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 486.
17. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.1, отличающаяся тем, что некодирующая цепь с SEQ ID NO: 159 модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 487.
18. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.1, отличающаяся тем, что некодирующая цепь с SEQ ID NO: 160 модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 488.
19. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.1, отличающаяся тем, что некодирующая цепь с SEQ ID NO: 163 модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 491.
20. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.2, отличающаяся тем, что кодирующая цепь с SEQ ID NO: 2 модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 322.
21. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.2, отличающаяся тем, что кодирующая цепь с SEQ ID NO: 3 модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 323.
22. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.2, отличающаяся тем, что коди-

рующая цепь с SEQ ID NO: 3 модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 324.

23. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты согласно п.2, отличающаяся тем, что кодирующая цепь с SEQ ID NO: 6 модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 327.

Таблица 1. Коровая последовательность дсРНК, нацеленной на ген вируса гепатита В.

SEQ ID NO	Последовательность кодирующей цепи (5-3)	SEQ ID NO	Последовательность не кодирующей цепи (5-3)
1	CAAGGU AUGUUGCCCGUUU	157	AAACGGGCAACAUACCUUG
2	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	158	TACCAUUUU AUGCCUACAG
3	UCUGCGCGUUUUUCAUA	159	UAUGAUAAAACGCCGAGA
3	UCUGCGCGUUUUUCAUA	160	TAUGAUAAAACGCCGAGA
4	ACCUUGCCUAAUCAUCUC	161	GAGAU GAUUAGGCAGAGGU
5	UUUACUAGUGCCAUUUGUA	162	TACAAUUGGCACUAGUAAA
6	ACCUUGCCUAAUCAUCUA	163	TAGAU GAUUAGGCAGAGGU
7	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	164	GACCAUUUU AUGCCUACAG
8	UGUCUGCGCGUUUUUCA	165	UGAUAAAACGCCGAGACA
8	UGUCUGCGCGUUUUUCA	166	TGAUAAAACGCCGAGACA
9	UACUAGUGCCAUUUGUUA	167	UGAACAAUUGGCACUAGUA
9	UACUAGUGCCAUUUGUUA	168	TGAACAAUUGGCACUAGUA
10	CAACUUUUUACCCUCUGCA	169	TGCAGAGGUGAAAAAGUUG
11	CCAUUUGUUCAGUGGUUCG	170	CGAACCAUCGAAACAAUUG
12	CCAAGUUUUGCUGACGCA	171	UGCGUCAGCAAACAUUGG
12	CCAAGUUUUGCUGACGCA	172	TGCGUCAGCAAACAUUGG
13	CCAUUUGUUCAGUGGUUA	173	TGAACCAUCGAAACAAUUG
14	UUUACUAGUGCCAUUUGUU	174	AACAAUUGGCACUAGUAAA
15	CACCUUGCCUAAUCAUCA	175	TGAUGAUUAGGCAGAGGUG
16	CUGGCU CAGUUUACUAGUG	176	CACUAGUAAACUGAGCCAG
17	CAAGGU AUGUUGCCCGUUA	177	TAACGGGCAACAUACCUUG
18	CUGGCU CAGUUUACUAGUA	178	TACUAGUAAAACUGAGCCAG
19	GAGGCUUGUAGGCAUAAAUU	179	AAUUU AUGCCUACAGCCUC
20	CAGUUUACUAGUGCCAUUU	180	AAUUGGCACUAGUAAACUG
21	AGGU AU GUUGCCCGUUUGU	181	ACAACGGGCAACAUACCU
22	UAUGUUGCCGUUUGUCCA	182	UGGCAAAACGGGCAACAU
23	GAGGCUUGUAGGCAUAAAUU	183	TAUUU AUGCCUACAGCCUC
24	GUCUGCGCGUUUUUCAU	184	AUGAUAAAACGCCGAGAC
25	CAACUUUUUACCCUCUGCC	185	GGCAGAGGUGAAAAAGUUG
26	CCGUGUGCACUUCGCUUCA	186	UGAAGCGAAGUGCACACGG
26	CCGUGUGCACUUCGCUUCA	187	TGAAGCGAAGUGCACACGG
27	UCAAGGU AUGUUGCCCGUA	188	TACGGGCAACAUACCUUGA
28	CAGUUUACUAGUGCCAUUA	189	TAAUGGCACUAGUAAACUG
29	UGGUGGACUUCUCUCAAUU	190	AAUUGAGAGAAGUCCACCA
30	AGGU AU GUUGCCCGUUUGA	191	TCAACGGGCAACAUACCU
31	CUGCUCGUGUUAACAGCGCG	192	CCGCCUGUAACACGAGCAG
32	UAUGUUGCCGUUUGUCCU	193	AGGCAAAACGGGCAACAU
33	UCAAGGU AUGUUGCCCGUU	194	AACGGGCAACAUACCUUGA
34	UCUUUUAACAACUUCGGGA	195	UCCGGAAGUGUUGAUAGA
34	UCUUUUAACAACUUCGGGA	196	TCCGGAAGUGUUGAUAGA
35	CACCUUGCCUAAUCAUCU	197	AGAU GAUUAGGCAGAGGUG
36	AUAAGAGGACUUCUGGACU	198	AGUCCAAGAGUCCUCUUAU
37	GUUCUGCGCGUUUUUCA	199	TUGAUAAAACGCCGAGAC
38	GGCGCUGAAUCCCGCGGAC	200	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC

39	CGCGUCGAGAAGAUUUA	201	UGAGAUUUUCUGCGACGG
40	AAUGUCAACGACGGACCUU	202	AAGGUCGGUCGUUGACAUU
41	GCUCAGUUUACUAGUGCCA	203	UGGCACUAGUAAACUGAGC
42	UGGUGGACUUCUCUCAUA	204	TAUUGAGAGAAUGCCACCA
43	AUCGCCGCGUCGACAGAAGA	205	UCUUCUGCGACGCGGCGAU
44	GCCAUUUGUUCAGUGGUUC	206	GAACCACUGAACAAUUGGC
45	CGAUCCAUAUCUGGGAAACU	207	AGUUCGCGAGUAGGUAUCG
46	UCACCUUCGCUAAUCALIC	208	GAUGAUUAGGCGAGGGUGA
47	GUGGACUUCUCUCAAUUUU	209	AAAAUUGAGAGAAAGUCCAC
48	GGGUCACCAUAUUCUUGGG	210	CCCAAGAAUUGGUGACCC
49	GCCGCGUCGACAGAAGAUUC	211	AGAUUCUUCUGCGACGCGGC
50	UCAAUCCGCGGUCGACAGA	212	UCUGCGACGCGGCGAUUGA
51	UGGAUUGUGUCUGCGGCGUU	213	AACGCCGACAGACAUCCA
52	UACUGUUCAGCCUCCAAG	214	CUUGGAGGCUUGAACAGUA
53	GUUUACUAGUGCCAUUUGU	215	ACAAUUGGCACUAGUAAAC
54	ACUAGUGCCAUAUUGUUCAG	216	CUGAACAAUUGGCACUAGU
55	CCGCGUCGACAGAAGAUUC	217	GAGAUUCUUCGCGACGCGG
56	UAUCUUAUCAACACUUCGG	218	CGGAAGUGUUGAUAAAGUA
57	GGCCAAAUAUCGACGUCGC	219	GGGACUGCGAAUUUUGGCC
58	UUCACCUUCGCUAAUUCAU	220	AUGAUUAGGCGAGGGUGAA
59	CUCAGUUUAUCUAGUGCCA	221	AUGGCACUAGUAAACUGAG
60	UGUUGCCGUUUGUCCUCU	222	AGAGGACAAACGGCAACA
61	UAGUGCCAUUUGUUCAGUG	223	CACUGAACAAUUGGCACUA
62	AGGCUGUAGGCAUAAAUUG	224	CAAUUUUAUGCCUACAGCCU
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUA	225	UAAAACGCCGACAGACAU
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUA	226	TAAAACGCCGACAGACAU
64	ACUUCGCUUCACCUUCGCA	227	UGCAGAGGUGAAGCGAAGU
65	CGUGGACACUUCGCUUCAC	228	GUGAAGCGAAGUGCACACG
66	GUGGUGGACUUCUCUCAAU	229	AUUGAGAGAAGUCCACCAC
67	UGUGUCUGCGGCGUUUAU	230	AUAAAACGCCGACAGACACA
68	AAGGUUAUGUGCCGUUUG	231	CAAACGGGCAACAUACCUU
69	UCAACGACCGACCUUGAGG	232	CCUCAAGGUCGUCGUUGA
70	CAUAAGAGGACUCUUGGAC	233	GUCCAAGAGUCCUUCUUAUG
71	GUCAACGACCGACCUUGAG	234	CUCAAGGUCGUCGUUGAC
72	AUAUUUCUGGGAACAAGAG	235	CUCUUSUCCCAAGAAUUA
73	UGCUCGUGUUAACAGCGGG	236	CCCGCCUGUAACACGAGCA
74	CAUUCGCGCGUCGACAGAA	237	UUCUGCGACGCGGCGAUUG
75	ACUUGUCAAACCUCCAAGC	238	GCUUGGAGGCUUGAACAGU
76	CGCCGCGUCGACAGAAGAU	239	GAUCUCUGCGACGCGCGG
77	CAUUUGUUCAGUGGUUCGU	240	ACGAACCACUGAACAAUUG
78	CGCUGAAUCCCGGGACGA	241	UCGUCGCGGGAUUCAGCG
79	UGGGUCACCAUAUUCUUGG	242	CCAAGAAUUGGUGACCCA
80	UCUCUCGCGAUCCAUAUC	243	AGUAUGGAUCGGCAGGGA
81	AUGUCAACGACCGACCUUG	244	CAAGGUGGUCGUUGACAU
82	CCUCUGCCUAUAUCAUCUA	245	UGAGAUGAUJAGGCGAGGG
83	ACCGUGUGCACUUCGCUUC	246	GAAGCGAAGUGCACCGGU
84	UGCCGAUCCAUCUGCGGA	247	UCCGAGAUUGGAUCGGCA

85	CAGAGUCUAGACUCGUGGU	248	ACCACGAGUCUAGACUCUG
86	CUGUUCAGCCUCCAAGCU	249	AGCUUGGAGGCUUGAACAG
87	GGAGGCGUAGGCAUAAU	250	AUUUAGCCUACAGCCUCC
88	AGGAGGCGUAGGCAUAAA	251	UUUUAUCCUACAGCCUCCU
89	GGUGGACUUCUCUAAUUU	252	AAAUUGAGAGAAUCCACC
90	GCAACUUUUUACCCUCUGC	253	GCAGAGGUGAAAAGUUUC
91	CUGCUCGUGUACAGGCGA	254	TCGCCUGUAACACGAGCAG
92	CUAGUGCCAUUUUGUUCAGU	255	ACUGAACAAUUGGCACUAG
93	CUGCCGAUCCAUCUGCGG	256	CCGCAGUAUGGAUCGGCAG
94	GUGUGCACUUCGCUUACCC	257	GGUGAAGCGAAGUGCACAC
95	GCUCGUGUACAGGGGGGC	258	GCCCGCCUGUAACACGAGC
96	CCUACUCUUAUACAACUUC	259	GAAGUGUUGAUAGAGUAGG
97	UCUCAUUCGCGCGUCGCA	260	UGCGACGCGGCGAUUUGAGA
98	GCCCGUCUGGCUUCUCA	261	UGAGAAGGCACAGCGGGC
99	CUAUCUUUAUACAACUUC	262	GGAAGUGUUGAUUAGAUAG
100	AUGUUGCCGCUUUGUCUUC	263	GAGGACAAACGGGCAACAU
101	GUUUGUUGCCCGUUUGUCC	264	GGACAAACGGGCAACAUAC
102	CUUCGCUUACCCUCUGCAC	265	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG
103	UGUGCACUUCGCUUACCCU	266	AGGUGAAGCGAAGUGCACA
104	GCCAAAUAUCGAGUCCCG	267	CGGGACUUGCAUUUUUGGC
105	CCUGCUCGUGUACAGGCG	268	CGCCUGUAACACGAGCAGG
106	UGGAGUGUGGAUUCGCACU	269	AGUGCGAAUCCACACUCCA
107	AACGACCGACCUUGAGGCA	270	UGCCUCAAGGUCGUCGUU
108	ACAGAGUCUAGACUCGUGG	271	CCACGAGUCUAGACUCUGU
109	AAUCGCGCGUGGCAGAAG	272	CUUCUGCGACGCGCGAUU
110	GGUAGUUGCCCGUUUGUC	273	GACAAACGGGCAACAUACC
111	GCCGAUCUACUUCGCGAA	274	UUCCGCAGUUGGAUCGGC
112	GCCUUAUCUUAUCAACACU	275	AGUGUUGAUAGAUAGGGC
113	AGUUUACUAGUGCCAUUUG	276	CAAUUGGCACUAGUAAACU
114	UGUCAACGACCGACCUUGA	277	UCAAGGUCGGUCGUUGACA
115	ACUUCUCUCAAUUUUCUAG	278	CUAGAAAUUGAGAGAAGU
116	GCGCGGACGUCUUCUUGUC	279	GACAAAGGACGUCGCCGCG
117	UCUAGACUCGUGUGGACU	280	AGUCCACCACGAGUCUAGA
118	GAUCCAUAUCUGCGGAACUC	281	GAGUUCGCGAGUUGGAUUC
119	CUCUGCCGAUCCAUAUCGC	282	GCAGUAUGGAUCGGCAGAG
120	UCUGCGGAUCUACUUGCG	283	CGCAGUAUGGAUCGGCAGAG
121	CCUCUGCCGAUCCAUAUCGC	284	CAGUAUGGAUCGGCAGAGG
122	GCACCUUCUUAUACGCGGU	285	ACCGCGUAAAGAGAGGUGC
123	AAGAACUCCUCCGCUUCGC	286	GCGAGGCGAGGGAGUUCU
124	GAACUCCUCCGCUUCGAG	287	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC
125	UCUCUCAAUUUUCUAGGGC	288	GCCUAGAAAUUGAGAGA
126	GGGCGCACCUUCUUAUACG	289	CGUAAAGAGAGGUGCGCCC
127	CCGAUCCAUAUCGCGAAC	290	GUUCCGAGUUGGAUUCGG
128	AACUCCUCCGCUUCGAGA	291	UCUCCGAGGCGAGGGAGU
129	CUCCUCUGCCGAUCCAUAUC	292	GUUUGGAUCGGCAGAGGAG
130	GGAGUGUGGAUUCGCACUC	293	GAGUGCGAAUCCACACUCC
131	CGGGCGCACCUUCUUUAC	294	GUAAAAGAGGUGCGCCCG
132	GUCUCAAUCCGCGGUCGC	295	GCGACGCGCGAUUGAGAC
133	AUCCAUAUCUGCGAACUCC	296	GGAGUUCGCGAGUUGGAU
134	CGCACCUUCUUAUACGCGG	297	CCCGUAAAGAGAGGUGCG
135	CAACGACCGACCUUGAGGC	298	GCCUCAAGGUCGGUUGUUG
136	CCAUACUGCGGAACUCCUA	299	UAGGAGUUCGCGAGUUGG
137	UGAAUCCCGCGGACGACCC	300	GGUCGUCGCGCGGGAUUA
138	AGAAUCUCCUCCGCUUCGCA	301	UGCGAGGCGAGGGAGUUCU
139	GGCGCACCUUCUUAACGC	302	GCGUAAAAGAGAGGUGCGCC
140	GCGCACCUUCUUAACGCG	303	CGCGUAAAAGAGAGGUGCGC
141	GCUGAAUCCGCGGACGAC	304	GUCGUCGCGGGAUUCAGC
142	CACUUCGCUUCACCCUUCGC	305	GCAGAGGUGAAGCGAAGUG
143	CUCAAUCCGCGGUCGCA	306	CUGCGACGCGGCGAUUGAG
144	UCCGUCGCGCGUGAAUCC	307	GGAUUCAGCGCCGACGGGA
145	CUGAAUCCGCGGACGACC	308	GGUCGUCGCGGGAUUCAG
146	AGAGUCUAGACUCGUGGUG	309	CACCACGAGUCUAGACUUCU
147	UCCAUAUCGCGGAACUCCU	310	AGGAGUUCGCGAGUUGGA
148	GCGCUGAUUCGCGGACG	311	CGUCCGCGGGAUUCAGCGC
149	AGUGUGGAUUCGCACUCCU	312	AGGAGUCCGAAUCCACAU
150	CCUUGCUCGUGUACAGGC	313	GCCUGUAAACAGGAGGAGG
151	GAAUCCGCGGACGACCCG	314	CGGGUCGUCGCGGGAUUC
152	AAGCUGGCGCUUGGGUGGC	315	GCCACCAAGGCACAGCUU
153	GCCUGCUCGUGUUAACAGG	316	CCUGUAAACAGGACAGGCG
154	GUCCGUCGCGCUGAAUC	317	GAUUCAGCGCGACGGGAC
155	AUCUUAUCAACAUUCGCG	318	CCGGAAGUGUUGAUAGAU
156	CUUAUCAACAUUCGCGAA	319	UUCGGAAGUGUUGAUAGAU
156	CUUAUCAACAUUCGCGAA	320	TUCCGGAAGUGUUGAUAG

