

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091437 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.12.29

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

(22) Дата подачи заявки
2018.12.12

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

(31) 62/597,841

(32) 2017.12.12

(33) US

(86) PCT/US2018/065275

(87) WO 2019/118638 2019.06.20

(88) 2019.08.15

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

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

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

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

A1

202091437

202091437

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563356EA/032

КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ RNAi, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ PNPLA3

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/597841, поданной 12 декабря 2017 года, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 12 декабря 2018 года, названа A-2219-WO-PCT_SL.txt и имеет размер 708961 байт. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

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

[4] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 12 декабря 2018 года, названа A-2219-WO-PCT_SL.txt и имеет размер 708961 байт.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[5] Являясь частью спектра патологий печени, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) представляет собой самое распространенное хроническое заболевание печени в мире, заболеваемость которым удвоилась за последние 20 лет, и в настоящее время, по оценкам, она затрагивает приблизительно 20% населения в мире (Sattar et al. (2014) BMJ 349:g4596; Loomba and Sanyal (2013) Nature Reviews Gastroenterology & hepatology 10(11):686-690; Kim and Kim (2017) Clin Gastroenterol Hepatol 15(4):474-485; Petta et al. (2016) Dig Liver Dis 48(3):333-342). NAFLD начинается с накопления триглицеридов в печени и определяется наличием цитоплазматических липидных капель в более чем 5% гепатоцитов у индивидуума 1) без избыточного потребления алкоголя в анамнезе и 2) у которого были исключены другие типы болезней печени (Zhu et al (2016) World J Gastroenterol 22(36):8226-33; Rinella (2015) JAMA 313(22):2263-73; Yki-Jarvinen (2016) Diabetologia 59(6):1104-11). У некоторых индивидуумов накопление эктопического

жира в печени, называемое стеатозом, вызывает воспаление и повреждение клеток печени, что приводит к более поздней стадии заболевания, называемой неалкогольным стеатогепатитом (NASH) (Rinella, выше). По состоянию на 2015 год у 75-100 миллионов американцев прогнозируется развитие NAFLD; при этом NASH составляет примерно 10-30% диагнозов NAFLD (Rinella, выше; Younossi et al (2016) *Hepatology* 64(5):1577-1586).

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] Настоящее изобретение частично основано на конструировании и получении конструкций для RNAi, которые целенаправленно воздействуют на ген PNPLA3 и снижают экспрессию PNPLA3 в клетках печени. Ингибирование экспрессии PNPLA3 по специфической последовательности является применимым для лечения или предотвращения состояний, ассоциированных с экспрессией PNPLA3, таких как заболевания печени, такие как, например, жировой гепатоз (стеатоз), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени (необратимое прогрессирующее рубцевание печени) или ожирение, связанное с PNPLA3. Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлена конструкция для RNAi, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок,

имеющий последовательность, которая является комплементарной последовательности мРНК PNPLA3. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить содержит участок, имеющий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из антисмысловой последовательности, представленной в таблице 1 или таблице 2. В некоторых вариантах осуществления RNAi по настоящему изобретению избирательно подавляет минорные аллели PNPLA3-rs738409, PNPLA3-rs738408 и/или PNPLA3-rs738409-rs738408 по сравнению с эталонным аллелем, который не содержит данных изменений.

[8] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить конструкций для RNAi, описанных в данном документе, содержит последовательность, которая комплементарна последовательности антисмысловой нити в достаточной степени, чтобы образовать дуплексный участок длиной от приблизительно 15 до приблизительно 30 пар оснований. В этих и других вариантах осуществления каждая смысловая и антисмысловая нити имеют длину, составляющую от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по меньшей мере один тупой конец. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец. Такие нуклеотидные липкие концы могут содержать по меньшей мере от 1 до 6 неспаренных нуклеотидов и могут быть расположены на 3'-конце смысловой нити, 3'-конце антисмысловой нити или 3'-конце как смысловой, так и антисмысловой нитей. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат липкий конец из двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат липкий конец из двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 3'-конце смысловой нити/5'-конце антисмысловой нити.

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

[10] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по

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

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

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

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

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

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

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

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

ожирение, связанное с PNPLA3.

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

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

[20] РНК-интерференция (RNAi) представляет собой процесс введения экзогенной РНК в клетку, который приводит к специфической деградации мРНК, кодирующей целевой белок, с последующим снижением экспрессии белка. Достижения как в области

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

[21] Используемый в данном документе термин "конструкция для RNAi" относится к средству, содержащему молекулу РНК, которая при введении в клетку способна снижать экспрессию целевого гена (например, PNPLA3) посредством механизма РНК-интерференции. РНК-интерференция представляет собой процесс, посредством которого молекула нуклеиновой кислоты вызывает расщепление и деградацию молекулы целевой РНК (например, матричной РНК или мРНК) специфичным для последовательности образом, например через путь РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит молекулу двухнитевой РНК, содержащую две антипараллельные нити из смежных нуклеотидов, которые достаточно комплементарны друг другу, чтобы гибридизоваться с образованием дуплексного участка. Термины "гибридизовать" или "гибридизация" относятся к спариванию комплементарных полинуклеотидов, обычно с помощью водородных связей

(например, связей Уотсона-Крика, Хугстина или обратной водородной связи Хугстина) между комплементарными основаниями в двух полинуклеотидах. Нить, содержащую участок, имеющий последовательность, которая по сути комплементарна целевой последовательности (например, целевой мРНК), называют "антисмысловой нитью". Термин "смысловая нить" относится к нити, которая включает участок, который по сути комплементарен участку антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить может содержать участок, имеющий последовательность, которая по сути идентична целевой последовательности.

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

[23] Молекула двухнитевой РНК может включать химические модификации рибонуклеотидов, в том числе модификации компонентов рибонуклеотидов, представляющих собой рибозный сахар, основание или остов, таких как те, которые описаны в данном документе или известны из уровня техники. Любые такие модификации, которые используются в двухнитевой молекуле РНК (например, siRNA, shRNA или им подобные), охватываются термином "двухнитевая РНК" в целях настоящего изобретения.

[24] Согласно терминологии, используемой в данном документе, первая последовательность "комплементарна" второй последовательности, если полинуклеотид, содержащий первую последовательность, может гибридизоваться с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, с образованием дуплексного участка при определенных условиях, таких как физиологические условия. Другие такие условия могут включать умеренные или жесткие условия гибридизации, которые известны специалистам в данной области. Первая последовательность считается полностью комплементарной (комплементарной на 100%) второй последовательности, если полинуклеотид,

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

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

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

настоящему изобретению содержат siRNA.

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

[28] В других вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить, которые гибридизуются с образованием дуплексного участка, могут быть частью одной молекулы РНК, т. е. смысловые и антисмысловые нити могут быть частью самокомплементарного участка одиночной молекулы РНК. В таких случаях одиночная молекула РНК содержит дуплексный участок (также называемый как участок стебля) и участок петли. 3'-конец смысловой нити соединяется с 5'-концом антисмысловой нити непрерывной последовательностью неспаренных нуклеотидов, которые будут образовывать участок петли. Участок петли обычно имеет длину, достаточную для того, чтобы молекула РНК могла свернуться обратно так, чтобы антисмысловая нить могла образовывать пару со смысловой нитью, образуя дуплекс или участок стебля. Участок петли может содержать от приблизительно 3 до приблизительно 25, от приблизительно 5 до приблизительно 15 или от приблизительно 8 до приблизительно 12 неспаренных нуклеотидов. Такие молекулы РНК с по меньшей мере частично самокомплементарными участками обозначают как "короткие шпильковые РНК" (shRNA). В некоторых вариантах осуществления участок петли может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или 25 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления участок петли может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или меньше неспаренных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат shRNA. Длина одной по меньшей мере частично самокомплементарной молекулы РНК может составлять от приблизительно 35 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 45 нуклеотидов до приблизительно 85 нуклеотидов или от приблизительно 50 до приблизительно 60 нуклеотидов, и содержать дуплексный участок и участок петли, каждый из которых имеет длину, указанную в данном документе.

[29] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок, имеющий последовательность, которая по сути или полностью комплементарна последовательности матричной РНК (мРНК) PNPLA3. Используемый в данном документе термин "последовательность мРНК PNPLA3" относится к любой последовательности матричной РНК, включая сплайс-варианты, кодирующие белок

PNPLA3, включая варианты белка PNPLA3 или изоформы любых видов (например, мыши, крысы, нечеловекообразного примата, человека). Белок PNPLA 3 также известен как адипонутрин (ADPN) и кальций-независимая фосфолипаза A2-эпсилон (iPLA(2)ε)).

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

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

[32] Смысловая нить конструкции для RNAi обычно содержит последовательность, которая настолько комплементарна последовательности антисмысловой нити, что две

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

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

[34] Для тех вариантов осуществления, в которых смысловая нить и антисмысловая

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

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

[36] Конструкции для RNAi могут содержать один нуклеотидный липкий конец на одном конце молекулы двухнитевой РНК и тупой конец на другом. Термин "тупой конец" означает, что смысловая нить и антисмысловая нить полностью спарены по основаниям на конце молекулы и что отсутствуют какие-либо неспаренные нуклеотиды, которые выступают за пределы дуплексного участка. В некоторых вариантах осуществления

конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити и тупой конец на 5'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце антисмысловой нити и тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и на 3'-конце смысловой нити. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит тупой конец на обоих концах молекулы двухнитевой РНК. В таких вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину, а дуплексный участок имеет такую же длину, как смысловая и антисмысловая нити (т. е. молекула является двухнитевой по всей ее длине).

[37] Длина каждой смысловой нити и антисмысловой нити может независимо составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, от приблизительно 18 до приблизительно 28 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 27 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов, от приблизительно 21 до приблизительно 25 нуклеотидов или от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина каждой смысловой нити и антисмысловой нити составляет приблизительно 18, приблизительно 19, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24 или приблизительно 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину, но образуют дуплексный участок, который короче данных нитей, поэтому конструкция для RNAi содержит два нуклеотидных липки конца. К примеру, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид, (ii) дуплексный участок, который имеет длину 19 пар оснований, и (iii) нуклеотидные липкие концы из 2 неспаренных нуклеотидов как на 3'-конце смысловой нити, так и на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 23 нуклеотида, (ii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований, и (iii) нуклеотидные липкие концы из 2 неспаренных нуклеотидов как на 3'-конце смысловой нити, так и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину и образуют дуплексный участок по всей их длине, поэтому на обоих липких концах двухнитевой молекулы отсутствуют нуклеотидные липкие концы. В одном таком варианте осуществления конструкция для RNAi имеет тупые концы и содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нити, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид, и (ii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований. В другом таком варианте осуществления конструкция для RNAi имеет тупые концы и содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 23 нуклеотида, и (ii) дуплексный участок, имеющий длину 23 пары оснований.

[38] В других вариантах осуществления смысловая нить или антисмысловая нить

длиннее другой нити, и при этом две нити образуют дуплексный участок, длина которого равна длине более короткой нити, поэтому конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить длиной 19 нуклеотидов, (ii) антисмысловую нить длиной 21 нуклеотид, (iii) дуплексный участок, имеющий длину 19 пар оснований, и (iv) один нуклеотидный липкий конец из 2 неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить длиной 21 нуклеотид, (ii) антисмысловую нить длиной 23 нуклеотида, (iii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований, и (iv) один нуклеотидный липкий конец из 2 неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

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

Модифицированные нуклеотиды

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

[41] В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды имеют модификацию рибозного сахара. Данные модификации сахара могут включать

модификации в 2'- и/или 5'-положении пентозного кольца, а также модификации бициклического сахара. Термин "2'-модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, имеющему пентозное кольцо с заместителем в положении 2', отличным от H или OH. Такие 2'-модификации включают без ограничения 2'-О-алкил (например, О-С1-С10 или О-С1-С10 замещенный алкил), 2'-О-аллил (О-CH₂CH=CH₂), 2'-С-аллил, 2'-фторо, 2'-О-метил (ОСН₃), 2'-О-метоксиэтил (О-(CH₂)₂ОСН₃), 2'-ОСF₃, 2'-О(CH₂)₂SCH₃, 2'-О-аминоалкил, 2'-амино (например, NH₂), 2'-О-этиламин и 2'-азидо. Модификации в 5'-положении пентозного кольца включают без ограничения 5'-метил (R или S); 5'-винил и 5'-метокси.

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

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

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

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

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

[47] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут также содержать одну или несколько модифицированных межнуклеотидных связей. Используемый в

данном документе термин "модифицированная межнуклеотидная связь" относится к межнуклеотидной связи, отличной от природной 3'-5'-фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой фосфорсодержащую межнуклеотидную связь, такую как сложную фосфотриэфирную, сложную аминокилфосфотриэфирную, алкилфосфонатную (например, метилфосфонатную, 3'-алкиленфосфонатную), фосфинатную, фосфорамидатную (например, 3'-аминофосфорамидатную и аминокилфосфорамидатную), фосфоротиаатную (P=S), хиралфосфоротиаатную, фосфородитиаатную, тионофосфорамидатную, тионоалкилфосфонатную, сложную атионоалкилфосфотриэфирную и боранофосфатную. В одном варианте осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой сложную 2'-5'-фосфодиэфирную связь. В других вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой нефосфорную межнуклеотидную связь и, таким образом, может упоминаться как модифицированная межнуклеозидная связь. Такие нефосфорсодержащие связи включают без ограничения морфолиновые связи (образованные частично из сахарной части нуклеозида); силоксановые связи (-O-Si(H)₂-O-); сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые связи; формацетильные и тиоформацетильные связи; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленметиляминовые (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-) и метиленигидразиновые связи; сульфонатные и сульфонамидные связи; амидные связи и другие, имеющие смешанные составные части, содержащие N, O, S и CH₂. В одном варианте осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой пептидную связь (например, аминоктилглицин) для создания пептидной нуклеиновой кислоты или PNA, такой как описанной в патентах США №№ 5539082; 5714331 и 5719262. Другие подходящие модифицированные межнуклеотидные и межнуклеозидные связи, которые могут быть использованы в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патенте США № 6693187, патенте США № 9181551, в публикации патента США № 2016/0122761 и у Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, Vol. 19: 937-954, 2012, при этом все они включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[48] В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат одну или несколько фосфоротиаатных межнуклеотидных связей. Фосфоротиаатные межнуклеотидные связи могут присутствовать в смысловой нити, антисмысловой нити или в обеих нитях конструкции для RNAi. К примеру, в некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиаатных межнуклеотидных связей. В других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиаатных межнуклеотидных связей. В дополнительных вариантах осуществления обе нити содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфоротиаатных межнуклеотидных связей. Конструкции для RNAi могут содержать одну или больше фосфоротиаатных межнуклеотидных связей на 3'-конце, 5'-конце, или как на 3'-, так и на 5'-концах смысловой нити, антисмысловой нити или обеих

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

[49] В ряде вариантов осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец, два или более неспаренных нуклеотида в составе липкого конца могут быть соединены посредством фосфоротиоатной межнуклеотидной связи. В определенных вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в нуклеотидном липком конце на 3'-конце антисмысловой нити и/или смысловой нити соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями. В других вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в нуклеотидном липком конце на 5'-конце антисмысловой нити

и/или смысловой нити соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями. В еще одних дополнительных вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в любом нуклеотидном липком конце соединены фосфоротиоатными межнуклеотидными связями.

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

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

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

[53] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему

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

[54] Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, могут иметь более одной химической модификации из описанных в данном документе. Например, модифицированный нуклеотид может иметь модификацию рибозного сахара, а также модификацию нуклеинового основания. В качестве примера модифицированный нуклеотид может содержать 2'-модификацию сахара (например, 2'-фтор и 2'-метил) и содержать модифицированное основание (например, 5-метилцитозин или псевдоурацил). В других вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара в сочетании с модификацией 5'-фосфата, при этом когда модифицированный нуклеотид будет включен в полинуклеотид, образуется модифицированная межнуклеотидная или межнуклеозидная связь. Например, в некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара, такую как 2'-фтор-модификация, 2'-О-метил-модификация или бициклическая модификация сахара, а также 5'-фосфоротиоатную группу. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления одна или обе нити конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат комбинацию 2'-модифицированных нуклеотидов или BNA и фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В определенных вариантах осуществления как смысловые, так и антисмысловые нити конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат комбинацию 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов и фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. Иллюстративные конструкции для RNAi, содержащие модифицированные нуклеотиды и межнуклеотидные связи, показаны в таблице 2.

Функция конструкции для RNAi

[55] Предпочтительно конструкции для RNAi по настоящему изобретению снижают или подавляют экспрессию PNPLA3 в клетках, в частности в клетках печени.

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

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

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

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

[59] В определенных вариантах осуществления экспрессия PNPLA3 снижена в клетках печени на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 15%, на по меньшей мере 20%, на по меньшей мере 25%, на по меньшей мере 30%, на по меньшей мере 35%, на по меньшей мере 40%, на по меньшей мере 45% или на по меньшей мере 50% за счет воздействия конструкции для RNAi по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления экспрессия PNPLA3 снижена в клетках печени на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 75%, на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 85% за счет воздействия конструкции для RNAi по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления экспрессия PNPLA3 снижена в клетках печени на приблизительно 90% или больше, например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше за счет воздействия конструкции для RNAi по настоящему изобретению. Процент снижения экспрессии PNPLA3 можно измерять при помощи любых способов, описанных в данном документе, а также других способов, известных в данной области. К примеру, в определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 45% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках Hep3B (содержащих PNPLA3 дикого типа) *in vitro*. В связанных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70% или на по меньшей мере 75% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках Hep3B *in vitro*. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере

мере 96% или на по меньшей мере 98% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках Hep3B *in vitro*. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 45% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках HepG2 (содержащих два минорных аллеля PNPLA3-rs738409-rs738408) *in vitro*. В связанных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70% или на по меньшей мере 75% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках HepG2 *in vitro*. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 96% или на по меньшей мере 98% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в клетках HepG2 *in vitro*. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 45% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека *in vitro*. В связанных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 55%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 65%, на по меньшей мере 70% или на по меньшей мере 75% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека *in vitro*. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению на по меньшей мере 80%, на по меньшей мере 85%, на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 96% или на по меньшей мере 98% подавляют экспрессию PNPLA3 при концентрации 5 нМ в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека *in vitro*. Снижение PNPLA3 можно измерять с использованием различных методик, в том числе RNA FISH или капельной цифровой ПЦР, как это описано в примерах 2 и 3.

[60] В некоторых вариантах осуществления значение IC₅₀ рассчитывается для оценки способности конструкции для RNAi по настоящему изобретению подавлять экспрессию PNPLA3 в клетках печени. Термин "значение IC₅₀" означает дозу/концентрацию, необходимую для достижения 50% подавления биологической или биохимической функции. Значение IC₅₀ для любого конкретного вещества или антагониста можно определить путем построения кривой зависимости "доза-ответ" и изучения влияния различных концентраций вещества или антагониста на уровни экспрессии или функциональную активность, определяемые в любом анализе. Значения IC₅₀ можно рассчитать для данного антагониста или вещества путем определения концентрации, необходимой для подавления половины максимального биологического ответа или половины уровней нативной экспрессии. Таким образом, значение IC₅₀ для любой конструкции для RNAi может быть рассчитано путем определения концентрации конструкции для RNAi, необходимой, чтобы подавить половину уровня нативной

экспрессии PNPLA3 в клетках печени (например, уровня экспрессии PNPLA3 в контрольных клетках печени) в любом анализе, таком как иммуноанализ, или анализ RNA FISH, или анализ с помощью капельной цифровой ПЦР, которые описаны в примерах. Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут подавлять экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, в клетках Hep3B) со значением IC50, составляющим менее приблизительно 20 нМ. Например, конструкции для RNAi подавляют экспрессию PNPLA3 в клетках печени со значением IC50, составляющим от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 20 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5 нМ или от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 1 нМ. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, клетках Hep3B) со значением IC50, составляющим от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 нМ. Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут подавлять экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, в клетках HepG2) со значением IC50, составляющим менее приблизительно 20 нМ. Например, конструкции для RNAi подавляют экспрессию PNPLA3 в клетках печени со значением IC50, составляющим от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 20 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5 нМ или от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 1 нМ. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, клетках HepG2) со значением IC50, составляющим от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 нМ. Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут подавлять экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека) со значением IC50, составляющим менее приблизительно 20 нМ. Например, конструкции для RNAi подавляют экспрессию PNPLA3 в клетках печени со значением IC50, составляющим от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 20 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 5 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 1 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5 нМ или от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 1 нМ. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках печени (например, в трансфицированных клетках CHO, экспрессирующих PNPLA3 I148I или I148M человека) со значением IC50, составляющим от приблизительно 1 нМ до приблизительно 10 нМ.

[61] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению можно легко получить с использованием методик, известных в данной области, например, с использованием

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

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

[63] 2'-О-силильную группу можно удалить посредством воздействия фторид-ионов, которые могут представлять собой любой источник фторид-иона, например, те соли, которые содержат фторид-ион в сочетании с неорганическими противоионами, например фторид цезия и фторид калия, или те соли, которые содержат фторид-ион в паре с органическим противоионом, например тетраалкиламмонийфторидом. В реакции снятия защиты можно использовать краун-эфирный катализатор в комбинации с неорганическим фторидом. Предпочтительным источником фторид-иона являются тетрабутиламмонийфторид или аминокислотфториды (например, объединение водного HF с триэтиламином в диполярном апротонном растворителе, например, диметилформамиде).

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

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

[66] В стандартной реакции связывания фосфорамидита можно использовать тетразольные катализаторы. Предпочтительные катализаторы включают, например, тетразол, S-этил-тетразол, бензилтиотетразол, нитрофенилтетразол.

[67] Специалисту в данной области понятно, что дополнительные способы синтеза конструкций для RNAi, описанные в данном документе, будут очевидны специалистам в

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

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

[69] Лиганд может включать белок сыворотки крови (например, человеческий сывороточный альбумин, липопротейн низкой плотности, глобулин), фрагмент холестерина, витамин (биотин, витамин Е, витамин В12), фолатный фрагмент, стероид, желчную кислоту (например, холевую кислоту), жирную кислоту (например, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту), углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту), гликозид, фосфолипид или антитело или его связывающий фрагмент (например, антитело или связывающий фрагмент, который нацеливает конструкцию для RNAi на конкретный тип клеток, такой как клетки печени). Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие агенты (например, акридины), перекрестносшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, адамантануксусную кислоту, 1-пиренбутировую кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, 03-(олеоил)литохолевую кислоту, 03-

(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин), пептиды (например, пептид antennapedia), пептид Tat, пептиды RGD), алкилирующие средства, полимеры, такие как полиэтиленгликоль (PEG)(например, PEG-40K), полиаминокислоты и полиамины (например, спермин, спермидин).

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

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

[72] Принимая во внимание, что PNPLA3 экспрессируется в клетках печени (например, в гепатоцитах), в определенных вариантах осуществления желательно специфично доставлять конструкцию для RNAi именно в эти клетки печени. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi могут быть специфично нацелены на печень путем использования лигандов, которые связываются или взаимодействуют с

белками, экспрессируемыми на поверхности клеток печени. Например, в определенных вариантах осуществления лиганды могут содержать антигенсвязывающие белки (например, антитела или их связывающие фрагменты (например, Fab, scFv)), которые специфически связываются с рецептором, экспрессируемым на гепатоцитах.

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

[74] В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит гексозу или гексозамин. Гексоза может быть выбрана из глюкозы, галактозы, маннозы, фукозы или фруктозы. Гексозамин может быть выбран из фруктозамина, галактозамина, глюкозамина или маннозамина. В определенных вариантах осуществления лиганд содержит глюкозу, галактозу, галактозамин или глюкозамин. В одном варианте осуществления лиганд содержит глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин. В другом варианте осуществления лиганд содержит галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин. В конкретных вариантах осуществления лиганд содержит N-ацетилгалактозамин. Лиганды, содержащие глюкозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин (GalNAc), особенно эффективны в нацеливании соединений на клетки печени. Смотрите, например, D'Souza and Devarajan, J. Control Release, Vol. 203: 126-139, 2015. Примеры GalNAc- или галактозосодержащих лигандов, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патентах США №№ 7491805; 8106022 и 8877917; в публикации патента США № 20030130186 и публикации WIPO № WO2013166155, которые все включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[75] В определенных вариантах осуществления лиганд содержит мультивалентный углеводный фрагмент. Используемый в данном документе термин "мультивалентный углеводный фрагмент" относится к фрагменту, содержащему два или более углеводных звеньев, способных независимо связываться или взаимодействовать с другими молекулами. Например, мультивалентный углеводный фрагмент содержит два или более связывающих домена, состоящих из углеводов, которые могут связываться с двумя или более различными молекулами или двумя или более различными участками на одной и той же молекуле. Валентность углеводного фрагмента обозначает количество отдельных

связывающих доменов в углеводном фрагменте. К примеру, термины "одновалентный", "двухвалентный", "трехвалентный" и "четыревалентный", относящиеся к углеводному фрагменту, относятся к углеводным фрагментам с одним, двумя, тремя и четырьмя связывающими доменами соответственно. Мультивалентный углеводный фрагмент может содержать мультивалентный лактозный фрагмент, мультивалентный галактозный фрагмент, мультивалентный глюкозный фрагмент, мультивалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент, мультивалентный N-ацетилглюкозаминовый фрагмент, мультивалентный маннозный фрагмент или мультивалентный фукозный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит мультивалентный галактозный фрагмент. В других вариантах осуществления лиганд содержит мультивалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент. В этих и других вариантах осуществления мультивалентный углеводный фрагмент является двухвалентным, трехвалентным или четырехвалентным. В таких вариантах осуществления мультивалентный углеводный фрагмент может быть двухантенным или трехантенным. В одном конкретном варианте осуществления мультивалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент является трехвалентным или четырехвалентным. В другом конкретном варианте осуществления мультивалентный галактозный фрагмент является трехвалентным или четырехвалентным. Иллюстративные трехвалентные и четырехвалентные GalNAc-содержащие лиганды для встраивания в конструкции для RNAi по настоящему изобретению подробно описаны ниже.