Фиг. 1

Таблица 2. Изучение активности в репортерной системе psiCHECK2 в клетках COS7

SEQ ID NO	Последовательность кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID NO	Последовательность некодирующей цепи (5'-3')	Изучение активности в репортерной системе psiCHECK2 в клетках COS7			
				10 нМ миРНК		1 нМ миРНК	
				Остаточная миРНК (среднее) (%)	Стандартное отклонение (%)	Остаточная миРНК (среднее) (%)	Стандартное отклонение (%)
321	caAGGuAuGuuGcccGuuudTsdT	485	AAACGGGcAacAuACCUUGdTsdT	13	1	13	1
322	CfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuUfgGfuAf(invdt)	486	pdTfAfcCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgdTsdT	8	2	14	2
323	ucuGcGcGuuuuAucAuAdTsdT	487	uUGAuAAACCGCCGcAGAdTsdT	15	7	29	11
324	UfcUfgCfGfcGfuUfuUfaUfcAfuAf(invdt)	488	pdTfUfGfaUfaAfaAfcGfcCfGcAfcAdTsdT	6	2	15	4
325	accucuGccuAAucAucudTsdT	489	GAGAUuAGGcAGAGGUdTsdT	17	1	16	2
326	UfuUfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuAf(invdt)	490	pdTfAfcAfaAfuGfcCfaCfuAfgUfaAfadTsdT	8	0	17	1
327	AfcCfuCfuGfcCfuAfaUfcAfuCfuAf(invdt)	491	pdTfAfgAfuGfaUfuAfgGfcAfgAfgGfudTsdT	6	2	19	3
328	cuGuAGGcAuAAuuGGuudTsdT	492	GACcAAUuUuAGCCuAcAGdTsdT	23	2	28	6
329	ugucuGcGcGuuuuAucAdTsdT	493	UGAuAAACCGCCGcAGcAdTsdT	33	3	34	10
330	UfgUfcUfgCfGfcGfuUfuUfaUfcAf(invdt)	494	pdTGfaUfaAfaAfcGfcCfGcAfcAdTsdT	6	0	20	3
331	uacuAGuGccAuuuGuucAdTsdT	495	UGAacAAUUGGcACuAGuAdTsdT	18	3	20	2
332	UfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuUfcAf(invdt)	496	pdTGfaAfcAfaAfuGfcCfaCfuAfgUfadTsdT	6	2	21	4
333	CfaAfcUfuUfuUfcAfcCfuCfuGfcAf(invdt)	497	pdTGfcAfgAfgGfuGfaAfaAfaGfuUfgdTsdT	6	2	21	3
334	ccAuuuGuucAGuGGuucGdTsdT	498	CGAACcACUGAACAAUUGGdTsdT	12	1	21	1
335	ccAAGuGuuuGcuGAcGcAdTsdT	499	UGGcuAcGcAAAcACUUGGdTsdT	18	2	23	4
336	CfcAfaGfuGfuUfuGfcUfgAfcGfcAf(invdt)	500	pdTGfcGfuCfaGfcAfcAfcAfcUfuGfgdTsdT	8	1	23	5
337	CfcAfuUfuGfuUfcAfgUfgGfuUfcAf(invdt)	501	pdTGfaAfcCfaCfuGfaAfcAfaAfuGfgdTsdT	7	2	24	3
338	uuuAcuAGuGccAuuuGuudTsdT	502	AacAAUUGGcACuAGuAAAdTsdT	21	2	24	4
339	CfaCfcUfcUfgCfcUfaAfuCfaUfcAf(invdt)	503	pdTGfaUfaAfuUfaGfcCfaGfaGfuUfgdTsdT	9	0	25	2
340	cuGcucuAGuuuAucAGuGdTsdT	504	cACuAGuAAACUGAGCAGdTsdT	34	3	29	7
341	CfaAfgGfuUfuGfuUfgCfcCfGfuUfcAf(invdt)	505	pdTfAfcGfcGfcCfaAfcAfuAfcCfuUfgdTsdT	8	0	31	3
342	CfuGfcCfuCfaGfuUfaAfcUfaGfuAf(invdt)	506	pdTfAfcUfaGfaAfcUfaGfuUfcAf(invdt)	11	3	32	5
343	gaGcucuAGGcAuAAuuudTsdT	507	AAUuUuAGCCuAcAGCCUCdTsdT	16	1	32	8
344	caGuuuAcuAGuGccAuuuudTsdT	508	AAUUGGcACuAGuAAACUGdTsdT	37	1	33	8
345	agGuAuGuuGcccGuuudTsdT	509	AcAAACGGGcAacAuACCUdTsdT	33	3	34	4
346	UfaUfgUfuGfcCfcGfuUfuGfuCfcAf(invdt)	510	pdTGfaAfcAfaAfcGfcGfcAfaCfaUfadTsdT	9	3	35	5
347	GfaGfcCfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuAf(invdt)	511	pdTfAfuUfaAfuGfcCfuAfcAfgCfcUfdTsdT	9	1	36	4
348	guucuGcGcGuuuuAucAdTsdT	512	AUGAuAAACCGCCGcAGcAdTsdT	26	3	36	14
349	caAcuuuuuAcuccuGccdTsdT	513	GGcAGAGGUGAAuAGUUGdTsdT	24	2	37	9
350	ccGuUgGcAcuucGcuucAdTsdT	514	UGAAGCGAAGUGcACACGGdTsdT	13	1	16	5
351	CfcGfuGfuGfcAfcUfuCfGcUfcAf(invdt)	515	pdTGfaAfgCfGfaGfuGfcAfcAfcGfgdTsdT	13	2	38	4
352	UfaAfaGfgUfaUfgUfuGfcCfcGfuUfcAf(invdt)	516	pdTfAfcGfgGfcAfaCfaUfaCfuUfuGfadTsdT	12	1	38	4
353	CfaGfuUfuAfcUfaGfuGfcCfaUfcAf(invdt)	517	pdTfAfuUfgGfcAfcUfaGfuAfaAfcUfgdTsdT	12	2	38	5
354	ugGuGGAcuuucucAAuuudTsdT	518	AAUUGAGGAAGUcAcAdTsdT	24	6	39	16
355	AfgGfuAfuGfuUfgCfcCfGfuUfcAf(invdt)	519	pdTfAfaAfcCfGfcGfaAfcAfuAfcCfuUdTsdT	18	1	40	4
356	cuGcucuGuuAucAGGcGcGdTsdT	520	CCGCCUGuAacACGAGcAGdTsdT	26	2	40	11
357	uaUGuuGccocGuuUGuccudTsdT	521	AGGAcAAACGGGcAAcAuAdTsdT	42	1	40	3
358	ucAAGGuAuGuuGcccGuuudTsdT	522	AACGGGcAacAuACCUUGAdTsdT	31	4	42	12
359	ucuuAucAAcAucuccGGAdTsdT	523	UCCGGAAGUGUUGAuAAGAdTsdT	35	2	43	38
360	UfcUfuAfuCfaAfcAfcUfuCfcGfgAf(invdt)	524	pdTfCfcGfgAfaGfuGfuUfgAfuAfaGfadTsdT	32	2	46	3
361	caccucuGccuAAucAucudTsdT	525	AGAUuAGGcAGAGGUdTsdT	31	3	47	8
362	auAAGAGGAcucuuGGAcudTsdT	526	AGUCcAAGAGUCCUuAuAdTsdT	28	1	49	6
363	GfuCfuGfcGfcCfGfuUfuUfaUfcAf(invdt)	527	pdTfAfuAfaAfaAfaCfcGfcGfcAfgAdTsdT	15	0	51	4
364	ggcGcuGAAuocccGcGcAdTsdT	528	GUCcCGGGAUuAcAGCCdTsdT	24	3	51	10
365	cgcGucGcAGAAGAuucAdTsdT	529	UGAGAUUCUUGCGAGCGdTsdT	46	3	53	6
366	aaugucAAcGAcGAccuudTsdT	530	AAGGUCGGUUGAGcAUuAdTsdT	40	1	54	8
367	gcuAguuuAucAGuGccAdTsdT	531	UGGcACuAGuAAACUGAGcAdTsdT	37	5	51	4
368	UfgGfuGfgAfcUfuCfuCfaAfuAf(invdt)	532	pdTfAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfadTsdT	20	4	58	6
369	aucGccGcGcGcAGAA/GAdTsdT	533	UCUUCUGcGACCGCGGcAUdTsdT	57	6	58	1
370	gccAuuuGuucAGuGGuucdTsdT	534	GAACcACUGAACAAUUGGcAdTsdT	36	3	60	6
371	cgAuucAuAucGcGAAAcudTsdT	535	AGUUCcGcAGuAUGGAUCGdTsdT	43	8	61	9
372	ucAccucuGccuAAucAucdTsdT	536	GAUGAUuAGGcAGAGGUGAdTsdT	48	4	61	10
373	guGGAcuuucucAAuuuudTsdT	537	AAAAUUGAGGAAGUcAcAdTsdT	31	4	61	5
374	ggGucAccAuAuuuuuGGdTsdT	538	CCcAAGAAuAUGGUGACCCdTsdT	58	6	62	10

375	gccGcGucGcAGAAGaucudTsdT	539	AGAUUCUUCUGCGACCGCGCdTsdT	59	3	64	7
376	ucAAucGccGcGucGcAGAdTsdT	540	UCUGCGACGCGCGGAUUGAdTsdT	59	1	64	9
377	ugGAuGuGuucGcGcGcGuudTsdT	541	AACGCCGcAGAcAcAUcAdTsdT	44	8	65	12
378	uacuuGuccAAGGcuccAAGdTsdT	542	CUUGGAGGCUUUGAaAcAGuAdTsdT	51	2	65	32
379	guuuAucAGuGccAuuuGudTsdT	543	AcAAAUUGcACuAGuAAAcdTsdT	44	5	66	6
380	acuAGuGccAuuuGuucAGdTsdT	544	CUGAAcAAUUGGcACuAGUdTsdT	56	0	66	5
381	ccGcGucGcAGAAGaucudTsdT	545	GAGAUUCUUCUGCGACCGGdTsdT	59	3	67	11
382	uacuuuAucAAcAuuuccGdTsdT	546	CGGAAGUUGUUGAuAAGAuAdTsdT	37	1	67	51
383	ggccAAAuucGcAGucccdTsdT	547	GCGACUUGGAAUUUGGCCdTsdT	49	6	67	7
384	uucAcucucGcucAAucAudTsdT	548	AUGAUuAGGcAGAGGUuAAAdTsdT	50	4	68	7
385	cucAGuuuAucAGuGccAudTsdT	549	AUGGcACuAGuAAACUUGAGdTsdT	52	2	68	6
386	uguuGccGuuuGuuccudTsdT	550	AGAGGAcAAACGGGcAacAdTsdT	50	2	69	4
387	uaGuGccAuuuGuucAGuGdTsdT	551	cACUGAAcAAUUGGcACuAdTsdT	46	1	70	8
388	agGcuGuAGGcAuuAAuuGdTsdT	552	cAAUuAUUGCCuAcAGCCUdTsdT	69	3	71	13
389	auGuGucGcGcGcGuuuAdTsdT	553	uAAAACGCCGcAGAcAcAdTsdT	17	6	33	12
390	AfuGfuGfuCfuGfcGfcGfuUfuUfuA{invdT}	554	pdTAFaAfaCfcGfcAfgAfcAfcAfudTsdT	24	3	72	4
391	acuucGcuccAccucGcAdTsdT	555	UGcAGAGGUGAAGCGAAGUdTsdT	49	4	73	4
392	cguGuGcAcuucGcuccAcdTsdT	556	GUGAAGCGAAGUUGcAcACGdTsdT	45	3	73	10
393	guGGuGGAcuucucucAAudTsdT	557	AUUGAGAGAAGUcAcAcAdTsdT	47	5	73	5
394	uguGucGcGcGcGuuuuAdTsdT	558	AuAAAACGCCcAGAcAcAdTsdT	62	8	75	14
395	aaGGuAuGuuGccGcGuuGdTsdT	559	cAAACGGGcAAcAuACCUUdTsdT	61	3	76	2
396	ucAAcGAcGAcAcuuGAGGdTsdT	560	CCUcAAGGUcGGUUGUAGdTsdT	57	1	76	16
397	cauAAGAGGAcuucuuGGAdTsdT	561	GUcAAGAGUCCUcUuAUUGdTsdT	62	4	76	4
398	gucAAGcGAcGAcAcuuGAGdTsdT	562	CUcAAGGUcGGUUGGAcAdTsdT	55	2	77	13
399	auAuucuuGGGAAcAAGAdTsdT	563	CUUUGUUCcAAGAAuAUdTsdT	56	5	77	11
400	ugcucGGuuAcAGGcGcGGdTsdT	564	CCCGCCUuAAcACGAGcAdTsdT	61	5	78	4
401	caAucGccGcGcGcAGAdTsdT	565	UUCUGGcAGCGCGGGAUUGdTsdT	65	1	78	4
402	acuGuucAAGcucccAAGcdTsdT	566	GCUUGGAGGCUUGAaAGUdTsdT	86	3	78	5
403	cgcGcGucGcAGAAGaucdTsdT	567	GAUCUUCUGCGACCGCGCdTsdT	71	3	79	2
404	cauuuGuucAGuGGuucGudTsdT	568	ACGAACcAcUAGAAcAAUUGdTsdT	54	5	80	4
405	cgcGAAucccGcGGAcAdTsdT	569	UCGUCCGGGGAUUCAGCGdTsdT	62	2	80	7
406	uGGGucAccAuAuuuuGGdTsdT	570	CcAAGAAuUUGGUGACCAdTsdT	75	2	80	16
407	uccuucGccGcAucAuAcudTsdT	571	AGuAUUGGAUGCGcAGAGGAdTsdT	73	2	81	3
408	auGuAcAcAcGAcGAcuuGdTsdT	572	cAAGGUcGGUUGGAcAUdTsdT	69	8	81	7
409	ccucGccuAAucAucucAdTsdT	573	UGAGAUuAGGcAGAGGdTsdT	81	4	81	4
410	accGuGuGcAcuucGcuucdTsdT	574	GAAGCGAAGUUGcAcACGGUdTsdT	46	5	81	7
411	uGccGaucAuAucGcGGAdTsdT	575	UCCGcAGuAUUGAUUGGcAdTsdT	61	8	81	5
412	caGAGucuaAGAcucGuGudTsdT	576	AcAcAGAGUCuAGACUCUGdTsdT	65	9	81	5
413	cuGuucAAGGcuccAAGcdTsdT	577	AGCUUGGAGGCUUGAaAcAdTsdT	82	3	82	21
414	ggAGGcuGuAGGcAuuAAudTsdT	578	AUuAUUGCCuAcAGCCUcCdTsdT	68	2	82	12
415	agGAGGcuGuAGGcAuAAAdTsdT	579	UUuAUUGCCuAcAGCCUcCdTsdT	55	4	83	5
416	gguuGAcuucucucAAuuudTsdT	580	AAAUUGAGAGAAGUcAcCdTsdT	62	7	84	2
417	gcAAcuuuuucAccucGcdTsdT	581	GcAGAGGUGAAAAGUUGCdTsdT	93	1	85	5
418	CfuGfcUfcGfuGfuUfaCfaGfcGfa{invdT}	582	pdTCfgCfcUfgUfaAfcAfcGfaGfcAfgdTsdT	56	1	86	2
419	cuAGuGccAuuuGuucAGudTsdT	583	ACUGAAcAAUUGGcACuAGdTsdT	66	0	86	6
420	cuGccGAuccAuAucGcGGdTsdT	584	CCGcAGuAUUGAUGGcAGdTsdT	73	8	86	5
421	guGuGcAcuucGcuucAcCdTsdT	585	GGUGAAGCGAAGUGcAcCdTsdT	54	4	87	4
422	gcucGuGuuAcAGGcGGcdTsdT	586	GCCCCCUuGuAaAcCGAGCdTsdT	91	4	87	5
423	ccuAucuuAucAAcAuuudTsdT	587	GAAGUGUUGAuAAGAuAGGdTsdT	37	2	88	45
424	ucucAAucGccGcGcGcAdTsdT	588	UGCGACGCGCGGAUUGAGAdTsdT	79	4	88	6
425	gcccGucGuGcuccuucAdTsdT	589	UGAGAAGGcAcAGACGGGcdTsdT	85	4	88	16
426	cuAucuuAucAAcAuuuccdTsdT	590	GGAAGUGUUGAuAAGAuAGdTsdT	43	3	90	23
427	auGuuGcccGuuuGuuccdTsdT	591	GAGGAcAAACGGGcAAcAUdTsdT	87	5	90	4
428	guAuGuuGcccGuuuGuuccdTsdT	592	GGAcAAACGGGcAAcAUdTsdT	88	4	90	11
429	cuccGcuucAccucGcAcdTsdT	593	GUcAGAGUGAAGCGAAGdTsdT	69	7	91	5
430	uguGcAcuucGcuucAccudTsdT	594	AGUGAAGCGGAAGUUGcAcAdTsdT	76	3	91	14
431	gccAAAuucGcAGuccGdTsdT	595	CGGACUUGCGAAUUGGCDTsdT	81	3	92	3
432	ccuGcucGuGuuAcAGGcGdTsdT	596	CGCCUGuAaAcCGAGcAGGdTsdT	86	3	92	1
433	ugGAGuGuUGGAuucGcAcudTsdT	597	AGUGCGAAUcAcACUcAdTsdT	87	4	92	3
434	aacGAcGAcuuGAGGcAdTsdT	598	UGCCUcAAGGUCGUGUdTsdT	83	9	92	3
435	acAGAGucuaAGAcucGcGGdTsdT	599	CcACGAGUCuAGACUCUGUdTsdT	89	4	92	4
436	aaucGccGcGcGcAGAdTsdT	600	CUUCUGCGACGCGCGGAUdTsdT	85	6	92	2

437	gguAuGuuGcccGuuuGuedTsdT	601	GACAAACGGGcAAcAuACcdTsdT	80	2	93	3
438	gccG AuccAuAcuGcGGAAdTsdT	602	UUCcGcAGuAUcGGAUCGGCdTsdT	79	3	93	3
439	gccuuAuccuuAucAAcAcudTsdT	603	AGUGUUGAuAAGAuAGGGCdTsdT	84	4	94	50
440	aguuuAuCuAGuGccAuuuGdTsdT	604	cAAuUGGcACuAGuAAACUdTsdT	89	7	95	8
441	igucAAcGAcGcAccuuGAdTsdT	605	UcAAGGUCGGUGUUGAcAdTsdT	84	5	95	8
442	acuuucucAAuuuuuAGdTsdT	606	CUAGAAAuUUGAGAGUdTsdT	103	3	95	6
443	gcGcGGGAcGuccuuuGudTsdT	607	GACAAAGGACGUCCCGCGCdTsdT	88	4	97	3
444	ucuAGAacucGuGGuGGAcdTsdT	608	AGUccAcACGAGUCuAGAdTsdT	90	5	97	2
445	gAuccAuAcuGcGGAacudTsdT	609	GAGUUCcGcAGuAUGGAUCdTsdT	73	6	98	4
446	cucuGccGAuccAuAcuGcdTsdT	610	GcAGuAUGGACGCGcAGAdTsdT	100	5	99	7
447	ucubccGAuccAuAcuGcdTsdT	611	CcAGuAUGGAUCGGcAGAdTsdT	88	6	99	4
448	ccucuGccGAuccAuAcuGdTsdT	612	cAGuAUGGAUCGGcAGAGdTsdT	98	11	99	5
449	gcAcccucuuuAcGcGGudTsdT	613	ACCcGcAAAGAGAGGUGCdTsdT	82	7	100	4
450	aaGAACuccucGccucGcdTsdT	614	GCGAGCGAGGGAGUUCUdTsdT	97	6	100	1
451	gaAcuccucGccucGcAGdTsdT	615	CUcGAGGGcAGGGAGUUCdTsdT	100	2	100	2
452	ucucucAAuuuuuAGGdTsdT	616	GCCcuAGAAAuUUGAGAGdTsdT	102	4	100	8
453	ggGcGcAcucucuuuAcGdTsdT	617	CGuAAAGAGAGGUGCGCCdTsdT	80	4	100	3
454	ccGAuccAuAcuGcGGAAdTsdT	618	BuUCCGcAGuAUGGAUCGGdTsdT	83	5	101	3
455	acucuccucGccucGcAGdTsdT	619	UCUGCGAGGGcAGGAGUdTsdT	100	2	101	2
456	cuccucGccGAuccAuAcdTsdT	620	GuAUGGAUCGGcAGAGdTsdT	93	2	101	2
457	ggAGuGuGGGAuccGcAcudTsdT	621	GAGUGCGAAUcAcACUCdTsdT	97	5	101	3
458	cgGcGcAcucucuuuAcdTsdT	622	GuAAAGAGAGGUGCGCCdTsdT	83	6	101	6
459	gucucAAucGccGcGucGcdTsdT	623	GCGACCGCGAUUGAGAdTsdT	92	4	102	9
460	auccAuAcuGcGGAacudTsdT	624	GAGAUUCcGcAGuAUGGAUCdTsdT	88	3	102	7
461	cgcAcucucuuuAcGcGdTsdT	625	CCcGcAAAGAGAGGUGCGdTsdT	78	1	102	10
462	caAcGAcCGAcucuuGAGdTsdT	626	GCCUcAAGGUGCGUGGdTsdT	88	4	102	8
463	ccAuAcuGcGGAucucuuAdTsdT	627	uAGGAGUUCcGcAGuAUGGdTsdT	85	3	102	5
464	ugAAucccGcGGAacccdTsdT	628	GGGUCGUGCGGAGUUCAdTsdT	92	4	103	3
465	agAAucccGcGccucGcAdTsdT	629	UGCGAGGGAGGAGUUCdTsdT	94	5	103	2
466	ggcGcAcucucuuuAcGcdTsdT	630	GCGuAAAGAGAGGUGCGCdTsdT	97	7	103	10
467	gcGcAcucucuuuAcGcdTsdT	631	CGCGuAAAGAGAGGUGCGdTsdT	99	5	104	7
468	gcuGAuuccGcGGAacdTsdT	632	GUCGUCGGGGAUUCAGCdTsdT	84	2	104	3
469	caucucGcucucAcucucGdTsdT	633	GcAGAGGUGAAAGCGAUGdTsdT	90	4	105	12
470	cucAAucGcGcGcGcAGdTsdT	634	CUcGcACCGCGGAUUGAdTsdT	99	3	105	14
471	ucccGucGcGcGcuGAuccdTsdT	635	GGAUUcAGCGCCGACGGAdTsdT	91	3	106	7
472	cuGAuuccGcGGAacdTsdT	636	GUGCGUCCCGGGAUUCAdTsdT	96	2	106	6
473	agAGucuuAGAcucGuGGuGdTsdT	637	cAcAcCGAGUCuAGACUCdTsdT	93	4	107	9
474	uccAuAcuGcGGAacucdTsdT	638	AGGAGUUCcGcAGuAUGGAdTsdT	91	4	107	7
475	gcGcuGAuuccGcGGAcdTsdT	639	CGUCCCGGGAUUCAGCGdTsdT	90	3	108	3
476	aguGuGGAuucGcAcucudTsdT	640	AGGAGUGCGAAUcAcACUCdTsdT	94	4	111	3
477	cccuGcucGuGuuAcAGGdTsdT	641	GCCUGuAAcACGAGcAGGdTsdT	99	11	111	10
478	gaAuuccGcGGAacGAcceGdTsdT	642	CGGcUCGUCCCGGGAUUCdTsdT	96	3	115	5
479	aaGcuGuGccuuGGGUGGcdTsdT	643	GcAcCCcAAAGcAcAGCUCdTsdT	99	5	116	53
480	gcccGucGcGcGcuGAuccdTsdT	644	CCUGuAAcAcGAGcAGGcdTsdT	96	5	116	11
481	gucceGucGGcGcuGAuccdTsdT	645	GAUUCAGCGCGACGGAcdTsdT	93	2	118	4
482	aucuuAuAcAcuuccGdTsdT	646	CCGGAAGUGUUGAuAAGAdTsdT	76	3	126	23
483	cuuAucAAcAcuuccGGAAdTsdT	647	UUCGGAAAGUUGAuAAGdTsdT	39	6	42	3

Фиг. 2

Таблица 3. Стабильность дсРНК, нацеленной на вирус гепатита В, в сыворотке

Пара SEQ ID No.	Сыворотка мыши		Сыворотка человека		Сыворотка яванского макака	
	Кодирующ ая цепь	Некодирующ ая цепь	Кодирующ ая цепь	Некодирующ ая цепь	Кодирующ ая цепь	Некодирующ ая цепь
	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)
321/485	26,4	0,5	>48	2,1	н.о.	н.о.
325/489	27,2	6,7	>48	8,8	н.о.	н.о.
350/514	11,3	2,6	>48	17,0	н.о.	н.о.
326/490	>48	11,7	>48	43,9	>48	5,5
324/488	>48	13,3	>48	44,7	>48	6,4
328/492	19,1	9,9	>48	>48	н.о.	н.о.
322/486	>48	14,5	>48	>48	>48	6,5
327/491	>48	16,0	>48	>48	>48	8,1

Фиг. 3

Таблица 4. Коровые последовательности дсРНК, нацеленной на ген вируса гепатита В, и их модифицированные копии

Коровая последовательность				Модифицированная последовательность			
SEQ ID No.	Последовательность кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID No.	Последовательность не кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID No.	Последовательность кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID No.	Последовательность не кодирующей цепи (5'-3')
1	CAAGGUAUGUUGCCCGUUU	157	AAACGGGCAACAUAACCUUG	321	caAGGuAuGuuGcccGuuu dTsdT	485	AAACGGGcAcAuACCUUGd TsdT
2	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	158	TACCAUUUUUUGCCUACAG	322	CfuGfuAfgGfcAfuAfaUfu UfgGfuAf(inv dT)	486	pdTfCfaAfuUfuAfuGfcCfu AfcAfgdTsdT
3	UCUGCGGCGUUUUUAUCA	159	UAUGAUAAAACGCCGAGAGA	323	ucmGcGcGcGuuuuAucAua dTsdT	487	uAU GAUAAAACGCCGcAGAd TsdT
3	UCUGCGGCGUUUUUAUCA	160	TAUGAUAAAACGCCGAGAGA	324	UfcUfgCfGfcGfuUfuUfa UfcAfuAf(inv dT)	488	pdTfUfGfaUfaAfaAfcGfcCfG CfaGfadTsdT
4	ACCUUGGCUAAUUAUCAUC	161	GAGAUUAUAGGCAGAGGU	325	accucuGccuAAucAucucd TsdT	489	GAGAUUAUAGGCAGAGGU dTsdT
5	UUUACUAGUGCCAUUUUGUA	162	TACAAAUGGCACUAGUAAA	326	UfuUfaCfuAfgUfgCfcAfu UfuGfuAf(inv dT)	490	pdTfCfaAfaUfuGfcCfaCfuAfg UfaAfadTsdT
6	ACCUUGGCUAAUUAUCAUC	163	TAGAUUAUAGGCAGAGGU	327	AfcCfuCfuGfcCfuAfaUfca fuCfuAf(inv dT)	491	pdTfAfUfGfaUfuAfuAfgGfcAfg AfgGfu dTsdT
7	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	164	GACCAUUUUUUGCCUACAG	328	cuGuAGGcAuAAAuuUGGuc dTsdT	492	GACCAUUUUUUGCCUAcAGd TsdT
8	UGUCUGCGGCGUUUUUAUCA	165	UGAUAAAACGCCGAGAGAGA	329	ugucuGcGcGcGuuuuAucA dTsdT	493	UGAUAAAACGCCGcAGAcAd TsdT
8	UGUCUGCGGCGUUUUUAUCA	166	TGAUAAAACGCCGAGAGAGA	330	UfgUfcUfgCfGfcGfuUfu UfaUfcAf(inv dT)	494	pdTfGfaUfaAfaAfcGfcCfG CfaGfa dTsdT
9	UACUAGUGCCAUUUUGUCA	167	UGAACAAUUGGCACUAGUA	331	uacuaGUgcccAuuuGuucA dTsdT	495	UGAACAAUUGGCACUAGUAd TsdT
9	UACUAGUGCCAUUUUGUCA	168	TGAACAAUUGGCACUAGUA	332	UfaCfuAfgUfgCfcAfuUfu GfuUfcAf(inv dT)	496	pdTfGfaAfaAfaUfuGfcCfaCfu AfgUfadTsdT
10	CAACUUUUUUCACCCUCUG	169	TGCAGAGGUGAAAAGUUG	333	CfaAfcUfuUfuUfcAfcCfuC fuGfcAf(inv dT)	497	pdTfGfcAfgAfgGfuGfaAfaAfa GfuUfgdTsdT
11	CCAUUUUGUUCAGUGGUUCG	170	CGAACCAUUGAACAAUUGG	334	ccAuuuGuucAGuGGuucG dTsdT	498	CGAACCAUUGAACAAUUGGd TsdT
12	CCAAGUGUUUGCUGACGCA	171	UGCGUCAGCAAAACAUUGG	335	ccAAGuGuuuGcuGAcGc AdTsdT	499	UGCGUcAGcAAAcACUUGGd TsdT
12	CCAAGUGUUUGCUGACGCA	172	TGCGUCAGCAAAACAUUGG	336	CfcAfaGfuGfuUfuGfcUfg AfcGfcAf(inv dT)	500	pdTfGfcGfuCfaGfcAfaAfcAfc UfuGfgdTsdT
13	CCAUUUUGUUCAGUGGUUCA	173	TGAACCAUUGAACAAUUGG	337	CfcAfuUfuGfuUfcAfgUfg GfuUfcAf(inv dT)	501	pdTfGfaAfcCfaCfuGfaAfaAfa AfuGfgdTsdT
14	UUUACUAGUGCCAUUUUGUU	174	AACAAAUGGCACUAGUAAA	338	uuuAucAGuGccAuuuGuu dTsdT	502	AACAAAUGGCACUAGUAAAd TsdT
15	CACCUUGCCAUUAUCAUCA	175	TGAUGAUUAGGCAGAGGU	339	CfaCfcUfcUfgCfcUfaAfuC faUfcAf(inv dT)	503	pdTfGfaUfgAfuUfaGfgCfaGfa GfgUfgdTsdT
16	CUGGCUCAGUUUAUCAUGUG	176	CACUAGUAAACUGAGCCAG	340	cuGGcucAGuuuAucAGu GdTsdT	504	cACuAGuAAACUGAGCcAGd TsdT
17	CAAGGUAUGUUGCCCGUUU	177	TAACGGGCAACAUAACCUUG	341	CfaAfgGfuAfuGfuUfgCfc CfgUfuAf(inv dT)	505	pdTfAfcCfGfcCfaAfcAfuAfcC fuUfgdTsdT
18	CUGGCUCAGUUUAUCAUGUA	178	TACUAGUAAACUGAGCCAG	342	CfuGfgCfuCfaGfuUfuAfc UfaGfuAf(inv dT)	506	pdTfAfcUfaGfuAfaAfcUfgAfg CfcAfgdTsdT
19	GAGGUCUGAGGCAUAAAUU	179	AAUUUAUGCCUACAGCCUC	343	gaGGcuGuAGGcAuAAAu udTsdT	507	AAUUUAUGCCUAcAGCCUCd TsdT
20	CAGUUUACUAGUGCCAUUUU	180	AAAUGGCACUAGUAAACUG	344	caGuuuAucAGuGccAuuu dTsdT	508	AAAUGGCACUAGUAAACUGd TsdT
21	AGGUUUGUUGCCCGUUUGU	181	ACAAACGGGCAACAACCU	345	agGuAuGuuGcccGuuuGu dTsdT	509	AcAAACGGGCAAcAuACCUd TsdT
22	UAUGUUGCCCGUUUGUCCA	182	UGGACAAACGGGCAACAUA	346	UfaUfgUfuGfcCfcGfuUfu GfuCfcAf(inv dT)	510	pdTfGfAfcAfaAfcGfcGfcAfa CfaUfadTsdT
23	GAGGUCUGAGGCAUAAAU	183	TAUUUAUGCCUACAGCCUC	347	GfaGfgCfuGfuAfgGfcAfu AfaAfuAf(inv dT)	511	pdTfAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfg CfcUfedTsdT
24	GUCUGCGGCGUUUUUAUCA	184	AUGAUAAAACGCCGAGAGAGA	348	gucuGcGcGcGuuuuAucAu dTsdT	512	AUGAUAAAACGCCGcAGAcAd TsdT