[76] Лиганд может быть присоединен или конъюгирован с молекулой РНК конструкции для RNAi непосредственно или опосредованно. К примеру, в некоторых вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен непосредственно к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi. В других вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен через линкер к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi. Лиганд может быть присоединен к нуклеиновым основаниям, сахарным фрагментам или межнуклеотидным связям полинуклеотидов (например, смысловой нити или антисмысловой нити) конструкции для RNAi по настоящему изобретению. Конъюгирование или присоединение к пуриновым нуклеиновым основаниям или их производным может происходить в любом положении, включая эндоциклические и экзоциклические атомы. В определенных вариантах осуществления 2-, 6-, 7- или 8-положения пуринового нуклеинового основания присоединены к лиганду. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными или присоединение к ним также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания могут быть присоединены к лиганду. Конъюгация с сахарными фрагментами нуклеотидов или присоединение к ним может происходить при любом атоме углерода. Иллюстративные атомы углерода сахарного фрагмента, которые могут быть присоединены к лиганду, включают атомы углерода в положениях 2', 3' и 5'. Атом в положении 1' также может быть присоединен к лиганду, такому как остаток основания.

Межнуклеотидные связи также могут поддерживать прикрепление лиганда. В случае фосфорсодержащих связей (например, сложной фосфодиефирной, фосфоротиоатной, фосфородитиоатной, фосфоамидатной и т.п.) лиганд может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. В случае аминокислотных или амидных межнуклеотидных связей (например, RNA) лиганд может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

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

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

кислоту, тиол, ненасыщенные группы (например, двойные или тройные связи) и им подобные.

[79] Линкеры, которые можно использовать для присоединения лиганда к смысловой или антисмысловой нити в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, включают без ограничения пирролидин, 8-амино-3,6-ди-оксооктановую кислоту, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат, 6-аминогексановую кислоту, замещенный C1-C10алкил, замещенный или незамещенный C2-C10алкенил или замещенный или незамещенный C2-C10алкинил. Предпочтительные группы заместителей для таких линкеров включают без ограничения гидроксил, амина, алкокси, карбокси, бензил, фенил, нитро, тиол, тиоалкокси, галоген, алкил, арил, алкенил и алкинил.

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

[81] Расщепляемые линкеры чувствительны к факторам расщепления, например к значению pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию деструктивных молекул. Как правило, расщепляющие средства более распространены или обнаруживаются при более высоких уровнях или активности внутри клеток, чем в сыворотке крови или в цельной крови. Примеры таких деструктивных средств включают: окислительно-восстановительные средства, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичности, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать окислительно-восстановительный расщепляемый линкер путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые приводят к pH пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемый кислотой линкер, действуя как обычная кислота, пептидазы (которые могут быть специфичными для субстрата) и фосфатазы.

[82] Расщепляемый линкер может содержать фрагмент, который чувствителен к pH. Значение pH сыворотки крови составляет 7,4, в то время как среднее внутриклеточное pH немного ниже, находясь в пределах, составляющих приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы имеют более кислое значение pH в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы имеют еще более кислое значение pH, составляющее приблизительно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь

расщепляемую группу, которая расщепляется при предпочтительном pH, высвобождая таким образом молекулу РНК от лиганда внутри клетки или в требуемый компартмент клетки.

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

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

[85] В других вариантах осуществления используют редокс-расщепляемые линкеры. Редокс-расщепляемые линкеры расщепляются при окислении или восстановлении. Примером восстановительно-расщепляемой группы является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли кандидатный расщепляемый линкер подходящим "восстановительно-расщепляемым линкером" или, например, подходит ли он для использования с определенной конструкцией для RNAi и с определенным лигандом, можно использовать одну или несколько методик, описанных в данном документе. Например, кандидатный линкер можно оценить путем инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстановителем, известным в данной области, который имитирует скорость расщепления, которая наблюдается в клетке, например в клетке-мишени. Кандидатные линкеры также можно оценивать в условиях, выбранных

для имитации условий, протекающих в крови или в сыворотке крови. В конкретном варианте осуществления кандидатные линкеры расщепляются в крови не более чем на 10%. В других вариантах осуществления применимые кандидатные линкеры расщепляются в по меньшей мере 2, 4, 10, 20, 50, 70 или 100 раз быстрее внутри клетки (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

[86] В еще одних дополнительных вариантах осуществления расщепляемые линкеры на основе фосфатов расщепляются средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое гидролизует фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как внутриклеточные фосфатазы. Примерами расщепляемых групп на основе фосфатов являются $-O-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(SRk)-O-$, $-S-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(ORk)-S-$, $-S-P(O)(ORk)-S-$, $-O-P(S)(ORk)-S-$, $-S-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(Rk)-O-$, $-O-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-O-$, $-S-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-S-$, $-O-P(S)(Rk)-S-$. Конкретные варианты осуществления включают $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-SP(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$. Другим конкретным вариантом осуществления является $-O-P(O)(OH)-O-$. Данные кандидатные линкеры могут быть оценены с использованием методик, аналогичных описанным выше.

[87] В других вариантах осуществления линкеры могут содержать кислотно-расщепляемые группы, которые представляют собой группы, расщепляемые в кислых условиях. В некоторых вариантах осуществления кислотно-расщепляемые группы расщепляются в кислой среде со значением pH, составляющим приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже), или средствами, такими как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить среду для расщепления кислотно-расщепляемых групп. Примеры кислотно-расщепляемых связывающих групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислотно-расщепляемые группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. Конкретным вариантом осуществления является случай, когда углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметил, пентил или трет-бутил. Данные кандидатные группы могут быть оценены с использованием методик, аналогичных описанным выше.

[88] В других вариантах осуществления линкеры могут содержать расщепляемые группы на основе сложных эфиров, которые расщепляются ферментами, такими как внутриклеточные эстеразы и амидазы. Примеры расщепляемых сложноэфирных групп включают без ограничения сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Расщепляемые сложным эфиром группы имеют общую формулу -

C(O)O- или -OC(O) -. Данные кандидатные линкеры могут быть оценены с использованием методик, аналогичных описанным выше.

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

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

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

[92] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть доставлены в клетку или ткань, представляющие интерес, путем введения вектора, который кодирует и контролирует внутриклеточную экспрессию конструкции для RNAi. Термин "вектор" (также упоминаемый в данном документе как "вектор экспрессии") относится к композиции вещества, которая может быть использована для доставки представляющей интерес нуклеиновой кислоты внутрь клетки.

Из уровня техники известны многочисленные векторы, включая без ограничения линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, а также плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Примеры вирусных векторов включают без ограничения аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, ретровирусные векторы и им подобные. Вектор может реплицироваться в живой клетке или может быть получен синтетическим путем.

[93] В общих чертах вектор для экспрессии конструкции для RNAi по настоящему изобретению будет содержать один или несколько промоторов, функционально связанных с последовательностями, кодирующими конструкцию для RNAi. Используемые в данном документе выражения "функционально связанный" или "под контролем транскрипции" означают, что промотор находится в правильном положении и правильной ориентации относительно полинуклеотидной последовательности, чтобы контролировать инициацию транскрипции РНК-полимеразой и экспрессию полинуклеотидной последовательности. Термин "промотор" относится к последовательности, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки, или к введенному синтетическому аппарату, необходимому для инициации специфической транскрипции последовательности гена. Подходящие промоторы включают без ограничения RNA pol I, pol II, III или U6 RNA pol III, а также вирусные промоторы (например, промотор немедленно-раннего гена цитомегаловируса человека (CMV), ранний промотор SV40 и длинный кольцевой повтор вируса саркомы Рауса). В некоторых вариантах осуществления предпочтительным является промотор III или U6RNA pol III. Промотор может быть тканеспецифичным или индуцируемым промотором. Особый интерес представляют специфичные для печени промоторы, такие как промоторные последовательности гена альфа-1-антитрипсина человека, гена альбумина, гена гемопексина и гена липазы печени. Индуцируемые промоторы включают промоторы, регулируемые экдизоном, эстрогеном, прогестероном, тетрациклином и изопропил-PD1-тиогалактопиранозидом (IPTG).

[94] В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит siRNA, две отдельные нити (смысловая и антисмысловая нити) могут экспрессироваться с одного вектора или из двух отдельных векторов. Например, в одном варианте осуществления последовательность, кодирующая смысловую нить, функционально связана с промотором на первом векторе, а последовательность, кодирующая антисмысловую нить, функционально связана с промотором на втором векторе. В таком варианте осуществления первый и второй векторы вводят совместно, например путем инфекции или трансфекции, в клетку-мишень, так что смысловая и антисмысловая нити после прохождения транскрипции будут гибридизоваться внутри клетки с образованием молекулы siRNA. В другом варианте осуществления смысловая и антисмысловая нити транскрибируются с двух разных промоторов, расположенных в одном векторе. В некоторых таких вариантах осуществления последовательность, кодирующая смысловую нить, функционально связана с первым промотором, а

последовательность, кодирующая антисмысловую нить, функционально связана со вторым промотором, при этом первый и второй промоторы расположены в одном векторе. В одном варианте осуществления вектор содержит первый промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей молекулу siRNA, и второй промотор, функционально связанный с той же последовательностью в противоположном направлении, так что транскрипция последовательности из первого промотора приводит к синтезу смысловой нити молекулы siRNA, а транскрипция последовательности из второго промотора приводит к синтезу антисмысловой нити молекулы siRNA.

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

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

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

[98] В настоящее изобретение также включены фармацевтические композиции и составы, содержащие описанные в данном документе конструкции для RNAi и фармацевтически приемлемые носители, наполнители или разбавители. Такие

композиции и составы применимы в снижении экспрессии PNPLA3 у нуждающегося в этом субъекта. Когда предполагается применение в клинической практике, фармацевтические композиции и составы будут производиться в форме, подходящей для предполагаемого применения. В целом это предусматривает получение композиций, которые по сути не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для людей или животных.

[99] Фразы "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель" включает растворители, буферы, растворы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и им подобные, приемлемые для использования в составлении фармацевтических препаратов, как, например, фармацевтических препаратов, подходящих для введения людям. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство несовместимы с конструкциями для RNAi по настоящему изобретению, предполагается их применение в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции, при условии, что они не инактивируют векторы или конструкции для RNAi в данных композициях.

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

[101] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество описанной в данном документе конструкции для RNAi. Термин "эффективное количество" означает количество, достаточное для получения полезного или желаемого клинического результата. В некоторых вариантах

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

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

[103] Введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно осуществлять любым традиционным способом, если целевая ткань доступна при этом способе введения. Такие способы введения включают без ограничения парентеральный (например, подкожный, внутримышечный, внутривенный),

оральный, назальный, буккальный, внутрикожный, трансдермальный и сублингвальный способы или путем прямой инъекции в ткань печени или доставки через печеночную портальную вену. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально. К примеру, в определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно.

[104] Коллоидные дисперсионные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии типа "масло в воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы, могут использоваться в качестве средств доставки конструкций для RNAi по настоящему изобретению или векторов, кодирующих такие конструкции. Коммерчески доступные жировые эмульсии, которые подходят для доставки нуклеиновых кислот по изобретению, включают Intralipid®, Liposyn®, Liposyn®II, Liposyn®III, Nutrilipid и другие подобные липидные эмульсии. Предпочтительной коллоидной системой, предназначенной для использования в качестве средства для доставки *in vivo*, является липосома (т. е. везикула с искусственной мембраной). Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать комплексы с ними, в частности с катионными липосомами. В качестве альтернативы конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтаноламин) (DOPE), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC)), дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеилфосфатидилэтаноламин (DOTMA)) липиды и липосомы. Получение и использование таких коллоидных дисперсионных систем хорошо известны из уровня техники. Иллюстративные составы также раскрыты в патенте США № 5981505; патенте США № 6217900; в патенте США № 6383512; патенте США № 5783565; патенте США № 7202227; патенте США № 6379965; патенте США № 6127170; патенте США № 5837533; патенте США № 6747014 и W003/093449.

[105] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению полностью инкапсулированы в липидный состав, например, для образования SPLP, pSPLP, SNALP или других частиц типа "нуклеиновая кислота-липид". Используемый в данном документе термин "SNALP" относится к стабильной частице типа "нуклеиновая кислота-липид", включая SPLP. Используемый в данном документе термин "SPLP" относится к частице типа "нуклеиновая кислота-липид", которая содержит плазмидную ДНК, инкапсулированную в липидную везикулу. SNALP и SPLP обычно содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). SNALP и SPLP исключительно полезны для системных применений, поскольку после внутривенного введения они

демонстрируют увеличенное время циркуляции в кровотоке и накапливаются в удаленных участках (например, физически отделенных от участка введения). SPLP включают "pSPLP", которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующего средства и нуклеиновой кислоты, как изложено в публикации по РСТ № WO00/03683. Частицы типа "нуклеиновая кислота-липид" обычно имеют средний диаметр, составляющий от приблизительно 50 нМ до приблизительно 150 нМ, от приблизительно 60 нМ до приблизительно 130 нМ, от приблизительно 70 нМ до приблизительно 110 нМ или от приблизительно 70 нМ до приблизительно 90 нМ, и по сути они не токсичны. Кроме того, когда нуклеиновые кислоты присутствуют в частицах типа "нуклеиновая кислота-липид", в водном растворе они являются устойчивыми к деградации нуклеазой. Частицы типа "нуклеиновая кислота-липид" и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432 и публикации заявки по РСТ № WO96/40964.

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

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

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

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

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

[110] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению упакованы или хранятся в устройстве для введения. Устройства для введения инъекционных составов включают без ограничения порт-системы для инъекций, предварительно заполненные шприцы, автоматические инъекторы, инъекционные помпы, нателные инъекторы и шприцы-ручки. Устройства для введения

аэрозольных или порошковых составов включают без ограничения ингаляторы, инсуффляторы, аспираторы и т. п. Таким образом, в настоящее изобретение включены устройства для введения, содержащие фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для лечения или профилактики одного или нескольких нарушений, описанных в данном документе.

Способы подавления экспрессии PNPLA3

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

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

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

[114] В одном варианте осуществления приведение клетки в контакт с RNAi включает "введение" или "доставку средства для RNAi в клетку" путем облегчения или осуществления захвата клеткой или путем абсорбции внутрь клетки. Абсорбция или захват средства для RNAi может происходить в результате неконтролируемых диффузионных или активных клеточных процессов, либо посредством вспомогательных средств или устройств. Введение средства для RNAi в клетку может быть осуществлено *in vitro* и/или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* RNAi можно вводить в участок ткани или вводить системно. Введение в клетку *in vitro* включает способы, известные в данной области, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в

данном документе ниже и/или известны из уровня техники.

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

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

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

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

приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%.

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

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

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

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

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

[123] Уровень мРНК PNPLA3, который экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей в крови мРНК PNPLA3 могут быть определены с использованием любой методики, известной в данной области, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии PNPLA3 в образце

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

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

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

[126] Альтернативный способ определения экспрессии PNPLA3 в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты и/или действия обратной транскриптазой (для получения кДНК), например мРНК в образце, например, при помощи ПЦР с обратной транскрипцией (экспериментальный вариант осуществления изложен у Mullis, 1987, патент США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878), системы транскрипционной

амплификации (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q-бета репликазы (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6: 1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033) или любого другого способа амплификации нуклеиновых кислот с последующим выявлением амплифицированных молекул с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области. Эти схемы выявления особенно полезны для выявления молекул нуклеиновых кислот, когда такие молекулы присутствуют в очень небольших количествах. В конкретных аспектах изобретения уровень экспрессии PNPLA3 определяют с помощью количественной флуорогенной ПЦР с обратной транскрипцией (т. е. системы TaqMan™). Мониторинг уровней экспрессии мРНК PNPLA3 можно проводить с использованием мембранного блоттинга (такого как используемый в гибридизационном анализе, например, нозерн-блоттинг, блоттинг по Саузерну, дот-блоттинг и т. п.) или микролунок, пробирок для образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). Смотрите патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровней экспрессии PNPLA3 может также включать использование зондов нуклеиновых кислот в растворе.

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

[128] Уровень экспрессии белка PNPLA3 может быть определен с использованием любого способа, известного в данной области, для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, жидкостные или гелевые реакции преципитации в жидкости или в геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одинарную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминесцентные анализы и т. п.

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

[130] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту таким образом, что средство для RNAi поступает в

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

Способы лечения или предотвращения заболеваний, ассоциированных с PNPLA3

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

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

[133] Способы по настоящему изобретению применимы для лечения субъекта с заболеванием, ассоциированным с PNPLA3, например, субъекта, который может получить пользу от снижения экспрессии гена PNPLA3 и/или продуцирования белка PNPLA3. В одном аспекте настоящего изобретения представлены способы снижения уровня экспрессии гена, кодирующего белок 3, содержащий пататин-подобный фосфолипазный

домен (PNPLA3), у субъекта с неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы снижения уровня белка PNPLA3 у субъекта с NAFLD. В настоящем изобретении также представлены способы снижения уровня активности сигнального пути hedgehog у субъекта с NAFLD.

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

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

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

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

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

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

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

[141] Введение dsRNA в соответствии со способами и вариантами применения по настоящему изобретению может привести к снижению тяжести, признаков, симптомов и/или уровня маркеров заболеваний или нарушений у пациента с заболеванием, ассоциированным с PNPLA3, например неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). Под "снижением" в данном контексте подразумевается статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, или приблизительно 100%. Эффективность лечения или предотвращения заболевания можно оценить, например, путем измерения

прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимого для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, соответствующего данному заболеванию, которое лечат или которое пытаются нацеленно предотвратить. Специалист в данной области вполне способен контролировать эффективность лечения или предотвращения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения NAFLD можно оценивать, например, путем периодического мониторинга симптомов NAFLD, уровней жира в печени или экспрессии генов, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов. Сравнение более поздних показаний с первоначальными показаниями предоставляет врачу указание на то, является ли лечение эффективным. Специалист в данной области вполне способен контролировать эффективность лечения или предотвращения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением средства для RNAi, целенаправленно воздействующего на PNPLA3, или его фармацевтической композиции "эффективность относительно" заболевания, ассоциированного с PNPLA3, указывает на то, что введение клинически приемлемым образом приводит к положительному эффекту для по меньшей мере статистически значимой доли пациентов, например, к улучшению симптомов, излечению, снижению тяжести заболевания, продлению жизни, улучшению качества жизни или к другому эффекту, который является общепризнанно положительным среди врачей, знакомых с лечением NAFLD и/или заболевания, ассоциированного с PNPLA3 и связанных с ним причин.

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

[143] Субъектам может быть введено терапевтическое количество средства для RNAi, как, например, приблизительно 0,01 мг/кг, 0,02 мг/кг, 0,03 мг/кг, 0,04 мг/кг, 0,05 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,15 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,35 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,45 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,55 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,65 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,75 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,85 мг/кг, 0,9 мг/кг, 0,95 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг, 2,0 мг/кг, 2,1 мг/кг, 2,2 мг/кг, 2,3 мг/кг, 2,4 мг/кг, 2,5 мг/кг

dsRNA, 2,6 мг/кг dsRNA, 2,7 мг/кг dsRNA, 2,8 мг/кг dsRNA, 2,9 мг/кг dsRNA, 3,0 мг/кг dsRNA, 3,1 мг/кг dsRNA, 3,2 мг/кг dsRNA, 3,3 мг/кг dsRNA, 3,4 мг/кг dsRNA, 3,5 мг/кг dsRNA, 3,6 мг/кг dsRNA, 3,7 мг/кг dsRNA, 3,8 мг/кг dsRNA, 3,9 мг/кг dsRNA, 4,0 мг/кг dsRNA, 4,1 мг/кг dsRNA, 4,2 мг/кг dsRNA, 4,3 мг/кг dsRNA, 4,4 мг/кг dsRNA, 4,5 мг/кг dsRNA, 4,6 мг/кг dsRNA, 4,7 мг/кг dsRNA, 4,8 мг/кг dsRNA, 4,9 мг/кг dsRNA, 5,0 мг/кг dsRNA, 5,1 мг/кг dsRNA, 5,2 мг/кг dsRNA, 5,3 мг/кг dsRNA, 5,4 мг/кг dsRNA, 5,5 мг/кг dsRNA, 5,6 мг/кг dsRNA, 5,7 мг/кг dsRNA, 5,8 мг/кг dsRNA, 5,9 мг/кг dsRNA, 6,0 мг/кг dsRNA, 6,1 мг/кг dsRNA, 6,2 мг/кг dsRNA, 6,3 мг/кг dsRNA, 6,4 мг/кг dsRNA, 6,5 мг/кг dsRNA, 6,6 мг/кг dsRNA, 6,7 мг/кг dsRNA, 6,8 мг/кг dsRNA, 6,9 мг/кг dsRNA, 7,0 мг/кг dsRNA, 7,1 мг/кг dsRNA, 7,2 мг/кг dsRNA, 7,3 мг/кг dsRNA, 7,4 мг/кг dsRNA, 7,5 мг/кг dsRNA, 7,6 мг/кг dsRNA, 7,7 мг/кг dsRNA, 7,8 мг/кг dsRNA, 7,9 мг/кг dsRNA, 8,0 мг/кг dsRNA, 8,1 мг/кг dsRNA, 8,2 мг/кг dsRNA, 8,3 мг/кг dsRNA, 8,4 мг/кг dsRNA, 8,5 мг/кг dsRNA, 8,6 мг/кг dsRNA, 8,7 мг/кг dsRNA, 8,8 мг/кг dsRNA, 8,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 9,1 мг/кг dsRNA, 9,2 мг/кг dsRNA, 9,3 мг/кг dsRNA, 9,4 мг/кг dsRNA, 9,5 мг/кг dsRNA, 9,6 мг/кг dsRNA, 9,7 мг/кг dsRNA, 9,8 мг/кг dsRNA, 9,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 10 мг/кг dsRNA, 15 мг/кг dsRNA, 20 мг/кг dsRNA, 25 мг/кг dsRNA, 30 мг/кг dsRNA, 35 мг/кг dsRNA, 40 мг/кг dsRNA, 45 мг/кг dsRNA или приблизительно 50 мг/кг dsRNA. В одном варианте осуществления субъектам можно вводить 0,5 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также рассматриваются как часть данного изобретения.

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

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

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

[147] Средство для RNAi по настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме, где модифицированное или немодифицированное средство для RNAi непосредственно суспендировано в водном или подходящем буферном растворителе в

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

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

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

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

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

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

[153] В определенных вариантах осуществления первое средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген PNPLA3, вводят в комбинации со вторым средством для RNAi, целенаправленно воздействующим на другую часть гена PNPLA3. Например, первое средство для RNAi содержит первую смысловую нить и первую

антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где по сути все нуклеотиды указанной первой смысловой нити и по сути все нуклеотиды первой антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, где указанная первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; а второе средство для RNAi содержит вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где по сути все нуклеотиды второй смысловой нити и по сути все нуклеотиды второй антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, где вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

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

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

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

PNPLA3, и второе средство для RNAi, целенаправленно воздействующее на ген, отличающийся от гена PNPLA3, например на ген SCAP, могут быть введены как части разных фармацевтических композиций.

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

[158] В настоящем изобретении также представлены способы применения средства для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство для RNAi по настоящему изобретению, для снижения и/или подавления экспрессии PNPLA3 в клетке. В других аспектах настоящего изобретения представлены средство для RNAi по настоящему изобретению и/или композиция, содержащая средство для RNAi по настоящему изобретению, для применения с целью снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3 в клетке. В еще одних аспектах представлено применение средства RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство для RNAi по настоящему изобретению, или изготовление лекарственного препарата для снижения и/или подавления экспрессии гена PNPLA3 в клетке. В других аспектах настоящего изобретения представлены средство для RNAi по настоящему изобретению и/или композиция, содержащая средство для RNAi по настоящему изобретению, для применения в снижении и/или подавлении продуцирования белка PNPLA3 в клетке. В еще одних аспектах представлено применение средства для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей RNAi по настоящему изобретению, для изготовления лекарственного препарата для снижения и/или подавления продуцирования белка PNPLA3 в клетке. Способы и варианты применения включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например dsRNA, по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения деградации транскрипта мРНК гена PNPLA3, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена PNPLA3 или подавление продуцирования белка PNPLA3 в клетке.

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

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

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

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

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

[164] Способы и варианты применения *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей средство для RNAi, где средство для RNAi включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена PNPLA3 млекопитающего, подлежащего лечению. Когда организм, подлежащий лечению, представляет собой организм человека, композицию можно вводить любым способом, известным в данной области, включая без ограничения подкожный, внутривенный, пероральный, внутривентриальный или парентеральный пути, включая внутримозговой путь введения (например, внутримозговой, интрапаренхиматозный и интратекальный), внутримышечное, трансдермальное, введение через дыхательные пути (аэрозоль), назальное, ректальное и местное (включая буккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах

осуществления композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции. В одном варианте осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции.