25	CAACUUUUUACACCUCUG CC	185	GGCAGAGGUGAAAAAGUU G	349	caAcuuuuuucAccucucGccd TsdT	513	GGCAGAGGUGAAAAAGUUG dTsdT
26	CCGUGUGCACUUCGCUU CA	186	UGAAGCGAAGUGCACACGG	350	ccGuGuGcAcuucGcuucA dTsdT	514	UGAAGCGAAGUGcAcACGG dTsdT
26	CCGUGUGCACUUCGCUU CA	187	TGAAGCGAAGUGCACACGG	351	CfcGfuGfuGfcAfcUfuCfcG fuUfcAf(invdt)	515	pdTfGfAfgCfGfAfaGfuGfcAfc AfcGfgdTsdT
27	UCAAGGUUUGUUGCCC GUA	188	TACGGGCAACAUACCUUGA	352	UfcAfaGfgUfaUfgUfuGfc CfcGfuAf(invdt)	516	pdTAfcGfgGfcAfaCfaUfaCfc UfuGfadTsdT
28	CAGUUUACUAGUGCCAU UA	189	TAAUGGCACUAGUAAACUG	353	CfaGfuUfuAfcUfaGfuGfc CfaUfuAf(invdt)	517	pdTAfaUfgGfcAfcUfaGfuAfa AfcUfgdTsdT
29	UGGUGGACUUCUCUCA AUU	190	AAUUGAGAGAGUCCACCA	354	ugGuGGAcuucucucAAuu dTsdT	518	AAUUGAGAGAGUCCAcAd TsdT
30	AGGUUUGUUGCCGUU UGA	191	TCAAACGGGCAACAUACCU	355	AfgGfuAfuGfuUfgCfcCfcG UfuUfgAf(invdt)	519	pdTfGfAfaCfcGfgCfaAfcAfu AfcCfudTsdT
31	CUGCUCGUUUCACAGGC GG	192	CCGCCUGUAAACACGAGCAG	356	cuGcuGcuGuuuAcAGGcG GdTsdT	520	CCGCCUGuAAcACGAGcAGd TsdT
32	UAUGUUGCCCGUUGU CCU	193	AGGACAACGGGCAACUA	357	uuGuuuGcccGuuuGuccu dTsdT	521	AGGAcAAACGGGcAAcAuAd TsdT
33	UCAAGGUUUGUUGCCC GUU	194	AACGGGCAACAUACCUUGA	358	ucAAGGuAuGuuGcccGu udTsdT	522	AACGGGcAAcAuACCUUGAd TsdT
34	UCUUUAACAACUUCGG GA	195	UCCGGAAGUGUUGAUAAAG A	359	ucuuAucAAcAcuuccGGA dTsdT	523	UCCGGAAGUGUUGAuAAGA dTsdT
34	UCUUUAACAACUUCGG GA	196	TCCGGAAGUGUUGAUAAAG A	360	UfcUfuAfuCfaAfcAfcUfuC fcGfgAf(invdt)	524	pdTCfcGfgAfaGfuGfuUfgAfu AfaGfadTsdT
35	CACCUCUGCCUAUUCU CU	197	AGAUGAUUAGGCAGAGGU G	361	caccucucGcuuAAucAucud TsdT	525	AGAUGAUuAGGcAGAGGUG dTsdT
36	AUAAGAGGACUCUUGG ACU	198	AGUCCAAGAGUCCUCUUAU	362	auAAGAGGAcucuuGGAc udTsdT	526	AGUUCcAAGAGUCCUcUuAU dTsdT
37	GUCUGCGGCGUUUUUAU CAA	199	TUGAUAAAACGCCGAGAC	363	GfuCfuGfcGfgCfgUfuUfu AfuCfaAf(invdt)	527	pdTUfgAfuAfaAfaCfcGfcGfc AfgAfdTsdT
38	GGCGUGAAUCCCGCGG AC	200	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC	364	ggeGcuGAuAcceGcGGAc dTsdT	528	GUCCGCGGGAUucAGCGCC dTsdT
39	CGCGUCGAGAAGAUUCU CA	201	UGAGAUUCUUCGACGCGG	365	cgcGucGcAGAAGaucuA dTsdT	529	UGAGAUUCUUCGCGACGCG dTsdT
40	AAUGUCAACGACCGACC UU	202	AAGGUCGGUCGUUGACAU U	366	aaUGucAAcGAccGAccuu dTsdT	530	AAGGUCGGUCGUUGAcAUU dTsdT
41	GUCAGUUUACUAGUG CCA	203	UGGCACUAGUAAACUGAGC	367	gcucAGuuuAcuAGuGccA dTsdT	531	UGGcAcuAGuAAACUGAGCd TsdT
42	UGGUGGACUUCUCUCA AUA	204	TAUUGAGAGAAAGUCCACCA	368	UfgGfuGfgAfcUfuCfuCfu CfaAfuAf(invdt)	532	pdTAfuUfgAfgAfaGfuCfc AfcCfadTsdT
43	AUCGCCGCGUCGAGAA GA	205	UCUUCGCGACGCGCGGAU	369	aucGccGcGucGcAGAAGA dTsdT	533	UCUUCGCGCAGCGCGGAU dTsdT
44	GCCAUUUGUUCAGUGG UUC	206	GAACCACUGAACAAUUGGC	370	gccAuuuGuucAGuGGuuc dTsdT	534	GAACcACUGAAcAAUUGGCd TsdT
45	CGAUCAUACUGCGGAA CU	207	AGUUCGCGAGUUGGAUCG	371	cGAuccAuAcuGcGGAACu dTsdT	535	AGUUCCGcAGuAUGGAUCG dTsdT
46	UCACCCUCGCCUAUCA UC	208	GAUGAUUAGGCAGAGGUG A	372	ucAccucucGcuAAucAucd TsdT	536	GAUGAUuAGGcAGAGGUGA dTsdT
47	GUGGACUUCUCUCAAU UUU	209	AAAAUUGAGAGAAGUCCAC	373	guGGAcuucucucAAuuuu dTsdT	537	AAAAUUGAGAGAAGUcAc dTsdT
48	GGGUACCAUAUUCUU GGG	210	CCCAAGAAUUGGUGACCC	374	ggGucAccAuAuucuuGGG dTsdT	538	CCcAAGAAuAUGGUGACCCd TsdT
49	GCCGCGUCGAGAAGAU CU	211	AGAUUCUUCGCGACGCGGC	375	gccGcGucGcAGAAGaucu dTsdT	539	AGAUUCUUCGCGACGCGGC dTsdT
50	UCAAUCCGCGCUCGCA GA	212	UCUUCGACGCGCGGAUUGA	376	ucAAucGccGcGucGcAGA dTsdT	540	UCUUCGACGCGCGGAUUGA dTsdT
51	UGGAUGUGUCUGGGC GUU	213	AACGCCGACAGACAUCCA	377	ugGAuGuGucuGcGcGu udTsdT	541	AACGCCGcAGAcAcAUcAdT sdT
52	UACUGUUCAAGCCUCCA AG	214	CUUGGAGGCUUGAACAGUA	378	uacuGuucAAGccuccAAG dTsdT	542	CUUGGAGGCUUGAAcAGuA dTsdT
53	GUUUACUAGUGCCAAU UGU	215	ACAAUUGGCACUAGUAAAC	379	guuuAcuAGuGccAuuuGu dTsdT	543	AcAAUUGGcAcuAGuAAAc dTsdT

54	ACUAGUGCCAUUUGUU CAG	216	CUGAACAAUUGGCACUAGU	380	acuAGuGccAuuuGuucAG dTsdT	544	CUGAAcAAUUGGcACuAGUd TsdT
55	CCGCGUCGAGAAAGAU UC	217	GAGAUUUUCUGCGACGCGG	381	ccGcGucGcGAGAAGAuuc dTsdT	545	GAGAUUUUCUGCGACGCGG dTsdT
56	UAUCUUAUCAACACUUC CG	218	CGGAAGUUGUAUAGAU A	382	uaucuuAucAAcAcuuccGd TsdT	546	CGGAAGUUGUAUAGAU dTsdT
57	GGCAAUUUCGAGUC CC	219	GGGACUGCGAAUUUGGCC	383	ggccAAAuucGcAGucccd TsdT	547	GGGACUGCGAAUUUGGCC dTsdT
58	UUCACCUUCUGCCUAAUC AU	220	AUGAUUJAGGCAGAGGUGA A	384	uucAccuucGccuAAucAud TsdT	548	AUGAUUJAGGCAGAGGUGAA dTsdT
59	UCAGUUUACUAGUGCC AU	221	AUGGCACUAGUAAACUGAG	385	cucAGuuuAcuAGuGccAu dTsdT	549	AUGGCACUAGUAAACUGAG dTsdT
60	UGUUGCCCGUUUGUCC UCU	222	AGAGGACAAACGGGCAACA	386	uguuGcccGuuuGuccuud TsdT	550	AGAGGACAAACGGGcAAcAd TsdT
61	UAGUGCCAUUUGUUA GUG	223	CACUGAACAAUUGGCACUA	387	uaGuGccAuuuGuucAGu GdTsdT	551	CACUGAAcAAUUGGcACuAd TsdT
62	AGGCUUAGGCAUAAA UUG	224	CAAUUUUAGCCUACAGCCU	388	agGcuGuAGGcAuAAAuu GdTsdT	552	CAAUUUUAGCCuAcAGCCUd TsdT
63	AUGUGUCUGCGGGUU UUA	225	UAAAACGCCGACAGACAU	389	auGuGucuGcGGcGuuuu AdTsdT	553	UAAAACGCCGcAGAcAuAd TsdT
63	AUGUGUCUGCGGGUU UUA	226	TAAAACGCCGACAGACAU	390	AfuGfuGfuCfuGfcGfgCfG UfuUfuAf(invdt)	554	pdTAfaAfaCfGcfcAfgAfcA fcAfudTsdT
64	ACUUCGCUUCACCUUCG CA	227	UGCAGAGGUGAAGCGAAGU	391	acuucGcuucAccuucGcAd TsdT	555	UGcAGAGGUGAAGCGAAGU dTsdT
65	CGUUGUCACUUCGCUUC AC	228	GUGAAGCGAAGUCACACG	392	cgUguGcAccuucGcuucAd TsdT	556	GUGAAGCGAAGUGcAcACG dTsdT
66	GUGGUGGACUUCUCUC AAU	229	AUUGAGAGAAGUCCACCAC	393	guGguGGAcuuucucAAu dTsdT	557	AUUGAGAGAAGUcAcAcAd TsdT
67	UGUGUCUGCGGGUUU UAU	230	AUAAAACGCCGACAGACA	394	uguGucGcGgcGuuuuAu dTsdT	558	AuAAAACGCCGcAGAcAcAdT sdT
68	AAGGUUUGUUGCCCGU UUG	231	CAAACGGGCAACAUACCUU	395	aaGGuAuGuuGcccGuuuu GdTsdT	559	cAAACGGGcAAcAuACCUUd TsdT
69	UCAACGACCCACCUUGA GG	232	CCUCAAGGUCGGUCGUUGA	396	ucAAcGAccGAccuuGAGG dTsdT	560	CCUcAAGGUCGGUCGUUGA dTsdT
70	CAUAAGAGGACUUCUG GAC	233	GUCCAAGAGUCCUUAUG	397	caUAAGAGGAcucuUGGA cdTsdT	561	GUCCAAGAGUCCUUAUG dTsdT
71	GUCAACGACCCACCUUG AG	234	CUCAAGGUCGGUCGUUGAC	398	gucAAcGAccGAccuuGAG dTsdT	562	CUcAAGGUCGGUCGUUGAC dTsdT
72	AUAUUCUUGGGAACAA GAG	235	CUCUUGUUCCAAGAAUUAU	399	auAuucuuGGGAAcAAGA GdTsdT	563	CUCUUGUUCcAAGAAuAU dTsdT
73	UGCUUGUUAACAGGC GGG	236	CCGCGGUGUAACACGAGCA	400	ugcucGuGuuAcAGGcGG GdTsdT	564	CCGCGGUGuAAcACGAGcAd TsdT
74	CAAUCGCGCGUCGAG AA	237	UUCUGCGACGCGGCAUUG	401	caAucGccGcGucGcAGAA dTsdT	565	UUCUGCGACGCGGCAUUG dTsdT
75	ACUUGUUAAGCCUCAA GC	238	GCUUGGAGGCUUGAACAG U	402	acuGuucAAGccuccAAGc dTsdT	566	GCUUGGAGGCUUGAAcAGU dTsdT
76	CGCCGCGUCGAGAA UC	239	GAUCUUCUGCGACGCGCG	403	cgccGcGucGcAGAAAGuc dTsdT	567	GAUCUUCUGCGACGCGCG dTsdT
77	CAUUUGUUCAGUGGU CGU	240	ACGAACCACUGAACAAUUG	404	cauuUGuucAGuGGuucGU dTsdT	568	ACGAACCACUGAAcAAUUGd TsdT
78	CGCUGAAUCCCGCGGAC GA	241	UCGUCCGCGGGAUUCAGCG	405	cgouGAAuccGcGGAcGA dTsdT	569	UCGUCCGCGGGAUUCAGCG dTsdT
79	UGGUCACCAUUAUUCU UGG	242	CCAAGAAUUGGUGACCCA	406	ugGGucAccAuAUuucuuGG dTsdT	570	CcAAGAAuUUGGUGAcCCAd TsdT
80	UCCUCUGCCGAUCCAUA CU	243	AGUAUGGAUCGGCAGAGGA	407	uccucGccGAuccAuAcud TsdT	571	AGuAUGGAUCGGcAGAGGA dTsdT
81	AUGUCAACGACCCACCU UG	244	CAAGGUCGGUCGUUGACAU	408	auGucAAcGAccGAccuuG dTsdT	572	cAAGGUCGUCGUUGAcAU dTsdT
82	CCUCUGCCUAAUCAUCU CA	245	UGAGAUGAUJAGGCAGAG G	409	ccucGccuAAucAucucAd TsdT	573	UGAGAUGAUJAGGcAGAGG dTsdT
83	ACCGUGGACAUUCGCU UC	246	GAAGCGAAGUGCACACGGU	410	accGuGuGcAccuucGcuuc dTsdT	574	GAAGCGAAGUGcAcACGGU dTsdT