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

[166] В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекционной помпы. Помпа может представлять собой внешнюю помпу или хирургически имплантированную помпу. В определенных вариантах осуществления помпа представляет собой подкожно имплантированную осмотическую помпу. В других вариантах осуществления помпа представляет собой инфузионную помпу. Инфузионную помпу можно использовать для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионная помпа представляет собой подкожную инфузионную помпу. В других вариантах осуществления помпа представляет собой хирургически имплантированную помпу, которая осуществляет доставку средства для RNAi субъекту.

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

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

[169] Способы и варианты применения включают введение млекопитающему, например человеку, композиции, содержащей средство для RNAi, например, dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген PNPLA3 в клетке млекопитающего, и

поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для достижения деградации транскрипта мРНК гена PNPLA3, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена PNPLA3 у млекопитающего.

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

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

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

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

[174] Соответственно, последовательности нуклеиновых кислот, представленные в данном документе, включающие без ограничения те, которые указаны в перечне последовательностей, предназначены для охвата нуклеиновых кислот, содержащих любую комбинацию природной или модифицированной РНК и/или ДНК, включая без

ограничения такие нуклеиновые кислоты, имеющие модифицированные нуклеиновые основания. В качестве дополнительного примера и без ограничения полинуклеотид, имеющий последовательность "ATCGATCG", охватывает любые полинуклеотиды, имеющие такую последовательность, модифицированные или немодифицированные, включая без ограничения такие соединения, содержащие основания РНК, такие как соединения, имеющие последовательность "AUCGAUCG", и те соединения, которые имеют некоторые основания ДНК и некоторые основания РНК, такие как "AUCGATCG", а также полинуклеотиды, имеющие другие модифицированные основания, такие как "ATmeCGAUCG," где meC обозначает цитозинное основание, содержащее метильную группу в 5-положении.

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

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

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

ЭКВИВАЛЕНТЫ

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

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

ПРИМЕР 1: отбор, конструирование и синтез модифицированных молекул siRNA PNPLA3

[179] Идентификация и отбор оптимальных последовательностей терапевтических

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

Таблица 1. Последовательности siRNA, направленные на PNPLA3

Дупле кс №	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (смысловая)	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (антисмысловая)
D- 1000	GGGCAAUAAAGUACCU GCUUU	1	AGCAGGUACUUUAUUGCC CUU	2
D- 1001	CGGCCAAUGUCCACCA GCUUU	3	AGCUGGUGGACAUUGGCC GUU	4
D- 1002	GGUCCAGCCUGAACUU CUUUU	5	AAGAAGUUCAGGCUGGAC CUU	6
D- 1003	GCUUCAUCCCCUUCUA CAGUU	7	CUGUAGAAGGGGAUGAAG CUU	8
D- 1004	GCGGCUUCCUGGGCUU CUAUU	9	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	10
D- 1005	GCCUCUGAGCUGAGUU GGUUU	11	ACCAACUCAGCUCAGAGG CUU	12
D- 1006	GUGACAACGUACCCUU CAUUU	13	AUGAAGGGUACGUUGUCA CUU	14
D- 1007	CCCGCCUCCAGGUCCC AAAUU	15	UUUGGGACCUGGAGGCGG GUU	16
D- 1008	CUUCAUCCCCUUCUAC AGUUU	17	ACUGUAGAAGGGGAUGAA GUU	18
D- 1009	GGUAUGUCCUGCUUC AUGUU	19	CAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	20
D-	GUAUGUCCUGCUUCA	21	GCAUGAAGCAGGAACAU	22

1010	UGCUU		CUU	
D- 1011	UAUGUUCCUGCUUCAU GCCUU	23	GGCAUGAAGCAGGAACAU AUU	24
D- 1012	AUGUUCCUGCUUCAUG CCCUU	25	GGGCAUGAAGCAGGAACA UUU	26
D- 1013	UGUUCCUGCUUCAUGC CCUUU	27	AGGGCAUGAAGCAGGAAC AUU	28
D- 1014	GUUCCUGCUUCAUGCC CUUUU	29	AAGGGCAUGAAGCAGGAA CUU	30
D- 1015	UUCCUGCUUCAUGCCC UUCUU	31	GAAGGGCAUGAAGCAGGA AUU	32
D- 1016	UCCUGCUUCAUGCCCU UCUUU	33	AGAAGGGCAUGAAGCAGG AUU	34
D- 1017	CCUGCUUCAUGCCCUU CUAUU	35	UAGAAGGGCAUGAAGCAG GUU	36
D- 1018	CUGCUUCAUGCCCUUC UACUU	37	GUAGAAGGGCAUGAAGCA GUU	38
D- 1019	UGCUUCAUGCCCUUCU ACAUU	39	UGUAGAAGGGCAUGAAGC AUU	40
D- 1020	GCUUCAUGCCCUUCUA CAGUU	41	CUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	42
D- 1021	CUUCAUGCCCUUCUAC AGUUU	43	ACUGUAGAAGGGCAUGAA GUU	44
D- 1022	UUCAUGCCCUUCUACA GUGUU	45	CACUGUAGAAGGGCAUGA AUU	46
D- 1023	UCAUGCCCUUCUACAG UGGUU	47	CCACUGUAGAAGGGCAUG AUU	48
D- 1024	CAUGCCCUUCUACAGU GGCUU	49	GCCACUGUAGAAGGGCAU GUU	50
D-	AUGCCCUUCUACAGUG	51	GGCCACUGUAGAAGGGCA	52

1025	GCCUU		UUU	
D- 1026	UGCCCUUCUACAGUGG CCUUU	53	AGGCCACUGUAGAAGGGC AUU	54
D- 1027	GCCCUUCUACAGUGGC CUUUU	55	AAGGCCACUGUAGAAGGG CUU	56
D- 1028	GGUAUGUCCUGCUUC AUCUU	57	GAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	58
D- 1029	GUAUGUCCUGCUUCA UCCUU	59	GGAUGAAGCAGGAACAU CUU	60
D- 1030	UAUGUCCUGCUUCAU CCCUU	61	GGGAUGAAGCAGGAACAU AUU	62
D- 1031	AUGUCCUGCUUCAUC CCCUU	63	GGGAUGAAGCAGGAACA UUU	64
D- 1032	UGUCCUGCUUCAUCC CCUUU	65	AGGGGAUGAAGCAGGAAC AUU	66
D- 1033	GUUCCUGCUUCAUCCC CUUUU	67	AAGGGGAUGAAGCAGGAA CUU	68
D- 1034	UUCCUGCUUCAUCCCC UUCUU	69	GAAGGGGAUGAAGCAGGA AUU	70
D- 1035	UCCUGCUUCAUCCCCU UCUUU	71	AGAAGGGGAUGAAGCAGG AUU	72
D- 1036	CCUGCUUCAUCCCCU CUAUU	73	UAGAAGGGGAUGAAGCAG GUU	74
D- 1037	CUGCUUCAUCCCCUUC UACUU	75	GUAGAAGGGGAUGAAGCA GUU	76
D- 1038	UGCUUCAUCCCCUUCU ACAUU	77	UGUAGAAGGGGAUGAAGC AUU	78
D- 1039	UUCAUCCCCUUCUACA GUGUU	79	CACUGUAGAAGGGGAUGA AUU	80
D-	UCAUCCCCUUCUACAG	81	CCACUGUAGAAGGGGAUG	82

1040	UGGUU		AUU	
D- 1041	CAUCCCUUCUACAGU GGCUU	83	GCCACUGUAGAAGGGGAU GUU	84
D- 1042	UCCCUUCUACAGUGG CCUUU	85	AGGCCACUGUAGAAGGGG AUU	86
D- 1043	GAUCAGGACCCGAGCC GAUUU	87	AUCGGCUCGGGUCCUGAU CUU	88
D- 1044	UGGGCUUCUACCACGU CGUUU	89	ACGACGUGGUAGAAGCCC AUU	90
D- 1045	GAGCGAGCACGCCCCG CAUUU	91	AUGCGGGGCGUGCUCGCU CUU	92
D- 1046	UGCACUGCGUCGGCGU CCUUU	93	AGGACGCCGACGCAGUGC AUU	94
D- 1047	UGGAGCAGACUCUGCA GGUUU	95	ACCUGCAGAGUCUGCUC AUU	96
D- 1048	UGCAGGUCCUCUCAGA UCUUU	97	AGAUCUGAGAGGACCUGC AUU	98
D- 1049	CCCGGCCAAUGUCCAC CAUUU	99	AUGGUGGACAUUGGCCGG GUU	100
D- 1050	UUCUACAGUGGCCUUA UCUUU	101	AGAUAAAGGCCACUGUAGA AUU	102
D- 1051	UCUACAGUGGCCUUAU CCUUU	103	AGGAUAAGGCCACUGUAG AUU	104
D- 1052	CUUCCUUCAGAGGCGU GCUUU	105	AGCACGCCUCUGAAGGAA GUU	106
D- 1053	UUCCUUCAGAGGCGUG CGAUU	107	UCGCACGCCUCUGAAGGA AUU	108
D- 1054	GCGUGCGAUAUGUGGA UGUUU	109	ACAUCCACAUAUCGCACGC UU	110
D-	CGUGCGAUAUGUGGAU	111	UCCAUCCACAUAUCGCACG	112

1055	GGAUU		UU	
D- 1056	UGGAUGGAGGAGUGA GUGAUU	113	UCACUCACUCCUCCAUCCA UU	114
D- 1057	ACGUACCCUUCAUUGA UGUUU	115	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUU	116
D- 1058	UGGACAUCACCAAGCU CAUUU	117	AUGAGCUUGGUGAUGUCC AUU	118
D- 1059	CACCUGCGUCUCAGCA UCUUU	119	AGAUGCUGAGACGCAGGU GUU	120
D- 1060	ACCUGCGUCUCAGCAU CCUUU	121	AGGAUGCUGAGACGCAGG UUU	122
D- 1061	CCAGAGACUGGUGACA UGUUU	123	ACAUGUCACCAGUCUCUG GUU	124
D- 1062	AUGGCUUCCAGAU AUG CCUUU	125	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	126
D- 1063	CCGCCUCCAGGUCCCA AAUUU	127	AUUUGGGACCUGGAGGCG GUU	128
D- 1064	UACCUGCUGGUGCUGA GGUUU	129	ACCUCAGCACCAGCAGGU AUU	130
D- 1065	ACCUGCUGGUGCUGAG GGUUU	131	ACCCUCAGCACCAGCAGGU UU	132
D- 1066	CUCUCCACCUU UCCCA GUUUU	133	AACUGGGAAAGGUGGAGA GUU	134
D- 1067	UUUUUCACCUAACUAA AAUUU	135	AUUUUAGUUAGGUGAAAA AUU	136
D- 1068	CGGCCAAUGUCCACCA GCUUU	137	AGCUGGUGGACAUUGGCC GUU	138
D- 1069	GGUCCAGCCUGAACUU CUUUU	139	AAGAAGUUCAGGCUGGAC CUU	140
D-	GCGGCUUCCUGGGCUU	141	UAGAAGCCCAGGAAGCCG	142

1070	CUAUU		CUU	
D-1071	GUGACAACGUACCCUU CAUUU	143	AUGAAGGGUACGUUGUCA CUU	144
D-1072	GGUAUGUUCCUGCUUC AUGUU	145	CAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	146
D-1073	GUAUGUUCCUGCUUCA UGCUU	147	GCAUGAAGCAGGAACAU CUU	148
D-1074	UGUUCCUGCUUCAUGC CCUUU	149	AGGGCAUGAAGCAGGAAC AUU	150
D-1075	GUUCCUGCUUCAUGCC CUUUU	151	AAGGGCAUGAAGCAGGAA CUU	152
D-1076	CCUGCUUCAUGCCCUU CUAUU	153	UAGAAGGGCAUGAAGCAG GUU	154
D-1077	GCUUCAUGCCCUUCUA CAGUU	155	CUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	156
D-1078	CUUCAUGCCCUUCUAC AGUUU	157	ACUGUAGAAGGGCAUGAA GUU	158
D-1079	UUCAUGCCCUUCUACA GUGUU	159	CACUGUAGAAGGGCAUGA AUU	160
D-1080	AUGGCUUCCAGAUUAUG CCUUU	161	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	162
D-1081	AUGCCCUUCUACAGUG GCCUU	163	GGCCACUGUAGAAGGGCA UUU	164
D-1082	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	165	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	166
D-1083	GGAAAGACUGUUCCAA AAAUU	333	UUUUUGGAACAGUCUUUC CUU	334
D-1084	GGUAUGUUCCUGCUUC AUGUU	335	CAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	336
D-	GUAUGUUCCUGCUUCA	337	GCAUGAAGCAGGAACAU	338