84	UGCCGAUCCAUAUCUGCGGA	247	UCCGCAGUAUGGAUCGGCA	411	ugccGAuccAuAcuGcGGA dTsdT	575	UCCGCAGUAUGGAUCGGcAdTsdT
85	CAGAGUCUAGACUCUGGU	248	ACCACGAGUCUAGACUCUG	412	caGAGucUAGAcucGuGG udTsdT	576	ACcACGAGUCuAGACUCUGd TsdT
86	CUGUUCAAGCCUCCAAGCU	249	AGCUUGGAGGCUUGAACAG	413	cuGuucAAGccuccAAGcu dTsdT	577	AGCUUGGAGGCUUGAAcAG dTsdT
87	GGAGGUCUGUAGGCAUAAU	250	AUUUAUGCCUACAGCCUCC	414	ggAGGcuGuAGGcAuAAA udTsdT	578	AUUUAUGCCuAcAGCCUCCd TsdT
88	AGGAGGUCUAGAGGCAUAAA	251	UUUAUGCCUACAGCCUCCU	415	agGAGGcuGuAGGcAuAA AdTsdT	579	UUuUAUGCCuAcAGCCUCCUd TsdT
89	GGUGGACUUCUCUCAAUUU	252	AAAUUGAGAGAAAGUCCACC	416	ggUGGAcUucucucAAuuu dTsdT	580	AAAUUGAGAGAAAGUcAcCC dTsdT
90	GCAACUUUUUACCCUCUGC	253	GCAGAGGUGAAAAGUUGC	417	gcAAcUUuuucAccucucGcd TsdT	581	GcAGAGGUGAAAAGUUGc dTsdT
91	CUGCUCGUGUUAACAGCGA	254	TCGCCUGUAACACGAGCAG	418	CfuGfcUfcGfuGfuUfaCfa GfgCfGfAf(invdT)	582	pdTCfGfCfuUfgUfaAfcAfcGfa GfcAfGdTsdT
92	CUAGUGCCAUUUGUUCAGU	255	ACUGAACAAUUGGCACUAG	419	cuAGUGccAuuuGuucAGu dTsdT	583	ACUGAAcAAAUUGGCACuAGd TsdT
93	CUGCCGAUCCAUAUCUGCGG	256	CCGCAGUAUGGAUCGGCAG	420	cuGccGAuccAuAcuGcGG dTsdT	584	CCGCAGUAUGGAUCGGcAGd TsdT
94	GGUGGACUUCGCUUACAAC	257	GGUGAAGCGAAGUGCACAC	421	guGuGcAcuucGcuucAccd TsdT	585	GGUGAAAGCGAAGUGcAcAC dTsdT
95	GCUCGUGUUAACAGGCGGC	258	GCCCGCUGUAACACGAGC	422	gcucGuGuuAcAGGcGGG cdTsdT	586	GCCCGCCUGuAAcACGAGCd TsdT
96	CCUUCUUUAUACAACACUUC	259	GAAGUGUUGAUAGAUAGG	423	ccuAuccuuAucAacAcuucd TsdT	587	GAAGUGUUGAuAAGAuAGG dTsdT
97	UCUCAAUUGCCGCGUGCA	260	UGCGACGCGGCGAUUGAGA	424	ucucAAucGccGcGucGcA dTsdT	588	UGCGACGCGGCGAUUGAGA dTsdT
98	GCCCGCUCUGGCCUUCUCA	261	UGAGAAGGCACAGACGGGC	425	gcccGuucGuGccuucucAd TsdT	589	UGAGAAGGcAcAGACGGGC dTsdT
99	CUAUUCUUAUACAACACUUC	262	GGAAGUGUUGAUAGAUA	426	cuAuccuuAucAAcAcuucd TsdT	590	GGAAGUGUUGAuAAGAuAG dTsdT
	CC		G		TsdT		dTsdT
100	AUGUUGCCCGUUGUCUC	263	GAGGACAAACGGGCAACAU	427	auGUuGcccGUuuGuucuc dTsdT	591	GAGGAcAAACGGGcAcAuUd TsdT
101	GUUUGUUGCCCGUUGUCC	264	GGACAAACGGGCAACAUAC	428	guAuGUuGcccGUuuGuucc dTsdT	592	GGAcAAACGGGcAAcAuAcCd TsdT
102	CUUCGCUUACCCUCUGCAC	265	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG	429	cuucGcuucAccucucAcAd TsdT	593	GUGcAGAGGUGAAGCGAAG dTsdT
103	UGUGCACUUCGCUUCACCU	266	AGGUGAAGCGAAGUGCACA	430	uguGcAcuucGcuucAccud TsdT	594	AGGUGAAGCGAAGUGcAcA dTsdT
104	GCCAAAUUUCGACGUCCCG	267	CGGACUGCGAAUUUUGGC	431	gcccAAAuucGcAGucccG dTsdT	595	CGGGACUUGCGAAUUUUGGC dTsdT
105	CCUGCUCGUGUACAGGCG	268	CGCCUGUAACACGAGCAGG	432	ccuGcuucGuGuuAcAGGcG dTsdT	596	CGCCUGuAAcACGAGcAGGd TsdT
106	UGGAGUGUGGAUUCGCACU	269	AGUGCGAAUCCACACUCCA	433	ugGAGuGuGGAuucGcAc udTsdT	597	AGUGCGAAUcAcACUCCAd TsdT
107	AACGACCGACCUUGAGGCA	270	UGCCUCAAGGUCGGUCGUU	434	aacGAccGAcuuGAGGcAd TsdT	598	UGCCUcAAGGUCGGUCGUU dTsdT
108	ACAGAGUCUAGACUCUGUGG	271	CCACGAGUCUAGACUCUGU	435	acAGAGucUAGAcucGuG GdTsdT	599	CcACGAGUCuAGACUCUGU dTsdT
109	AAUCGCGCGUGCGCAGAGA	272	CUUCUGCGACGCGCGGAUU	436	aaucGccGcGucGcGAAAG dTsdT	600	CUUCUGCGACGCGCGGAUU dTsdT
110	GGUAUGUUGCCCGUUGUC	273	GACAAACGGGCAACAUACC	437	ggUAuGUuGcccGUuuGuc dTsdT	601	GAcAAACGGGcAAcAuACCd TsdT
111	GCCGAUCCAUAUCUGCGGAA	274	UUCGCGAGUAUGGAUCGGC	438	gcccGAuccAuAcuGcGGAA dTsdT	602	UUCCGcAGuAUGGAUCGGC dTsdT
112	GCCCUAUCUUAUCAACAUCU	275	AGUGUUGAUAGAUAGGGC	439	gcccUAcuuAucAacAcud TsdT	603	AGUGUUGAuAAGAuAGGGC dTsdT
113	AGUUUACUAGUGCCAUUUG	276	CAAUUGGCACUAGUAAACU	440	aguuuAcuAGuGccAuuuG dTsdT	604	cAAUUGGcACuAGuAAACUd TsdT
114	UGUCAACGACCGACCUUGA	277	UCAAGGUCGGUCGUUGACA	441	ugucAAcGAccGAccuuGA dTsdT	605	UcAAGGUCGGUCGUUGAcA dTsdT

115	ACUUCUCUCAUUUUUCU AG	278	CUAGAAAAUUGAGAGAAGU	442	acuuucucucAAuuuuucAG dTsdT	606	CuAGAAAAUUGAGAGAAGU dTsdT
116	GCcGcGgAcGUccUUU GUC	279	GACAAAGGACGUCCGCGC	443	gcGcGgGAcGUccuuuGuc dTsdT	607	GAcAAAGGACGUCCcGcGcd TsdT
117	UCUAGACUCGUGGUGG ACU	280	AGUCCACCACGAGUCUAGA	444	ucUAGAcucGUUGGAc udTsdT	608	AGUCCACCACGAGUCuAGAd TsdT
118	GAUCCAUAUCUGCGGAAC UC	281	GAGUUCcCAGUAUGGAUC	445	gAUccAUAcuGcGGAAcuc dTsdT	609	GAGUUCcGcAGuAUGGAUC dTsdT
119	CUcUGCCGAUCCAUACU GC	282	GCAGUAUGGAUCGGCAGAG	446	cucUGccGAuccAUAcuGcd TsdT	610	GcAGUAUGGAUCGGcAGAG dTsdT
120	UCUGCCGAUCCAUACUG CG	283	CGCAGUAUGGAUCGGCAGA	447	ucUGccGAuccAUAcuGcG dTsdT	611	CgCAGUAUGGAUCGGcAGA dTsdT
121	CCUCUGCCGAUCCAUAC UG	284	CAGUAUGGAUCGGCAGAGG	448	ccucUGccGAuccAUAcuGd TsdT	612	cAGUAUGGAUCGGcAGAGG dTsdT
122	GCACCUUCUUUACGCGG GU	285	ACCcGcGUAAAGAGAGGUGC	449	gcAcuccucuuuAcGcGGud TsdT	613	ACCcGcGUAAAGAGAGGUGC dTsdT
123	AAGAAUCUCCUCGCGCUC GC	286	GCGAGCGCAGGGAGUUUCU	450	aaGAAcucuccucGocucGcd TsdT	614	GCGAGCGCAGGGAGUUcU UdTsdT
124	GAACUCCUCGCGCUCGc AG	287	CUGCGAGCGCAGGGAGUUC	451	gAAcucuccucGocucGcAGd TsdT	615	CUGCGAGCGCAGGGAGUUC dTsdT
125	UCUCUCAUUUUUCUAG GGC	288	GCCCUAGAAAAUUGAGAGA	452	ucucucAAuuuuucAGGc dTsdT	616	GCCCUAGAAAAUUGAGAGA dTsdT
126	GGcGcGcAcCUUCUUUA CG	289	CGUAAAGAGAGGUcGCGCC	453	ggGcGcAcCUucuuuAcGd TsdT	617	CGuAAAGAGAGGUcGcGcC dTsdT
127	CCGAUCCAUAUCGCGGA AC	290	GUUCCCGCAGUAUGGAUCGG	454	ccGAuccAUAcuGcGGAAc dTsdT	618	GUUCCCGcAGuAUGGAUCGG dTsdT
128	AACUCCUCGCGCUCGCA GA	291	UCUcGcGAGCGAGGGAGU	455	aacuccucGccucGcAGAd TsdT	619	UCUcGcGAGCGAGGGAGU UdTsdT
129	CUCCUCUGCCGAUCCAU AC	292	GUUUGGAUCGGCAGAGGA	456	cucuccucGccGAuccAUAc dTsdT	620	GUUUGGAUCGGcAGAGGAG dTsdT
130	GGAGUGUGGAUUCGCA CUC	293	GAGUGCGAAUCCACACUCC	457	ggAGUGUGGAUucGcAcuc dTsdT	621	GAGUGCGAAUcAcACUCCd TsdT
131	CGGGcGcAcCUUCUUUU AC	294	GUAAAGAGAGGUcGCGCCG	458	cgGcGcGcAcCUucuuuAc dTsdT	622	GUAAAGAGAGGUcGCGCCG dTsdT
132	GUUCUCAAUcGCGCGUc GC	295	GCGACCGCGGGAUUGAGAC	459	guCucAAucGccGcGucGcd TsdT	623	GCGACCGCGGGAUUGAGAC dTsdT
133	AUCCAUAUCGCGGAACU CC	296	GGAGUUCcCAGUAUGGA U	460	auccAUAcuGcGGAAcucc dTsdT	624	GGAGUUCcCAGuAUGGAU dTsdT
134	CGCACCUUCUUUACGc GG	297	CCGCGUAAAGAGAGGUGCG	461	cGcAcCUucuuuAcGcGd TsdT	625	CCGCGuAAAGAGAGGUGCG dTsdT
135	CAACGACCGACCUUGAG GC	298	GCCUCAAGGUCGGUCGUUG	462	caAcGAcCGAcCUucGAGGc dTsdT	626	GCCUCAAGGUCGGUCGUUG dTsdT
136	CCAUACUcGCGGAACUCC UA	299	UAGGAGUUCcCAGUAUG G	463	ccAUAcuGcGGAAcuccuA dTsdT	627	uAGGAGUUCcCAGuAUGG dTsdT
137	UGAAUCCCGCGGACGAC CC	300	GGGUcGUCCcCGGAUUA	464	ugAAUccCGcGGAcGAcCC dTsdT	628	GGGUcGUCCCGGGAUUA dTsdT
138	AGAAUCUCCUCGCGCUCG CA	301	UGCGAGCGAGGGAGUUC	465	agAAcuccucGccucGcAd TsdT	629	UGCGAGCGAGGGAGUUC UdTsdT
139	GGCGCACCUUCUUUAC GC	302	GCGUAAAGAGAGGUGCGCC	466	ggcGcAcCUucuuuAcGcd TsdT	630	GCGuAAAGAGAGGUGCGCC dTsdT
140	GCGCACCUUCUUUACG CG	303	CgCGUAAAGAGAGGUGCGC	467	gcGcAcCUucuuuAcGcGd TsdT	631	CgCGuAAAGAGAGGUGCGC dTsdT
141	GUUGAAUCCCGCGGACG AC	304	GUCGUCCCGGGAUUCAGC	468	gcuGAAUccCGcGGAcGAc dTsdT	632	GUCGUCCCGGGAUUCAGC dTsdT
142	CACUUCGCUUcACCUUCU GC	305	GCAGAGGUAGAGCGAAGUG	469	cAcucGcucAcCUucGcd TsdT	633	GcAGAGGUAGAGCGAAGUG dTsdT
143	CUCAUUCGCGCGUcGC AG	306	CUGCGACCGCGGAUUGAG	470	cucAAucGccGcGucGcAG dTsdT	634	CUcGcGAcCGCGGAUUGAG dTsdT
144	UCCCGUCGCGCGUGAAU CC	307	GGAUUCAGCGCGACGGGA	471	uccCGucGcGcGUAAucc dTsdT	635	GGAUUCAGCGCGGACGGGA dTsdT
145	CUGAAUCCCGCGGACGA CC	308	GGUCGUCCGCGGGAUUCAG	472	cUGAAUccCGcGGAcGAc dTsdT	636	GGUCGUCCGCGGGAUUCAG dTsdT
146	AGAGUcUAGACUcGUG GUG	309	CACCACGAGUcUAGACUCU	473	agAGucUAGAcucGUcGU GdTsdT	637	cAcCAGAGUcUAGAcUCUd TsdT
147	UCCAUAUCGCGGAACUC CU	310	AGGAGUUCcCAGUAUGGA	474	uccAUAcuGcGGAAcuccu dTsdT	638	AGGAGUUCcCAGuAUGGA dTsdT
148	GCGCUAAUCCCGCGGA CG	311	CGUCCCGGGAUUCAGCGC	475	gcGcuGAAuccGcGGAcG dTsdT	639	CGUCCCGGGAUUCAGCGC dTsdT
149	AGUGUGGAUUCGACAU CCU	312	AGGAGUGCGAAUCCACACU	476	agUGUGGAUucGcAcuccu dTsdT	640	AGGAGUGCGAAUCCAcACU dTsdT
150	CCUCUCUGUGUACAG GC	313	GCCUGUAACACGACGAGGG	477	ccucGcucGUuAcAGGc dTsdT	641	GCCUGuAAcACGAGcAGGGd TsdT
151	GAAUCCCGCGGACGACC CG	314	CGGGUCGUCCGCGGGAUUC	478	gAAuccGcGGAcGAcCCG dTsdT	642	CGGGUCGUCCCGGGGAUUC dTsdT
152	AAGCUGUGCCUUGGGU GGC	315	GCCACCAAGGCACAGCUU	479	aaGcuGUcGccuUGGGUGG cdTsdT	643	GCCACCAAGGcAcAGCUUd TsdT
153	GCCUGCUCGUGUACA GG	316	CCUGAAACACGAGCAGGGC	480	gcccUGcucGUuAcAGG dTsdT	644	CCUGuAAcACGAGcAGGGcd TsdT
154	GUCCCGUCGCGCGUGAA UC	317	GAUUCAGCGCGCAGGGAC	481	gucccGucGcGcGUAAuc dTsdT	645	GAUUCAGCGCGCAGGGAC dTsdT
155	AUCUUAUAACACUCC GG	318	CCGGAAGUGUUGAUAAGA U	482	aucuuAucAAcAcuuccGG dTsdT	646	CCGGAAGUGUUGAUAGA dTsdT
156	CUUAUCAACACUCCGG AA	319	UUCCGGAAGUGUUGAUA AG	483	cuuAucAAcAcuuccGGAA dTsdT	647	UUCCGGAAGUGUUGAUAA dTsdT
156	CUUAUCAACACUCCGG AA	320	TUCCGGAAGUGUUGAUAAG	484	CfuUfaUfcAfaCfuUfcC fgGfaAff{invdT}	648	pDTUfcCfGfaUfgUfuGfa UfaAfgdTsdT