1085	UGCUU		CUU	
D- 1086	UGUCCUGCUUCAUGC CCUUU	339	AGGGCAUGAAGCAGGAAC AUU	340
D- 1087	GCUUCAUGCCCUUCUA CAGUU	341	CUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	342
D- 1088	CUUCAUGCCCUUCUAC AGUUU	343	ACUGUAGAAGGGCAUGAA GUU	344
D- 1089	GCGGCUUCCUGGGCUU CUAUU	345	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	346
D- 1090	GUUCCUGCUUCAUGCC CUUUU	347	AAGGGCAUGAAGCAGGAA CUU	348
D- 1091	AUGGCUUCCAGAU AUG CCUUU	349	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	350
D- 1092	CCUGCUUCAUGCCCUU CUAUU	351	UAGAAGGGCAUGAAGCAG GUU	352
D- 1093	UUCAUGCCCUUCUACA GUUUU	353	AACUGUAGAAGGGCAUGA AUU	354
D- 1094	UUCAUGCCCUUCUACA GUGUU	355	CACUGUAGAAGGGCAUGA AUU	356
D- 1095	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	357	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	358
D- 1096	GGUCCAGCCUGAACUU CUUUU	359	AAGAAGUUCAGGCUGGAC CUU	360
D- 1097	GCGGCUUCCUGGGCUU CUAUU	361	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	362
D- 1098	GCGGCUUCCUGGGCUU CUAUU	363	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	364
D- 1099	GUUCCUGCUUCAUGCC CUUUU	365	AAGGGCAUGAAGCAGGAA CUU	366
D-	GUUCCUGCUUCAUGCC	367	AAGGGCAUGAAGCAGGAA	368

1100	CUUUU		CUU	
D- 1101	CCUGCUUCAUGCCCUU CUAUU	369	UAGAAGGGCAUGAAGCAG GUU	370
D- 1102	CCUGCUUCAUGCCCUU CUAUU	371	UAGAAGGGCAUGAAGCAG GUU	372
D- 1103	AUGCCCUUCUACAGUG GCCUU	373	GGCCACUGUAGAAGGGCA UUU	374
D- 1104	AUGGCUUCCAGAU AUG CCUUU	375	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	376
D- 1105	GUGACAACGUACCCUU CAUUU	377	AUGAAGGGUACGUUGUCA CUU	378
D- 1106	GUAUGUCCUGCUUCA UGCUU	379	GCAUGAAGCAGGAACAUA CUU	380
D- 1107	GUAUGUCCUGCUUCA UGCUU	381	GCAUGAAGCAGGAACAUA CUU	382
D- 1108	GUAUGUCCUGCUUCA UGCUU	383	GCAUGAAGCAGGAACAUA CUU	384
D- 1109	GUAUGUCCUGCUUCA UGCCU	385	AGGCAUGAAGCAGGAACA UACUU	386
D- 1110	UGGUAUGUCCUGCUU CAUGU	387	GCAUGAAGCAGGAACAUA CCAUA	388
D- 1111	GUAUGUCCUGCUUCA UGU	389	GCAUGAAGCAGGAACAUA CUU	390
D- 1112	GUAUGUCCUGCUUCA UGC{INVAB}	391	GCAUGAAGCAGGAACAUA CUU	392
D- 1113	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	393	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	394
D- 1114	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	395	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	396
D-	GCUUCAUGCCCUUCUA	397	AUGUAGAAGGGCAUGAAG	398

1115	CAUUU		CUU	
D- 1116	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	399	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	400
D- 1117	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	401	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	402
D- 1118	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	403	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	404
D- 1119	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	405	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	406
D- 1120	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	407	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	408
D- 1121	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	409	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	410
D- 1122	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	411	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	412
D- 1123	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	413	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	414
D- 1124	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	415	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	416
D- 1125	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	417	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	418
D- 1126	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	419	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	420
D- 1127	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	421	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	422
D- 1128	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	423	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	424
D- 1129	GCUUCAUG[DC]CCUUC UACAUUU	425	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	426
D-	GCUUCAUGCC[DC]UUC	427	AUGUAGAAGGGCAUGAAG	428

1130	UACAUUU		CUU	
D- 1131	GCUUCAUGC[DC]CUUC UACAUUU	429	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	430
D- 1132	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	431	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	432
D- 1133	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	433	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	434
D- 1134	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	435	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	436
D- 1135	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	437	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	438
D- 1136	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	439	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	440
D- 1137	GCUUCAUGCCCUUCUA CAGUU	441	AACUGUAGAAGGGCAUGA AGCUU	442
D- 1138	CUGCUUCAUGCCCUUC UACAU	443	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CAGUU	444
D- 1139	GCUUCAUGCCCUUCUA CAU	445	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	446
D- 1140	GCUUCAUGCCCUUCUA CAU{INVAB}	447	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	448
D- 1141	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU{INVAB}	449	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	450
D- 1142	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	451	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	452
D- 1143	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	453	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	454
D- 1144	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	455	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	456
D-	GCUUCAUGCCCUUCUA	457	AUGUAGAAGGGCAUGAAG	458

1145	CAUUU		CUU	
D- 1146	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	459	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	460
D- 1147	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	461	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	462
D- 1148	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	463	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	464
D- 1149	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	465	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	466
D- 1150	GCUUCAUGCCCUUCUA CAUUU	467	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	468
D- 1151	GUAUGUCCUGCUUCA UGCUU{INVAB}	469	GCAUGAAGCAGGAACAUA CUU	470
D- 1152	GGUAUGUCCUGCUUC AUUUU	471	AAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	472
D- 1153	GUAUGUCCUGCUUCA UGUUU	473	ACAUGAAGCAGGAACAUA CUU	474
D- 1154	CGGCCAAUGUCCACCA GCUUU	475	AGCUGGUGGACAUUGGCC GUU	476
D- 1155	UGGAGCAGACUCUGCA GGUUU	477	ACCUGCAGAGUCUGCUCC AUU	478
D- 1156	ACGUACCCUUCAUUGA UGUUU	479	ACAUCAAUUGAAGGGUACG UUU	480
D- 1157	CCAGAGACUGGUGACA UGUUU	481	ACAUGUCACCAGUCUCUG GUU	482
D- 1158	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	483	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	484
D- 1159	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	485	AAAUGUAGAAAGGCAUGA AGCUU	486
D-	[INVAB]GCUUCAUGCCU	487	AAAUGUAGAAAGGCAUGA	488

1160	UUCUACAUUU		AGCUU	
D- 1161	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAUU	489	UGUAGAAAGGCAUGAAGC AUU	490
D- 1162	UAUGUUCCUGCUUCAU GCUUU	491	AGCAUGAAGCAGGAACAU AUU	492
D- 1163	UUCCUGCUUCAUGCCU UUUUU	493	AAAAGGCAUGAAGCAGGA AUU	494
D- 1164	UCAUGCCUUUCUACAG UGUUU	495	ACACUGUAGAAAGGCAUG AUU	496
D- 1165	CAUGCCUUUCUACAGU GGUUU	497	ACCACUGUAGAAAGGCAU GUU	498
D- 1166	AUGCCUUUCUACAGUG GCUUU	499	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	500
D- 1167	GGUAUGUUCCUGCUUC AUAUU	501	UAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	502
D- 1168	GUAUGUUCCUGCUUCA UGAUU	503	UCAUGAAGCAGGAACAU CUU	504
D- 1169	UAUGUUCCUGCUUCAU GCAUU	505	UGCAUGAAGCAGGAACAU AUU	506
D- 1170	UUCCUGCUUCAUGCCU UUAUU	507	UAAAGGCAUGAAGCAGGA AUU	508
D- 1171	CUGCUUCAUGCCUUUC UAAUU	509	UUAGAAAGGCAUGAAGCA GUU	510
D- 1172	GCUUCAUGCCUUUCUA CAAUU	511	UUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	512
D- 1173	UUCAUGCCUUUCUACA GUAUU	513	UACUGUAGAAAGGCAUGA AUU	514
D- 1174	UCAUGCCUUUCUACAG UGAUU	515	UCACUGUAGAAAGGCAUG AUU	516
D-	CAUGCCUUUCUACAGU	517	UCCACUGUAGAAAGGCAU	518

1175	GGAUU		GUU	
D- 1176	AUGCCUUUCUACAGUG GCAUU	519	UGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	520
D- 1177	ACGUACCCUUCAUUGA UGAUU	521	UCAUCA AUGAAGGGUACG UUU	522
D- 1178	CCAGAGACUGGUGACA UGAUU	523	UCAUGUCACCAGUCUCUG GUU	524
D- 1179	AUGGCUUCCAGAU AUG CCA UU	525	UGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	526
D- 1180	GUUCCUGCUUCAUGCC UUUUU	527	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CUU	528
D- 1181	CCUGCUUCAUGCCUUU CUAUU	529	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GUU	530
D- 1182	GCUUCAUGCCUUUCUA CAUUU	531	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	532
D- 1183	CUUCAUGCCUUUCUAC AGUUU	533	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	534
D- 1184	UUCAUGCCUUUCUACA GUUUU	535	AACUGUAGAAAGGCAUGA AUU	536
D- 1185	GCUUCAUCCCUUUCUA CAUUU	537	AUGUAGAAAGGGAUGAAG CUU	538
D- 1186	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACA UUU	539	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	540
D- 1187	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACA UUU	541	AAAUGUAGAAGGGCAUGA AGCUU	542
D- 1188	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACA UUU	543	AAAUGUAGAAGGGCAUGA AGCUU	544
D- 1189	[INVAB]GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	545	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	546
D-	[INVAB]CUGCGGCUUCC	547	UAGAAGCCCAGGAAGCCG	548

1190	UGGGCUUCUA		CAGUU	
D- 1191	CUGCGGCUUCCUGGGC UUCU{INVAB}	549	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	550
D- 1192	[INVAB]CUGCGGCUUCC UGGGCUUCUA	551	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	552
D- 1193	[INVAB]GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	553	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	554
D- 1194	CUGCGGCUUCCUGGGC UUCU{INVAB}	555	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	556
D- 1195	[INVAB]CUGCGGCUUCC UGGGCUUCUA	557	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	558
D- 1196	[INVAB]GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	559	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	560
D- 1197	CUGCGGCUUCCUGGGC UUCU{INVAB}	561	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	562
D- 1198	[INVAB]CUGCGGCUUCC UGGGCUUCUA	563	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	564
D- 1199	[INVAB]GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	565	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	566
D- 1200	[INVAB]CUGCGGCUUCC UGGGCUUCUA	567	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	568
D- 1201	[INVAB]CUGCGGCUUCC UGGGCUUCUA	569	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	570
D- 1202	[INVAB]CUGCGGCUUCC UGGGCUUCUA	571	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	572
D- 1203	[INVAB]AUGGCUUCCAG AUAUGCCUUU	573	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	574
D- 1204	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAU AUGCCU	575	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	576
D-	ACAUGGCUUCCAGAU	577	AGGCAUAUCUGGAAGCCA	578

1205	UGCC{INVAB}		UGUUU	
D- 1206	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAU AUGCCU	579	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	580
D- 1207	[INVAB]AUGGCUUCCAG AUAUGCCUUU	581	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	582
D- 1208	ACAUGGCUUCCAGAU UGCC{INVAB}	583	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	584
D- 1209	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAU AUGCCU	585	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	586
D- 1210	[INVAB]AUGGCUUCCAG AUAUGCCUUU	587	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	588
D- 1211	ACAUGGCUUCCAGAU UGCC{INVAB}	589	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	590
D- 1212	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAU AUGCCU	591	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	592
D- 1213	[INVAB]AUGGCUUCCAG AUAUGCCUUU	593	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	594
D- 1214	ACAUGGCUUCCAGAU UGCC{INVAB}	595	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	596
D- 1215	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAU AUGCCU	597	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	598
D- 1216	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAU AUGCCU	599	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	600
D- 1217	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAU AUGCCU	601	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	602
D- 1218	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAU AUGCCU	603	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	604
D- 1219	[INVAB]ACGUACCCUUC AUUGAUGUUU	605	ACAUCAAUGAAGGGUACG UUU	606
D-	[INVAB]CAACGUACCCU	607	ACAUCAAUGAAGGGUACG	608

1220	UCAUUGAUGU		UUGUU	
D-1221	[INVAB]CAACGUACCCU UCAUUGAUGU	609	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	610
D-1222	[INVAB]ACGUACCCUUC AUUGAUGUUU	611	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUU	612
D-1223	CAACGUACCCUUCAU GAUG{INVAB}	613	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	614
D-1224	[INVAB]ACGUACCCUUC AUUGAUGUUU	615	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUU	616
D-1225	CAACGUACCCUUCAU GAUG{INVAB}	617	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	618
D-1226	[INVAB]CAACGUACCCU UCAUUGAUGU	619	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	620
D-1227	[INVAB]ACGUACCCUUC AUUGAUGUUU	621	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUU	622
D-1228	CAACGUACCCUUCAU GAUG{INVAB}	623	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	624
D-1229	[INVAB]CAACGUACCCU UCAUUGAUGU	625	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	626
D-1230	[INVAB]CAACGUACCCU UCAUUGAUGU	627	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	628
D-1231	[INVAB]CAACGUACCCU UCAUUGAUGU	629	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	630
D-1232	[INVAB]CAACGUACCCU UCAUUGAUGU	631	ACAUCA AUGAAGGGUACG UUGUU	632
D-1233	CUGCUUCAUGCCUUC UACAU	633	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	634
D-1234	CUGCUUCAUGCCUUC UACAU	635	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	636
D-	[INVAB]GCUUCAUGCCU	637	AUGUAGAAAGGCAUGAAG	638