Фиг. 4

Таблица 5. Последовательность сайта-мишени дсРНК, нацеленной на вирус гепатита В

Положение 17мера в уч.Чл AM282986.1	Немодифицированная дсРНК из Таблицы 1		Модифицированная дсРНК из Таблицы 2		Последовательность 17мера сайта-мишени (5'- 3')	Перекрытие генотипа [%]			
	Пара SEQ ID No.	Пара SEQ ID No.	Пара SEQ ID No.	Пара SEQ ID No.		A (n=332)	B (n=615)	C (n=1332)	D (n=475)
456	1/157	17/177	321/485	341/505	AAGGUAUGUUGCCCGUU	91.3	94.3	94.9	78.3
383	3/159	3/160	323/487	324/488	CUGCGGCGUUUUUAUCAU	96.7	95.9	95.9	94.3
1828	4/161	6/163	325/489	327/491	CCUCUGCCUAUAUCAUCU	95.5	81.8	96.8	92.8
1782	7/164	2/158	328/492	322/486	UGUAGGCAUAAAUGGU	97.9	96.1	95.9	97.5
381	8/165	8/166	329/493	330/494	GUCUCGCGCGUUUUUAUC	96.4	84.9	94.0	93.9
679	9/167	9/168	331/495	332/496	ACUAGUGCCAUUUGUUC	96.4	90.4	94.9	94.7
687	11/170	13/173	334/498	337/501	CAUUUGUUUCAGUGGUUC	96.7	90.4	96.1	97.7
1177	12/171	12/172	335/499	336/500	CAAGUGUUUGCUGACGC	91.3	95.9	91.8	77.5
677	14/174	5/162	338/502	326/490	UUACUAGUGCCAUUUGU	95.5	88.9	94.2	94.7
668	16/176	18/178	340/504	342/506	UGGCUUCAGUUUACUAGU	97.0	94.6	91.0	94.7
1778	19/179	23/183	343/507	347/511	AGGCUUGAGGCAUAAA	97.9	95.8	96.2	97.5
674	20/180	28/189	344/508	353/517	AGUUUACUAGUGCCAUU	95.2	88.3	93.8	93.9
458	21/181	30/191	345/509	355/519	GGUAUGUUUGCCGCUUUG	94.6	96.1	98.1	80.9
382	24/184	37/199	348/512	363/527	UCUGCGGCGUUUUUAUCA	96.7	95.6	95.3	95.8
1818	25/185	10/169	349/513	333/497	AAUUUUUUCACCUUCUGC	96.1	92.0	96.5	84.8
1576	26/186	26/187	350/514	351/515	CGUGUGCACUUCGCUUC	97.6	98.4	98.3	95.6
258	29/190	42/204	354/518	368/532	GGUGGACUUCUCUCAAU	91.9	83.6	97.3	90.5
189	31/192	91/254	356/520	418/582	UGUCGUGUUACAGGCG	93.7	93.0	93.8	76.0
461	32/193	22/182	357/521	346/510	AUGUUGCCCGUUUGUCC	95.5	96.1	98.4	79.8
455	33/194	27/188	358/522	352/516	CAAGUGUUGUUGCCCGU	91.0	95.4	93.5	93.3
2317	34/195	34/196	359/523	360/524	CUUAUCAACACUCCGG	89.8	89.8	94.8	77.7
1827	35/197	15/175	361/525	339/503	ACCUUCGCUAAUUAUCAU	95.8	82.1	96.5	92.8
1655	36/198		362/526		UAAGAGGACUCUUGGAC	92.2	88.1	90.2	91.4
1498	38/200		364/528		GCGCUGAAUCCCGCGGA	95.5	94.1	92.0	79.6
2419	39/201		365/529		GCGUCGAGAGAUUCUC	94.6	89.6	92.3	83.2
1680	40/202		366/530		AUGUCAACGACCGACCU	96.7	83.9	93.6	93.5
671	41/203		367/531		CUCAGUUUAUAGUGCC	96.7	94.8	92.6	94.7
2414	43/205		369/533		UCGCGCGUCGAGAAAG	88.6	84.1	95.1	92.4
686	44/206		370/534		CCAUUUUGUUCAGUGGUU	96.7	90.4	96.0	97.5
1263	45/207		371/535		GAUCCAUAUCUGCGGAAC	97.3	89.9	93.8	95.6
1826	46/208		372/536		CACCUUCGCUAAUUAUCAU	96.1	81.8	96.5	91.6
260	47/209		373/537		UGGACUUUCUCUCAAUUU	91.6	83.4	97.3	90.7
2821	48/210		374/538		GGUACCAUAUUCUUGG	86.7	95.4	96.5	85.3
2417	49/211		375/539		CGCGUCGAGAAAGAU	94.9	94.8	95.0	92.2
2411	50/212		376/540		CAAUCCGCGGUCGAG	87.7	84.6	94.3	90.9
375	51/213		377/541		GGUUGUGUCGCGGCGU	95.2	85.7	94.5	93.7
1859	52/214		378/542		ACUGUUCAAGCCUCAA	68.4	91.9	97.0	96.4
676	53/215		379/543		UUUACUAGUGCCAUUUG	95.5	88.9	94.1	94.7
680	54/216		380/544		CUAGUGCCAUUUGUUCA	96.1	90.2	94.9	94.7
2418	55/217		381/545		CGCGUCGAGAAAGAU	95.2	94.8	95.0	92.4
2315	56/218		382/546		AUCUUUAUCAAACUUC	90.1	89.8	94.8	78.3
303	57/219		383/547		GCCAAAUAUCGACGUCC	98.5	97.2	85.7	94.7
1825	58/220		384/548		UCACCUUCGCUAAUUAUCA	96.7	82.0	96.6	92.0
672	59/221		385/549		UCAGUUUAUCUAGUGCCA	94.9	88.5	93.8	94.1
463	60/222		386/550		GUUGCCCGUUUGUCCUC	94.9	95.1	98.4	78.9
682	61/223		387/551		AGUGCCAUUUGUUCAGU	96.1	89.9	94.8	94.5
1779	62/224		388/552		GGCUGUAGGCAUAAA	97.9	96.3	96.3	97.7
378	63/225	63/226	389/553	390/554	UGUGUCUGCGGCGUUUU	96.7	84.9	93.5	94.3
1584	64/227		391/555		CUUCGCUUCACCUUCG	97.6	98.4	97.9	95.4
1577	65/228		392/556		GUGUGCACUUCGCUUCA	97.6	98.2	98.5	95.4
257	66/229		393/557		UGUGGACUUCUCUCAA	91.9	83.6	97.1	90.5
379	67/230		394/558		UGUGUCGCGGCUUUUA	96.1	84.9	93.6	94.1
457	68/231		395/559		AGGUAUGUUUGCCGCUU	91.3	94.8	96.7	79.2
1684	69/232		396/560		CAACGACCGACCUUGAG	96.4	85.4	94.1	93.3
1654	70/233		397/561		AUAAGAGGACUUCUUGGA	92.2	87.8	90.2	91.2
1683	71/234		398/562		UCAACGACCGACCUUGA	96.7	85.7	94.2	93.1
2829	72/235		399/563		UAUUUCUUGGGAACAAGA	87.0	96.7	97.1	85.1
190	73/236		400/564		GCUUGUUAUCAGGCGG	94.9	93.3	94.0	76.0
2412	74/237		401/565		AAUCGCGCGUCGACAGA	88.0	85.7	95.1	92.8
1860	75/238		402/566		CUUUUCAAGCCUCAAAG	68.4	91.7	97.0	96.4
2416	76/239		403/567		GCCGCGUCGAGAAAGAU	88.3	83.6	93.8	90.7
688	77/240		404/568		AUUUGUUCAGUGGUUCG	96.7	90.6	96.1	97.7
1440	78/241		405/569		GCUGAAUCCGCGGACG	95.8	95.3	92.8	79.8
2820	79/242		406/570		GGGACCAUAUUCUUG	86.4	95.3	96.8	85.3
1255	80/243		407/571		CCUCUGCCGAUCCAUAC	97.6	90.2	94.9	88.8
1681	81/244		408/572		UGUCAACGACCGACCUU	96.7	85.7	94.3	93.7
1829	82/245		409/573		CUCUGCUAAUUAUCUC	95.8	82.8	97.0	89.3
1575	83/246		410/574		CCGUGGACUUCGCUU	97.6	98.5	98.3	95.8
1260	84/247		411/575		GCCGAUCCAUAUCGCGG	97.0	88.6	92.9	95.2
243	85/248		412/576		AGAGUCUAGACUUGG	93.7	96.9	95.7	96.0
1861	86/249		413/577		UGUUAAGCCUCAAAGC	68.4	91.7	96.9	96.4
1777	87/250		414/578		GAGGCUUAGGCAUAAA	97.9	95.8	96.3	97.7
1776	88/251		415/579		GGAGGCUUAGGCAUAAA	96.7	95.4	96.2	97.7
259	89/252		416/580		GUGGACUUCUUCUAAU	91.9	83.7	97.5	90.7
1817	90/253		417/581		CAACUUUUUACCCUCUG	95.8	91.7	96.2	84.4
681	92/255		419/583		UAGUGCCAUUUGUUCAG	96.1	89.9	94.9	94.7
1259	93/256		420/584		UGCCGAUCCAUAUCUGG	96.7	88.5	92.8	94.9
1578	94/257		421/585		UGUGCACUUCGCUUCAC	97.6	98.0	98.6	95.8
191	95/258		422/586		CUCGUGUUAACAGGCGGG	94.9	92.7	92.5	96.0
2313	96/259		423/587		CUAUCUUUAACAACUUCU	90.1	89.4	95.3	78.3
2409	97/260		424/588		CUCAAUCGCGGUCG	88.6	85.2	96.7	93.1
1548	98/261		425/589		CCCGUCUGGCUUCUC	97.9	96.7	95.7	98.1