1235	UUCUACAUUU		CUU	
D-1236	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	639	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	640
D-1237	CUGCUUCAUGCCUUUC UACAU	641	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	642
D-1238	CUGCUUCAUGCCUUUC UACAU	643	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	644
D-1239	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	645	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	646
D-1240	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	647	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	648
D-1241	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	649	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	650
D-1242	[INVAB]CUGCUUCAUGC [DC]UUUCUACAU	651	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	652
D-1243	CUGCUUCAUGCCUUUC UACAU	653	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	654
D-1244	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	655	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	656
D-1245	CUGCUUCAUGCCUUUC UACAU	657	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	658
D-1246	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	659	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	660
D-1247	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	661	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	662
D-1248	CUGCUUCAUGCCUUUC UACAU	663	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	664
D-1249	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	665	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	666
D-	[INVAB]CUGCUUCAUGC	667	AUGUAGAAAGGCAUGAAG	668

1250	CUUUCUACAU		CAGUU	
D- 1251	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	669	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	670
D- 1252	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	671	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	672
D- 1253	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	673	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	674
D- 1254	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	675	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	676
D- 1255	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	677	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	678
D- 1256	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	679	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	680
D- 1257	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	681	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	682
D- 1258	CUGCUUCAUGCCCUUC UACAU	683	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CAGUU	684
D- 1259	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	685	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	686
D- 1260	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	687	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	688
D- 1261	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	689	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	690
D- 1262	CUGCUUCAUGCCCUUC UACA{INVAB}	691	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CAGUU	692
D- 1263	[INVAB]CUGCUUCAUGC CCUUCUACAU	693	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CAGUU	694
D- 1264	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	695	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	696
D-	AUGUCCUGCUUCAUG	697	AGGCAUGAAGCAGGAACA	698

1265	CCUUU		UUU	
D- 1266	UGUCCUGCUUCAUGC CUUUU	699	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUU	700
D- 1267	UGCCUUUCUACAGUGG CCUUU	701	AGGCCACUGUAGAAAGGC AUU	702
D- 1268	CGUACUUCGUCCUUGU AUGUU	703	CAUACAAGGACGAAGUAC GUU	704
D- 1269	[INVAB]GCUUCAUGC[D C]CUUCUACAUUU	705	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	706
D- 1270	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	707	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	708
D- 1271	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	709	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	710
D- 1272	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	711	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	712
D- 1273	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	713	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	714
D- 1274	[INVAB]GCUUCAUGCCC UUCUACAUUU	715	AUGUAGAAGGGCAUGAAG CUU	716
D- 1275	[INVAB]CCUGCUUCAUG CCUUUCUAUU	717	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GUU	718
D- 1276	[INVAB]CCUGCUUCAUG CCUUUCUAUU	719	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GUU	720
D- 1277	UUCCUGCUUCAUGCCU UUCU{INVAB}	721	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	722
D- 1278	[INVAB]CCUGCUUCAUG CCUUUCUAUU	723	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GUU	724
D- 1279	UUCCUGCUUCAUGCCU UUCU{INVAB}	725	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	726
D- 1280	[INVAB]AUGCCUUUCUA	727	AGCCACUGUAGAAAGGCA	728

1280	CAGUGGCUUU		UUU	
D-1281	[INVAB]AUGCCUUUCUA CAGUGGCUUU	729	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	730
D-1282	[INVAB]AUGCCUUUCUA CAGUGGCUUU	731	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	732
D-1283	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	733	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	734
D-1284	[INVAB]AUGCCUUUCUA CAGUGGCUUU	735	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	736
D-1285	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCU	737	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	738
D-1286	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	739	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	740
D-1287	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	741	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	742
D-1289	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	743	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	744
D-1290	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	745	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	746
D-1291	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	747	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	748
D-1292	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	749	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	750
D-1293	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	751	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	752
D-1294	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	753	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	754
D-1295	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	755	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	756
D-	[INVAB]GUUCCUGCUUC	757	AAAGGCAUGAAGCAGGAA	758

1296	AUGCCUUUUU		CUU	
D- 1297	[INVAB]CCUGCUUCAUG CCUUUCUAUU	759	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GUU	760
D- 1298	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	761	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	762
D- 1299	[INVAB]UUCCUGCUUCA UGCCUUUCUA	763	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	764
D- 1300	UUCCUGCUUCAUGCCU UUCU{INVAB}	765	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	766
D- 1301	[INVAB]UUCCUGCUUCA UGCCUUUCUA	767	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	768
D- 1302	UUCCUGCUUCAUGCCU UUCU{INVAB}	769	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	770
D- 1303	[INVAB]UUCCUGCUUCA UGCCUUUCUA	771	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	772
D- 1304	[INVAB]UUCCUGCUUCA UGCCUUUCUA	773	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	774
D- 1305	[INVAB]UUCCUGCUUCA UGCCUUUCUA	775	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	776
D- 1306	[INVAB]UUCCUGCUUCA UGCCUUUCUA	777	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	778
D- 1307	[INVAB]UUCCUGCUUCA UGCCUUUCUA	779	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	780
D- 1308	[INVAB]UUCCUGCUUCA UGCCUUUCUA	781	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GAAUU	782
D- 1309	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCU	783	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	784
D- 1310	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	785	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	786
D-	[INVAB]UCAUGCCUUUC	787	AGCCACUGUAGAAAGGCA	788

1311	UACAGUGGCU		UGAUU	
D- 1312	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	789	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	790
D- 1313	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCU	791	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	792
D- 1314	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCU	793	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	794
D- 1315	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	795	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	796
D- 1316	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCU	797	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	798
D- 1317	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCU	799	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	800
D- 1318	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCU	801	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	802
D- 1319	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	803	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	804
D- 1320	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	805	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	806
D- 1321	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	807	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	808
D- 1322	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	809	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	810
D- 1323	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	811	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	812
D- 1324	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	813	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	814
D- 1325	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	815	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	816
D-	[INVAB]CAUGCCUUUCU	817	ACCACUGUAGAAAGGCAU	818

1326	ACAGUGGUUU		GUU	
D- 1327	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUAAUU	819	UUAGAAAGGCAUGAAGCA GUU	820
D- 1328	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAAUU	821	UUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	822
D- 1329	[INVAB]UUCAUGCCUUU CUACAGUAUU	823	UACUGUAGAAAGGCAUGA AUU	824
D- 1330	[INVAB]GUUCCUGCUUC AUGCCUUUUU	825	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CUU	826
D- 1331	AUGUCCUGCUUCAUG CCUU{INVAB}	827	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CAUUU	828
D- 1332	[INVAB]AUGUCCUGCU UCAUGCCUUU	829	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CAUUU	830
D- 1333	[INVAB]GUUCCUGCUUC AUGCCUUUUU	831	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CUU	832
D- 1334	AUGUCCUGCUUCAUG CCUU{INVAB}	833	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CAUUU	834
D- 1335	[INVAB]AUGUCCUGCU UCAUGCCUUU	835	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CAUUU	836
D- 1336	[INVAB]GUUCCUGCUUC AUGCCUUUUU	837	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CUU	838
D- 1337	AUGUCCUGCUUCAUG CCUU{INVAB}	839	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CAUUU	840
D- 1338	[INVAB]AUGUCCUGCU UCAUGCCUUU	841	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CAUUU	842
D- 1339	[INVAB]AUGUCCUGCU UCAUGCCUUU	843	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CAUUU	844
D- 1340	[INVAB]AUGUCCUGCU UCAUGCCUUU	845	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CAUUU	846
D-	[INVAB]GCUUCAUGCCU	847	UACUGUAGAAAGGCAUGA	848

1341	UUCUACAGUA		AGCUU	
D- 1342	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAGUA	849	UACUGUAGAAAGGCAUGA AGCUU	850
D- 1343	[INVAB]UUCAUGCCUUU CUACAGUAUU	851	UACUGUAGAAAGGCAUGA AUU	852
D- 1344	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAGUA	853	UACUGUAGAAAGGCAUGA AGCUU	854
D- 1345	GCUUCAUGCCUUUCUA CAGU{INVAB}	855	UACUGUAGAAAGGCAUGA AGCUU	856
D- 1346	[INVAB]GCGGCUUCCUG GGCUUCUAUU	857	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CUU	858
D- 1347	[INVAB]AUGGCUUCCAG AUAUGCCUUU	859	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UUU	860
D- 1348	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAUUAUGCCU	861	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	862
D- 1349	[INVAB]ACAUGGCUUCC AGAUUAUGCCU	863	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	864
D- 1350	[INVAB]CAACGUACCCU UCAUUGAUGU	865	ACAUCAAUGAAGGGUACG UUGUU	866
D- 1351	[INVAB]CAACGUACCCU UCAUUGAUGU	867	ACAUCAAUGAAGGGUACG UUGUU	868
D- 1352	[INVAB]ACGUACCCUUC AUUGAUGUUU	869	ACAUCAAUGAAGGGUACG UUU	870
D- 1353	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	871	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	872
D- 1354	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	873	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	874
D- 1355	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	875	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	876
D-	CUGCUUCAUGCCUUUC	877	AUGUAGAAAGGCAUGAAG	878

1356	UACA{INVAB}		CAGUU	
D- 1357	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	879	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	880
D- 1358	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	881	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	882
D- 1359	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	883	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	884
D- 1360	[INVAB]GCUUCAUGCCU UUCUACAUUU	885	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	886
D- 1361	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	887	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	888
D- 1362	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	889	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	890
D- 1363	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	891	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	892
D- 1364	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	893	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	894
D- 1365	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	895	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	896
D- 1366	[INVAB]CUUCAUCCCUU UCUACAGUUU	897	ACUGUAGAAAGGGAUGAA GUU	898
D- 1367	[INVAB]GCUUCAUCCCU UUCUACAUUU	899	AUGUAGAAAGGGAUGAAG CUU	900
D- 1368	UGCUUCAUCCCUUUCU ACAG{INVAB}	901	ACUGUAGAAAGGGAUGAA GCAUU	902
D- 1369	CUGCUUCAUCCCUUUC UACA{INVAB}	903	AUGUAGAAAGGGAUGAAG CAGUU	904
D- 1370	[INVAB]ACAUUGCUCUU UCACCUGAUU	905	UCAGGUGAAAGAGCAAUG UUU	906
D-	CUGCUUCAUGCCUUUC	907	AUGUAGAAAGGCAUGAAG	908

1371	UACA{INVAB}		CAGUU	
D- 1372	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	909	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	910
D- 1373	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	911	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	912
D- 1374	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	913	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	914
D- 1375	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	915	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	916
D- 1376	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	917	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	918
D- 1377	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	919	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	920
D- 1378	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	921	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	922
D- 1379	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	923	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	924
D- 1380	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	925	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	926
D- 1381	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	927	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	928
D- 1381	[INVAB]CUUCAUGCC[D T]UUCUACAGUUU	929	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	930
D- 1382	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	931	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	932
D- 1383	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	933	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	934
D- 1384	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	935	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	936
D-	[INVAB]CUUCAUGCCUU	937	ACUGUAGAAAGGCAUGAA	938

1385	UCUACAGUUU		GUU	
D-1386	[INVAB]CUUCAUGC[DC]UUUCUACAGUUU	939	ACUGUAGAAAGGCAUGAAGUU	940
D-1387	[INVAB]CUUCAUGCCU[DT]UCUACAGUUU	941	ACUGUAGAAAGGCAUGAAGUU	942
D-1388	[INVAB]GCUUCAUGGGAUUCUACA	943	AUGUAGAAUCCCAUGAAGCUU	944
D-1389	[INVAB]CUUCAUGCGAAUCUACAGUUU	945	ACUGUAGAUUCGCAUGAAGUU	946
D-1390	CUGCUUCAUGCCUUUCUACA{INVAB}	947	UUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGUU	948
D-1391	[INVAB]CUGCUUCAUGCCUUUCUACAA	949	UUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGUU	950
D-1392	CUGCUUCAUGCCUUUCUACA{INVDA}	951	UUGUAGAAAGGCAUGAAGCAGUU	952
D-1393	CUGCUUCAUGGGAUUCUACA{INVAB}	953	AUGUAGAAUCCCAUGAAGCAGUU	954
D-1394	[INVAB]CUGCUUCAUGGGAUUCUACAU	955	AUGUAGAAUCCCAUGAAGCAGUU	956
D-1395	[INVAB]CUUCAUGCCUUUCUACAGUUU	957	ACUGUAGAAAGGCAUGAAGUU	958
D-1396	[INVAB]CUUCAUGCCUUUCUACAGUUU	959	ACUGUAGAAAGGCAUGAAGUU	960
D-1397	[INVAB]GCUUCAUGCCUUUCUACA	961	AUGUAGAAAGGCAUGAAGCUU	962
D-1398	[INVAB]UGCUUCAUGCCUUUCUACAG{INVAB}	963	ACUGUAGAAAGGCAUGAAGGCAUU	964
D-1399	[INVAB]CUUCAUGCCUUUCUACAGUUU	965	ACUGUAGAAAGGCAUGAAGUU	966
D-	UGCUUCAUGCCUUUCU	967	ACUGUAGAAAGGCAUGAAG	968