2314	99/262	426/590	UAUCUU AUCAACACUUC	90.1	89.8	94.9	78.3	
462	100/263	427/591	UGUU GCCCGUUUGUCCU	95.2	95.3	98.4	79.2	
460	101/264	428/592	UAUGUUGCCCGUUUGUC	95.5	96.1	98.3	79.6	
1585	102/265	429/593	UUCGCUUACCCUCUGCA	97.3	98.4	97.8	94.7	
1579	103/266	430/594	GUGCACUUCGCUUACCC	97.9	98.4	98.6	95.8	
304	104/267	431/595	CCAAAUUUCGCAGUCCC	98.5	97.4	85.9	95.2	
188	105/268	432/596	CUGCUCGUGUUACAGGC	93.7	93.0	93.8	75.8	
2267	106/269	433/597	GGAGUGUGGAUUCGCAC	93.7	96.4	94.4	97.3	
1686	107/270	434/598	ACGACCGACCUUGAGGC	96.4	85.9	93.8	93.1	
242	108/271	435/599	CAGAGUCUAGACUCGUG	93.1	96.7	94.9	92.6	
2413	109/272	436/600	AUCGCCCGCUGCGAGAA	88.6	84.1	95.0	92.8	
459	110/273	437/601	GU AUGUUGCCCGUUUGU	95.2	95.9	98.3	79.6	
1261	111/274	438/602	CCGALCCAUACUCGCGGA	97.3	89.8	94.1	96.0	
2311	112/275	439/603	CCCUAUUUUUAACAAC	93.7	88.9	95.3	78.3	
675	113/276	440/604	GUUUACUAGUGCCAUUU	95.2	88.6	93.8	93.9	
1682	114/277	441/605	GUCAACGACCCGACCUUG	97.0	85.7	94.4	93.1	
264	115/278	442/606	CUUCUCUCAAUUUUCUA	90.7	82.0	96.4	88.2	
1408	116/279	443/607	CGCGGACGUCCUUUGU	95.5	96.9	95.9	94.5	
248	117/280	444/608	CUAGACUCGUGGUGGAC	95.5	97.2	96.5	97.1	
1264	118/281	445/609	AUCCAUACUGCGGAACU	97.9	89.4	94.1	95.6	
1257	119/282	446/610	UCUGCCGAUCCAUACUG	96.7	88.5	91.1	86.9	
1258	120/283	447/611	CUGCCGAUCCAUACUGC	96.7	92.5	92.2	88.4	
1256	121/284	448/612	CUCUGCCGAUCCAUACU	96.7	88.1	90.7	86.5	
1527	122/285	449/613	CACCUUCUUUACGCGGG	95.8	94.6	95.9	98.3	
2381	123/286	450/614	AGAACUCCUCGCCUCG	91.6	95.8	97.3	89.9	
2383	124/287	451/615	AACUCCUCGCCUCGCA	97.3	95.8	97.3	90.5	
267	125/288	452/616	CUUCUCAAUUUUCUAGGG	90.1	82.3	96.4	87.6	
1523	126/289	453/617	GGCGCACCUUCUUUAC	95.5	95.1	95.6	97.9	
1262	127/290	454/618	CGAUCCAUACUGCGGAA	97.6	89.9	94.0	95.8	
2384	128/291	455/619	ACUCCUCGCCUCGCGAG	97.6	95.8	96.9	90.1	
1254	129/292	456/620	UCCUCUGCCGAUCCAU	97.6	89.6	94.7	89.1	
2268	130/293	457/621	GAGUGUGGAUUCGCACU	93.7	93.8	93.5	97.3	
1522	131/294	458/622	GGGCGCACCUUCUUUA	95.5	95.1	95.6	97.9	
2408	132/295	459/623	UCUCAUUCGCGCGUCG	88.6	84.4	96.4	93.1	
1265	133/296	460/624	UCCAUACUGCGGAACUC	97.6	88.5	91.2	95.2	
1526	134/297	461/625	GCACCUUCUUUACGCG	95.5	94.8	95.8	98.3	
1685	135/298	462/626	AACGACCCGACCUUGAGG	96.4	85.2	94.1	93.3	
1267	136/299	463/627	CAUACUGCGGAACUCCU	97.6	88.1	90.1	95.2	
1443	137/300	464/628	GAAUCCCGCGGACGACC	95.5	95.4	92.3	79.2	
2382	138/301	465/629	GAACUCCUCGCUUCGC	97.3	96.1	97.9	91.6	
1524	139/302	466/630	GCGCACCUUCUUUACG	95.2	95.0	95.6	97.9	
1525	140/303	467/631	CGCACCUUCUUUACGC	95.2	94.8	95.8	98.3	
1441	141/304	468/632	CUGAUCCCGCGGACGA	95.8	95.3	94.1	79.6	
1583	142/305	469/633	ACUUCGCUUACCCUCUG	97.6	98.4	98.2	96.6	
2410	143/306	470/634	UCAUUCGCGCGUCGCA	88.0	84.6	94.8	92.0	
1431	144/307	471/635	CCCGUCGCGCUGAAUC	87.7	93.5	87.7	94.7	
1442	145/308	472/636	UGAAUCCCGCGGACGAC	95.8	95.4	92.3	78.9	
244	146/309	473/637	GAGUCUAGACUCGUGGU	93.7	96.7	96.0	95.8	
1266	147/310	474/638	CCAUAUCUGCGGAACUCC	97.6	88.3	89.9	95.2	
1439	148/311	475/639	CGCUGAAUCCCGCGGAC	95.8	94.8	92.1	79.8	
2270	149/312	476/640	GUGUGGAUUCGCACUCC	96.1	94.6	94.6	97.7	
187	150/313	477/641	CCUGCUUCGUGUACAGG	93.7	93.2	94.1	76.0	
1444	151/314	478/642	AAUCCCGCGGACGACC	95.5	95.4	92.4	79.2	
1875	152/315	479/643	AGCUGUGCCUUGGGUGG	73.8	96.1	96.4	96.2	
186	153/316	480/644	CCUGCUUCGUGUACAG	93.7	93.0	93.9	76.0	
1430	154/317	481/645	UCCCGUCGCGCGUGAAU	87.3	93.5	87.6	94.7	
2316	155/318	482/646	UCUUAUCAACACUCCG	89.8	89.8	94.8	77.7	
2318	156/319	156/320	483/647 484/648	UAUCAACACUUCGCGA	89.8	89.9	94.7	77.7

Фиг. 5

Таблица 6. Учетные номера геномных последовательностей вируса гепатита В в базе NCBI Genbank

Генотип А							
FJ692613	FJ692587	AF090838	FJ692590	DQ020003	AF090839	GQ477476	GQ477473
FJ692584	EU859907	AJ131570	EU859910	FJ349223	FJ023662	AY862867	EU859928
AY233287	AY233279	FJ692609	AF297624	AB270536	GQ331048	AM295795	FJ692555
EU859904	FJ692610	FJ692563	GQ477496	EU859934	FJ692582	AB453982	EU594391
FJ692579	EU859927	EU859942	EU859930	GQ477492	AY233281	EU594394	FJ692588
AY738141	GQ477481	AY934765	AM184126	AF143305	EU859902	EU859951	AY934773
GQ477482	AY738142	AY161141	GQ331046	DQ788725	FM199974	FJ692570	FJ692575
FJ692559	AB453988	AY373428	FU859950	FU859914	FU859922	GQ331047	AY233276
EU859924	AM410963	GQ477498	FJ692571	EU859948	GQ477479	AF143301	EU859954
GQ414522	DQ298164	GQ477465	EU594395	FJ692569	GQ477484	FJ692607	EU859908
FJ904434	AJ131573	AF418674	AB453983	FJ692594	EF208113	AF143303	EU859898
FJ692565	AB241115	AM184125	GQ477477	DQ315784	EU859947	EU859931	FJ692556
EU859944	EF208115	FU185786	AB222707	EU054331	FJ692566	AF297625	GQ477470
EU859918	EU859941	FJ692572	AF043580	GQ477501	DQ298162	GQ477497	AY233288
DQ788729	FJ692560	EU859953	DQ315786	AB126580	GQ477460	AY903452	AY934770
FJ692598	AY934766	AY934774	FJ692596	FJ692603	U87746	EU859911	AY233275
AY934763	AB246317	AY077735	EU859916	EU859909	AB194952	FJ692591	FJ692576
DQ298161	GQ477466	AB453980	DQ788727	FJ692574	AF090841	FJ692606	AF043560
AB194951	FJ904411	AM295797	FJ692601	EU859955	AF143299	GQ477504	EU594392
EU859938	FU185788	FM199979	GQ477503	AY233277	AY233284	AF143300	AB453987
GQ477463	AY233282	GQ477489	AF143307	AY934772	GQ477480	FJ692583	EU859900
AF090842	FJ692581	GQ477474	EU859936	FJ692589	AY738143	AY233280	AY233283
EU859944	EU859901	AM282986	AF297622	EU594390	AM494718	GQ477464	FJ692580
EU859925	FM199977	AF143302	GQ477490	FJ692554	EU859926	GQ477499	AY738139
FJ692558	AM295799	FJ692593	AY902775	FU859929	AY128092	AY373429	FU185789
AY738140	GQ477487	AY233290	EU594393	GQ477472	FJ692611	AY934764	AB222708
GQ477483	EU859921	AY934768	EU859956	AB453986	AY233278	FJ692562	GQ477485
FJ692578	GQ477467	EU859913	AY233274	GQ477500	EU859906	EU859943	GQ477478
EU859905	GQ161813	FJ692604	FJ692577	FJ692602	AY233285	EU410082	EU859923
FJ692585	EF208114	FJ349224	AY934771	FJ692595	FJ692586	FJ692608	EU859903
AY233286	AY934767	EU859933	AY233289	EU859949	EU185787	AF143306	FJ349222
FJ692612	EU859940	GQ477468	GQ477471	FJ692568	AF418675	FJ692600	FJ692601
GQ477462	FJ692561	GQ477495	EU859899	FU859915	GQ477494	GQ477502	AF330372
EU859925	AB241114	AM295800	FJ692557	DQ315785	GQ477469	DQ788726	AB330373
EU086721	DQ298165	GQ477475	FM199981	GQ184323	EU859932	EU859917	AJ627226
AB194950	AY034878	GQ477488	AB453985	AF143304	FJ692605	FJ692597	AJ627227
EU859939	EU859920	AM295796	EU366129	GQ477493	EU859912	FU474320	AJ627228
AF143308	GQ477486	AB453981	AF297623	AF297621	AY934769	FM199980	AP007263
FJ692599	FM199976	FJ692573	GQ477491	EU859935	FJ692592	AB453984	EU304331
DQ788728	AM295798	FU859952	FU859937	DQ020002	GQ184324	AB453979	EU414132
EU859919	FJ692567	EU414134	DQ298163	AF090840	EU859945	S50225	V00866
FJ692564	AB453989	FM199978	EU859946	GQ477461	AF143298		

Генотип В

EU306702	GU332692	AB073842	AY800389	AY206377	AB106884	AB073843	FJ386688
GU332701	AB073822	AH493831	DQ463798	FJ386636	FU939630	FU939633	AJ131574
EF473975	AY596102	GQ924634	FU939670	D23678	FJ386656	DQ463787	AB073840
FJ787444	DQ904357	AY167098	AY596103	DQ993680	AB116083	FJ386655	AB219429
D23679	EU882001	AB116082	AB073823	EF473974	GQ377641	AY293309	DQ361535
DQ993681	GQ924608	AB205122	GQ377596	AY781187	AF121243	U87747	AB493830
AY033072	GQ924654	EU306670	GQ377537	AY163870	GQ924635	EU564822	DQ993710
GQ924628	FU939671	FU939631	FU919175	EU306703	FJ386676	FU522074	AH365445

AB195933	AB302095	AY518556	D00330	GQ377612	AB010292	GQ377564	DQ993701
DQ993706	FJ032353	AB287326	FJ562231	FJ5622303	AP011090	EU660224	GQ924647
GQ924640	AP011096	EU439021	GU168597	GQ924646	DQ448625	EU331000	FJ386658
EU939662	AB246341	GQ377565	AY217363	GQ924624	GQ924644	EU330993	EU589335
GQ377613	IF494380	AB287321	FU547563	AB010290	DQ993702	GQ924638	GQ377547
HU306682	GU168596	AF121251	DQ463795	DQ995804	HU350409	FM209513	AB073853
EU330990	D00331	EF134945	FJ562253	AB073852	AB212625	EU439019	EU796067
AB073831	X98075	GQ924627	EU522066	DQ448627	AY596112	AB219427	AP011093
DQ463801	DQ463796	DQ448624	GQ377566	FJ032357	GQ377587	GU168595	AY220704
GQ377525	GQ924607	FJ032354	AB287322	EU796066	AB073832	X98076	DQ448626
AY167097	AY217360	AP011091	IF134946	AP011092	DQ463802	FJ562321	AB010291
FJ562322	FU331001	AB073851	FU595030	DQ463789	GQ377610	EU306712	FJ386666
EU306711	GQ377539	GQ377519	AY206387	EU939661	EU306681	AB246342	AB486012
GQ924625	GQ924659	AB219426	DQ463788	AB493834	FJ023634	D50521	AB302943
EU595031	DQ463794	FM209512	GQ924645	AB493836	FJ023635	D50522	AB302944
AY167089	EU939681	GQ924639	AB014366	AF461360	FJ023636	FJ023631	AB302945
HU439024	AY217362	HU330992	AB031267	AJ627225	FJ023637	FJ023632	AB362933
EU660227	X98077	EU306680	AB302942	AY167094	FJ023638	FJ023633	AB493828
AY220697	AJ131133	AB073833	EU522067	AB246343	AF233236	GQ377567	GU168594
AB287323	EF494382	DQ993703	GQ475340	EU439018	EU939660	FJ787475	

Генотип С

FJ562331	EU439009	EU916218	FJ386580	FJ386617	FJ386677	GQ475351	AB250109
AY781186	D23684	EU570067	EU939547	EU439015	AB195947	AF537372	AB111117
FJ562282	FJ023664	AB300366	AY373432	FJ032347	EU939586	GQ377640	GQ924614
GQ377620	AF411411	GQ475311	FJ787464	EU305540	GQ227696	AY330914	DQ089764
GQ475331	HU939567	GQ377600	FJ787438	HU916224	FJ787458	HU919168	HU872003
FJ562223	FJ386637	EU306722	DQ089778	DQ377160	AB241110	FJ562243	AB026815
EU916238	AY206376	GQ377536	AF461043	EU560440	GQ377576	EU564820	FJ787478
GQ377516	EU939651	AB471853	DQ089785	EU589339	AB367417	EU916204	AP068756
FJ882612	DQ089758	GQ377597	EU871982	AF533983	EU589345	FJ386657	FJ787485
EF137802	EU306691	AB198077	AB112063	EU939611	AF223956	DQ089799	AY217373
EU678475	FJ787439	EU916219	EU939566	FJ562283	AY217372	FJ562242	DQ975274
AJ3367394	FJ787465	EU306690	FJ882613	GQ377621	DQ089765	HU919169	AB241111
EU871983	AB485810	EU306723	GQ377517	FJ787484	GQ924615	EU306671	AY167099
DQ089784	EU882000	FJ562310	EU439008	FJ787479	AB111116	AB205123	FJ787459
GQ924655	AB198076	EU939650	EF137803	AB026814	GQ924649	GQ475350	EU939610
GQ924609	AB471852	DQ089759	FJ562330	FJ023659	DQ089798	GQ377577	EU916225
DQ089779	GQ377601	GQ924629	DQ336412	HU872002	AF223957	AB367416	HU589358
FJ386616	GQ475310	AF411410	EU916239	AB112348	EU589344	GQ227697	EU560441
EU939546	AB300367	FJ787445	GQ475330	AB367395	EU916205	EU939587	EU410079
FJ386581	NC_003977	FJ023665	AB064314	HU678474	FU564821	AB195946	DQ377161
FJ032346	EU939559	EU306672	AB241112	DQ377162	EU522068	EU939565	GQ475333
EU305541	FJ787487	AY330916	EU939579	FJ562261	GQ475313	FJ023666	FJ562280
GQ377557	EU872001	GQ377642	GQ227694	EU916226	EU306693	FJ787446	AY781184
DQ089766	GQ259588	GQ475333	HU939584	FJ787466	AB471851	AB247916	FJ562333
AB111115	FJ032339	AF223954	AB195945	EU939545	GQ377534	AY206389	D16665
GQ924616	AB367415	AB116080	EU305542	FJ386649	AB367409	AB048704	FJ032359
FJ386609	GQ377574	FJ386629	GQ377554	EU871980	EU660228	EU939653	AB367429
AB195939	GQ377528	EU939613	AB367435	DQ089787	DQ993181	AY206374	GQ377548
AJ3367396	HU916206	GQ924636	FJ032345	EU306720	HU939598	FJ386635	HU554538
AY217371	FJ562241	AY161139	EU594383	FJ562313	EU939539	FJ562221	FJ882610
GQ377514	AY161138	GQ475352	GQ377575	AB367428	DQ536410	FJ787447	EU306692
DQ377163	AB195944	FU306673	HU939558	HU960469	FJ562332	FJ023667	AB300365

EU871975	GQ377540	FJ562229	FJ562307	GQ377581	AB195931	GQ475327	DQ315782
AB368296	FJ882618	FJ386661	AB231908	GQ377520	FJ386601	AB493838	FJ518813
EU881996	AB367421	Y18856	EU562216	FJ032331	GQ872211	EF494378	EU939571
DQ089772	AB113877	AY206381	AB116088	FJ787472	DQ089793	FJ562294	FM209515
EU871988	FJ032351	EU939607	AB493844	EU872009	EU871994	GQ377636	EU155829
IJ386641	AF223960	GQ924622	GQ377616	IJQ986375	GQ924642	FJ562327	AY167092
AB037928	FJ562288	AB111121	GQ475307	AB365451	EU871969	AB246344	FJ787452
FJ386577	EU916232	AB195951	EU306687	EU939551	FJ562235	EU306714	FJ023672
AY596108	AY247032	EU939590	FJ562249	FJ386596	FJ562269	EU717216	EU939647
EU547559	FJ562304	FJ787471	GQ475324	FJ518810	DQ478900	EU881995	GQ377543
IJ386621	IU562215	DQ986376	GQ377635	IU939572	AP011104	DQ089771	IJQ993688
FJ032332	DS0489	AB365452	FJ562297	FJ562318	AB367402	AF498266	AB195952
GQ377523	DQ089790	DQ315781	EU939618	FJ562256	FJ787490	GQ475338	EU939593
AB206817	EU871997	AB042284	EU939644	EU916211	EU872016	EU916251	AB111122
AB300373	FJ386602	FJ562324	FJ386622	GQ475318	FJ386574	AY247031	AF458664
GQ377615	EU939552	EU594388	AB033557	GQ377609	AF182802	FJ562276	FJ386662
AB493847	FJ386595	EU306717	AY167091	GQ475344	FJ386589	AB367422	AY206382
IU570072	AB115418	EU717215	IJ023671	GQ377563	IU939624	AY220700	Y18855
AB116076	AB195932	AY057948	FJ787451	AB198083	EU871976	AP011097	EU939658
EU939604	EU306716	EU871996	AB206816	AB195953	GQ377628	AM180624	GQ475319
FJ787450	AB246346	DQ089791	GQ377522	DQ993689	FJ562339	FJ386575	EU916210
FJ023670	FJ562325	FJ386603	GQ377583	GQ372968	FJ386643	AP011105	EU717212
AY167090	AB042285	EU570073	GQ924620	AY220701	IU939625	DQ478901	IJQ589337
EU939573	GQ475325	EU306685	AB111123	AB113875	DQ089770	AB198082	FJ562323
FJ386623	GQ184326	GQ475305	AF458665	AB367423	EU871977	GQ377562	AB042283
IU939645	FJ386594	AB300372	IU939605	FJ562277	EU872017	AB367403	GQ475323
EU939619	EU939553	FJ562305	EU939659	AY247030	AY077736	FJ562319	GQ377632
AB033536	FJ787470	AB116077	FJ386663	EU916230	FJ386588	GQ377608	FJ562290
EU717214	AJ748098	FJ032333	EU939592	GQ475339	AF182803	GQ475345	FJ386679
IJ386625	AB367419	AB111119	IU439007	DQ089756	AP011103	IU939549	IU939554
EU939643	GQ377524	EU871990	AB367425	EU939603	GQ377599	AF182805	AB426467
AB033550	GQ377578	DQ089797	GQ377518	AY206385	AB198079	EU547561	DQ089796
FJ787456	FJ386585	FJ386605	GQ377544	FJ386639	AB198084	FJ386645	EU871991
AY167096	DQ980551	FJ386659	AB195955	FJ386665	GQ377538	FJ386619	AB111118
IU939575	AB493840	IU939555	IU939594	AY206378	AB367405	IU939623	FJ386604
DQ939693	EU919166	FJ386592	FJ349241	AB300368	AY641561	AY306136	EU919167
EU939588	AB298721	FJ562271	EU939569	GQ475343	DQ089800	DQ089776	AB493841
AB195949	AB049610	IU916236	AJ309370	IU916216	IJ787436	IU871971	IU570074
FJ032335	AF223958	FJ032355	AB111125	FJ562251	EU872011	FJ386593	AF223959
FJ562302	AF182804	FJ787468	FJ787489	EU939597	AB493843	AB014385	FJ023643
AB298720	EU939548	EU871973	EU939557	EU939536	GQ377611	AB014389	FJ023644
AB367418	AB198078	GQ924658	AB195937	AB367406	IU919165	AB014391	FJ023645
FJ032334	GQ377598	GQ924604	AB367398	AY641562	GQ377527	AB014392	FJ023646
GQ377584	AP011102	DQ089774	D12980	DQ089803	GQ377586	AB014393	FJ023647
DQ980550	DQ089801	DQ089789	GQ377526	AP011100	FJ032336	AB014394	FJ023648
GQ377579	EU660225	EU939621	FJ032337	EU916215	FJ787488	AB014396	FJ023649
FJ787457	AY641560	AB106895	FJ562301	FJ562252	AB367399	AB014399	FJ023650
AB195948	AB367404	FJ386647	EU919164	AY066028	AB195936	AB031262	FJ023653
EU939589	EU570068	EU916214	AF536524	FJ562340	EU939556	AB031265	FJ023654
IJQ993692	FJ562250	GQ475341	AB493842	DQ089788	FJ386591	AB076678	FJ023656
EU939574	EU916217	DQ089802	EU916208	DQ089775	FJ386606	AB076679	FJ023657
EU939642	GQ475342	EU660226	AB033552	EU871972	GU357845	AB105172	FJ023658
FJ386685	AB300369	EU439025	EU939641	FJ386646	GQ924619	AB105173	FJ023668
FJ386624	DQ089757	AY641563	FJ386686	EU547562	DQ089769	AB105174	FJ023674
FJ386678	AB111124	AB367407	FJ386627	EU939620	EU871993	AB116085	FJ023675
AB033551	AY206379	AP011101	DQ993691	FJ787469	DQ089794	AB362931	FJ023676
AB042282	FJ386664	FJ787448	IU939577	IU872012	AB014360	AB362932	L08805
EU589336	FJ386638	EU939537	FJ787454	GQ475320	AB014362	AB367800	L13994
M38636	AY206384	IU939596	FJ562233	FJ562293	AB014363	AB367803	M38454

EU717213	EU939602	AB195957	EU916228	GQ377631	AB014364	AB367804	S75184
FJ562230	EU939568	FJ386667	FJ562292	EU916229	AB014365	AF461357	V00867
GQ377633	EU939595	EU939601	GQ377630	FJ562232	AB014367	AF461358	X01587
FJ562291	AB195954	AF363962	GQ475321	EU717211	AB014369	AF461359	X02763
GQ475322	AJ309371	EU916234	AB205152	EU306713	AB014370	AF461361	X04615
AB050018	AB367424	FJ562273	FJ554537	FJ562320	AB014371	AJ461363	X14193
GQ377559	EU439006	EU554536	FJ032356	EU939576	AB014372	AJ012207	X52939
FJ032348	EU554533	GQ377546	AF241410	AF330110	AB014374	D00630	X70185
EU939622	GQ377545	AB367427	AB367426	DQ903690	AB014376	D16666	X75636
FJ386618	AB117758	AF241411	AF363963	FJ787455	AB014377	D16667	X75665
EU547560	DQ922649	EU439005	FJ562272	AY167095	AB014378	D50517	Z35717
FJ386644	EU916237	FJ386607	EU916235	AB033553	AB014379	D50518	Z72478
EU871970	FJ562270	DQ089795	EU939600	FJ386626	AB014380	D50519	Z72479
DQ089777	AF363961	EU871992	AY206386	FJ386687	AB014381	D50520	FJ023642
EU872010	AY148342	DQ089768	FJ787449	EU939640	AB014382	AB014382	AB014384
FJ787437	X51970	GQ924618	FJ023669	FJ562300	AB014383	FJ023641	EU916209
AM180623	EU872013	FJ787474	AB195956				

Генотип D

AY721606	AF121240	GU456638	FJ349214	EU594409	EU594389	GQ456672	AB330369
FJ904397	GQ377589	AY161162	EU787440	FJ904403	AJ344116	M32138	AB330370
FJ904414	EU919197	AB270543	GQ167302	AY741797	AY721612	FJ904447	AF280817
IU787447	AB222711	AY236163	AB048701	AY721611	DQ315780	FJ904398	AJ627215
FJ349213	EU594400	GU456644	DQ111987	EU414141	AY741794	AY721609	AJ627216
GU456680	GU456663	GQ205382	EU594425	AY902770	AY233293	X59795	AJ627217
X97848	EU921418	EU594427	GQ305380	AB119256	FJ904420	EU787437	AJ627218
AJ131956	DQ315777	DQ486024	GU456646	AB493845	EU414142	FJ904438	AJ627219
FJ349233	L27106	AB188245	FJ349228	X80925	AY902773	AY161157	AJ627220
AB270546	AB270544	AB205127	AB270541	AY862864	GU456649	GU456651	AJ627221
FJ562263	AY236164	EU787442	AF121239	GU456657	AB119255	AB090269	AJ627222
EU414136	FJ904436	FJ349216	AY236161	EU594434	AB493846	EU594432	AJ627223
GU456661	AY161159	AF418687	GU456666	AY161151	GU456675	EU939680	AJ627224
AB210821	AY373430	GU456678	AB033559	AB270550	EU594416	EF103276	DQ336674
EU594402	EU787439	AB048703	EU594405	EU594397	FJ904440	AY796030	DQ336675
FJ904408	FJ349231	EU594398	FJ349208	GQ477455	GQ922000	AM494716	DQ336676
AF121242	EF103285	FJ904431	AY161160	GQ922002	GQ477457	FJ904418	DQ336677
DQ304548	AY661793	GU456658	DQ111986	GU456677	EU594436	FJ904444	DQ336678
AB222713	DQ329357	AB210818	AF418684	FJ904442	GU456655	GU456671	DQ336679
EU594422	FJ349211	AB471856	FJ904412	AF418688	AY161153	GQ477453	DQ336680
AY945307	EU787445	DQ304551	AF418679	FJ349219	AB109476	AY902777	DQ336681
GU456641	FJ904416	AB205126	EU787441	AB205128	AY233295	FJ904424	DQ336682
GQ205387	AF418680	FJ562309	FJ349215	FJ904422	AB270548	FJ386590	DQ336683
FJ904428	GU456682	DQ486025	AF043594	EU594428	EU414138	AB119251	DQ336684
AY161147	FJ904395	AB188244	GQ477459	EU414140	FJ904406	AY090453	DQ336685
DQ486021	EU594382	GQ205383	GQ924652	AY721610	AF418690	FJ904404	DQ336686
Y07587	DQ315776	GU456645	FJ349235	AY233291	AB119253	AF418692	DQ336687
FJ349232	AB270545	EU594426	FJ904432	AY741796	GQ205389	DQ315779	DQ336688
FJ904435	EU921419	AY236162	AB109478	FJ349205	GU357846	GQ184322	DQ336689
X97849	EU594401	AY741798	AB110075	FJ904402	FJ349221	GQ477452	DQ336690
GU456681	EU414135	AB270542	AB222709	GU456637	FJ904426	GQ922005	DQ336692
FJ904415	GU456662	AY161163	FJ103281	EU594408	AY161149	GU456670	DQ464164
FJ349212	AB210822	AB267090	FJ349209	AB119254	AY721608	FJ904445	DQ464165
EU787446	AB222710	EU594406	AY161161	GU456648	FJ904399	EU155893	DQ464166
AB116266	AB270539	GU456639	AB033558	AY902772	FJ904446	FJ904419	DQ464167
FJ904396	AF121241	GU456665	GU456667	EU414143	GU456673	DQ991753	DQ464168
AF043593	AB078033	AB471857	EU594404	AB090270	EU594410	AY796031	DQ464169
AY721607	DQ486022	GQ377532	AY236160	FJ904421	AY796032	EF103277	DQ464170
AB188241	AB188243	DQ304550	AB246348	AY741795	AY161155	GU456650	DQ464172

Фиг. 6

Таблица 7. Сравнение эффективности нокдауна и перекрытия геномов ВГВ для единичной дсРНК и их комбинаций

Пара SEQ ID No.	дсРНК 1			дсРНК 2			Комбинация дсРНК 1+2					
	1 нМ		% перекрытия (2754 геномов)	1 нМ		% перекрытия (2754 геномов)	10 нМ	1 нМ		% перекрытия (2754 геномов)	Пары геномов не подобраны	
	[%] остат. Уровень Rluc			[%] остат. Уровень Rluc			[%] остат. Rluc	[%] остат. Уровень Rluc				
322/486	14	1	96.4	333/497	21	7	93.5	5	25	1	99.67	9
322/486	14	1	96.4	346/510	35	13	94.3	7	26	2	99.82	5
322/486	14	1	96.4	330/494	20	5	92.2	6	28	3	99.67	9
322/486	14	1	96.4	324/488	15	2	95.8	5	29	4	99.85	4
327/491	19	4	92.6	322/486	14	1	96.4	5	30	5	99.64	10
327/491	19	4	92.6	326/490	17	3	93.3	4	30	6	99.35	18
326/490	17	3	93.3	333/497	21	7	93.5	4	30	7	99.71	8
336/500	23	8	90.2	322/486	14	1	96.4	5	31	8	99.64	10
324/488	15	2	95.8	333/497	21	7	93.5	3	31	9	99.56	12
324/488	15	2	95.8	339/503	25	10	92.6	5	31	10	99.75	7
326/490	17	3	93.3	347/511	36	14	96.5	6	31	11	99.82	5
326/490	17	3	93.3	322/486	14	1	96.4	5	32	12	99.85	4
332/496	21	6	94.0	322/486	14	1	96.4	6	32	13	99.85	4
332/496	21	6	94.0	324/488	15	2	95.8	4	32	14	99.31	19
327/491	19	4	92.6	332/496	21	6	94.0	4	32	15	99.38	17
332/496	21	6	94.0	347/511	36	14	96.5	5	32	16	99.89	3
327/491	19	4	92.6	324/488	15	2	95.8	4	33	17	99.78	6
336/500	23	8	90.2	324/488	15	2	95.8	5	33	18	99.49	14
332/496	21	6	94.0	333/497	21	7	93.5	3	34	19	99.71	8
324/488	15	2	95.8	347/511	36	14	96.5	5	34	20	99.85	4
332/496	21	6	94.0	330/494	20	5	92.2	4	37	21	99.24	21
337/501	24	9	95.2	322/486	14	1	96.4	6	42	22	99.82	5
337/501	24	9	95.2	347/511	36	14	96.5	6	42	23	99.89	3
337/501	24	9	95.2	324/488	15	2	95.8	5	43	24	99.60	11
337/501	24	9	95.2	333/497	21	7	93.5	6	44	25	99.71	8
337/501	24	9	95.2	336/500	23	8	90.2	7	47	26	99.71	8
341/505	31	11	91.5	322/486	14	1	96.4	5	50	27	99.85	4
341/505	31	11	91.5	324/488	15	2	95.8	5	57	28	99.67	9
351/515	38	15	97.7	337/501	24	9	95.2	6	60	29	99.75	7
351/515	38	15	97.7	342/506	32	12	93.2	8	60	30	99.93	2

Фиг. 7

Таблица 8. Последовательности дсРНК отрицательного контроля, использованные при скрининговом анализе psiCHECK™-2.

Цепь	Последовательность	Ген
Кодирующая	5'-cuaAcGcuGAGuAciucGATsT-3'	LUC(GL3)
Некодирующая	5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGTsT-3'	LUC(GL3)
Кодирующая	5'-CcAcAuGAAGcAGcACGACusU-3'	GFP
Некодирующая	5'-AAGUCGUGCUGCUUCAUGUGgsusC-3'	GFP

Фиг. 8