1400	ACAG{INVAB}		GCAUU	
D-1401	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	969	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	970
D-1402	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	971	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	972
D-1403	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	973	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	974
D-1404	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	975	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	976
D-1405	AUGCCUUUCUACAGUG GCUU{INVAB}	977	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	978
D-1406	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	979	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	980
D-1407	[INVAB]AUGCCUUUCUA CAGUGGCUUU	981	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	982
D-1408	[INVAB]AUGCCUUUCUA CAGUGGCUUU	983	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	984
D-1409	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCU	985	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	986
D-1410	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	987	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	988
D-1411	[INVAB]AUGCCUUUCUA CAGUGGCUUU	989	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	990
D-1412	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	991	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	992
D-1413	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	993	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	994
D-1414	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGC{INVAB}	995	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	996
D-	[INVAB]AUGCCUUUCUA	997	UGCCACUGUAGAAAGGCA	998

1415	CAGUGGCAUU		UUU	
D- 1416	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	999	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1000
D- 1417	[INVAB]UCAUGCCUUUC UACAGUGGCA	1001	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1002
D- 1418	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVDA}	1003	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1004
D- 1419	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1005	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1006
D- 1420	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1007	UUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1008
D- 1421	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVDA}	1009	UUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1010
D- 1422	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	1011	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1012
D- 1423	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVDA}	1013	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1014
D- 1424	[INVAB]CUUCAUGCCUU UCUACAGUUU	1015	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	1016
D- 1425	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1017	AUGUA[AB]AAAGGCAUGA AGCAGUU	1018
D- 1426	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1019	AUGUA[AB]AAAGGCAUGA AGCAGUU	1020
D- 1427	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	1021	ACUGU[AB]GAAAGGCAUG AAGCAUU	1022
D- 1428	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	1023	ACUGU[AB]GAAAGGCAUG AAGCAUU	1024
D- 1429	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	1025	AGCCA[AB]UGUAGAAAGG CAUGAUU	1026
D-	UCAUGCCUUUCUACAG	1027	AGCCA[AB]UGUAGAAAGG	1028

1430	UGGC{INVAB}		CAUGAUU	
D- 1431	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1029	AU[GNA- G]UAGAAAGGCAUGAAGCA GUU	1030
D- 1432	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1031	AUG[GNA- U]AGAAAGGCAUGAAGCAG UU	1032
D- 1433	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1033	AUGU[GNA- A]GAAAGGCAUGAAGCAGU U	1034
D- 1434	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1035	AUGUA[GNA- G]AAAGGCAUGAAGCAGUU	1036
D- 1435	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1037	AUGUAG[GNA- A]AAGGCAUGAAGCAGUU	1038
D- 1436	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1039	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1040
D- 1437	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1041	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1042
D- 1438	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	1043	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1044
D- 1439	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1045	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1046
D- 1440	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1047	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1048
D- 1441	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1049	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1050
D- 1442	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	1051	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1052
D- 1443	CUGCUUCAUGCCUUC UACA{INVAB}	1053	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1054

D-1444	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1055	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1056
D-1445	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACAU	1057	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1058
D-1446	[INVAB]CUGCUUCAUGC CUUUCUACA{INVAB}	1059	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1060
D-1447	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1061	A[AB]GUAGAAAGGCAUGA AGCAGUU	1062
D-1448	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1063	AU[AB]UAGAAAGGCAUGA AGCAGUU	1064
D-1449	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1065	AUG[AB]AGAAAGGCAUGA AGCAGUU	1066
D-1450	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1067	AUGU[AB]GAAAGGCAUGA AGCAGUU	1068
D-1451	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1069	AUGUAG[AB]AAGGCAUGA AGCAGUU	1070
D-1452	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1071	AUGUAGA[AB]AGGCAUGA AGCAGUU	1072
D-1453	CAACGUACCCUUCAUU GAUG{INVAB}	1073	ACAUCAAUGAAGGGUACG UUGUU	1074
D-1454	CAACGUACCCUUCAUU GAUG{INVAB}	1075	ACAUCAAUGAAGGGUACG UUGUU	1076
D-1455	ACAUGGCUUCCAGAU UGCC{INVAB}	1077	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	1078
D-1456	ACAUGGCUUCCAGAU UGCC{INVAB}	1079	AGGCAUAUCUGGAAGCCA UGUUU	1080
D-1457	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1081	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1082
D-1458	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1083	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1084

D-1459	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1085	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1086
D-1460	CUGCGGCUUCCUGGGC UUCU{INVAB}	1087	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	1088
D-1461	CUGCGGCUUCCUGGGC UUCU{INVAB}	1089	UAGAAGCCCAGGAAGCCG CAGUU	1090
D-1462	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	1091	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	1092
D-1463	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAGU	1093	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	1094
D-1464	[INVAB]UGCUUCAUGCC UUUCUACAG{INVAB}	1095	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	1096
D-1465	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	1097	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	1098
D-1466	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	1099	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	1100
D-1467	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	1101	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	1102
D-1468	CUGCUUCAUGCCUUUC UACAU	1103	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1104
D-1469	CUGCUUCAUGCCUUUC UACAU	1105	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1106
D-1470	CUGCUUCAUGCCUUUC UACAU	1107	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1108
D-1471	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVAB}	1109	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	1110
D-1472	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1111	UCUGUAGAAAGGCAUGAA GCAUU	1112
D-1473	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVDT}	1113	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1114

D-1474	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1115	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1116
D-1475	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1117	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1118
D-1476	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1119	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1120
D-1477	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1121	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1122
D-1478	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1123	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1124
D-1479	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1125	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1126
D-1480	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1127	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1128
D-1481	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1129	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1130
D-1482	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1131	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1132
D-1483	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1133	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1134
D-1484	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1135	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1136
D-1485	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1137	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1138
D-1486	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1139	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1140
D-1487	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1141	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1142
D-1488	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1143	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1144

D-1489	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1145	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1146
D-1490	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1147	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1148
D-1491	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1149	AUGUAGA[GNA- A]A[DG]GCAUGAAGCAGUU	1150
D-1492	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1151	AUGUAGA[GNA- A][DA]GGCAUGAAGCAGUU	1152
D-1493	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1153	AUGUAGA[GNA- A]AG[DG]CAUGAAGCAGUU	1154
D-1494	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1155	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1156
D-1495	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1157	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1158
D-1496	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1159	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1160
D-1497	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1161	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1162
D-1498	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1163	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1164
D-1499	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1165	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1166
D-1500	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1167	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CAGUU	1168
D-1501	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1169	U[GNA- C]UGUAGAAAGGCAUGAAG CAUU	1170
D-1502	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1171	UC[GNA- U]GUAGAAAGGCAUGAAGC AUU	1172

D-1503	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1173	UCUG[GNA- U]AGAAAGGCAUGAAGCAU U	1174
D-1504	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1175	UCUGU[GNA- A]GAAAGGCAUGAAGCAUU	1176
D-1505	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1177	UCUGUAG[GNA- A]AAGGCAUGAAGCAUU	1178
D-1506	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1179	U[AB]UGUAGAAAGGCAUG AAGCAUU	1180
D-1507	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1181	UC[AB]GUAGAAAGGCAUG AAGCAUU	1182
D-1508	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1183	UCU[AB]UAGAAAGGCAUG AAGCAUU	1184
D-1509	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1185	UCUG[AB]AGAAAGGCAUG AAGCAUU	1186
D-1510	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1187	UCUGU[AB]GAAAGGCAUG AAGCAUU	1188
D-1511	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1189	UCUGUA[AB]AAAGGCAUG AAGCAUU	1190
D-1512	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1191	UCUGUAG[AB]AAGGCAUG AAGCAUU	1192
D-1513	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVDT}	1193	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1194
D-1514	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	1195	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1196
D-1515	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVDA}	1197	UGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1198
D-1516	UCCUGCUUCAUGCCUU UCUA{INVDT}	1199	AUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	1200
D-	UCCUGCUUCAUGCCUU	1201	UUAGAAAGGCAUGAAGCA	1202

1517	UCUA{INVAB}		GGAUU	
D- 1518	UCCUGCUUCAUGCCUU UCUA{INVDA}	1203	UUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	1204
D- 1519	UAUGUUCCUGCUUCAU GCCU{INVDT}	1205	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	1206
D- 1520	UAUGUUCCUGCUUCAU GCCU{INVAB}	1207	UAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	1208
D- 1521	UAUGUUCCUGCUUCAU GCCU{INVDA}	1209	UAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	1210
D- 1522	UCCUGCUUCAUGCCUU UCUA{INVAB}	1211	AUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	1212
D- 1523	UAUGUUCCUGCUUCAU GCCU{INVAB}	1213	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	1214
D- 1524	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVDT}	1215	AGCCACUGUAGAAAGGCA UGAUU	1216
D- 1525	UCCUGCUUCAUGCCUU UCUA{INVDT}	1217	AUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	1218
D- 1526	UCCUGCUUCAUGCCUU UCUA{INVDA}	1219	UUAGAAAGGCAUGAAGCA GGAUU	1220
D- 1527	UAUGUUCCUGCUUCAU GCCU{INVDA}	1221	UAGGCAUGAAGCAGGAAC AUAUU	1222
D- 1528	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAG{INVDA}	1223	UCUGUA[GNA- G]AAAGGCAUGAAGCAUU	1224
D- 1529	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1225	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1226
D- 1530	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1227	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1228
D- 1531	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1229	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1230
D-	CUGCUUCAUGCCUUUC	1231	AUGUAGA[GNA-	1232

1532	UACA{INVAB}		A]AGGCAUGAAGCAGUU	
D- 1533	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1233	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1234
D- 1534	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1235	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1236
D- 1535	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1237	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1238
D- 1536	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1239	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1240
D- 1537	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1241	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1242
D- 1538	CUGCUUCAUGCCU[LNA -T]UCUACA{INVAB}	1243	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1244
D- 1539	CUGCUUCAUGCC[LNA- T]UUCUACA{INVAB}	1245	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1246
D- 1540	CUGCUUCAUGCCUU[LNA A-T]CUACA{INVAB}	1247	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1248
D- 1541	CUGCUUCAUGCCUUUC[LNA-T]ACA{INVAB}	1249	AUGU[GNA- A]GAAAGGCAUGAAGCAGU U	1250
D- 1542	CUGCUUCAUGCCUUUC U[LNA-A]CA{INVAB}	1251	AUG[GNA- U]AGAAAGGCAUGAAGCAG UU	1252
D- 1543	CUGCUUCAUGCCUUUC UAC[LNA-A]{INVAB}	1253	A[GNA- U]GUAGAAAGGCAUGAAGC AGUU	1254
D- 1544	CUGCUUCAUGCCUU[LNA A-T]CUACA{INVAB}	1255	AUGUAG[AB]AAGGCAUGA AGCAGUU	1256
D- 1545	CUGCUUCAUGCCUUUC[LNA-T]ACA{INVAB}	1257	AUGU[AB]GAAAGGCAUGA AGCAGUU	1258

D-1546	CUGCUUCAUGCCUUUC U[LNA-A]CA{INVAB}	1259	AUG[AB]AGAAAGGCAUGA AGCAGUU	1260
D-1547	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1261	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1262
D-1548	CUGCUUCAUGCCUUUC UACA{INVAB}	1263	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1264
D-1549	CUGCUUCAUGCCU[LNA -T]UCUACA{INVAB}	1265	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1266
D-1550	CUGCUUCAUGCCU[LNA -T]UCUACA{INVAB}	1267	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1268
D-1551	CUGCUUCAUGCCU[LNA -T]UCUACA{INVAB}	1269	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1270
D-1552	CUGCUUCAUGCCU[LNA -T]UCUACA{INVAB}	1271	AUGUAGA[GNA- A]AGGCAUGAAGCAGUU	1272
D-1553	UGCUUCAUGCCUUUCU [LNA-A]CAG{INVDA}	1273	UCUG[AB]AGAAAGGCAUG AAGCAUU	1274
D-1554	UGCUUCAUGCCUUUC[L NA-T]ACAG{INVDA}	1275	UCUGU[AB]GAAAGGCAUG AAGCAUU	1276
D-1555	UGCUUCAUGCCUU[LNA -T]CUACAG{INVDA}	1277	UCUGUAG[AB]AAGGCAUG AAGCAUU	1278
D-1556	UGCUUCAUGCCUUUCU AC[LNA-A]G{INVDA}	1279	UC[GNA- U]GUAGAAAGGCAUGAAGC AUU	1280
D-1557	UGCUUCAUGCCUUUCU [LNA-A]CAG{INVDA}	1281	UCUG[GNA- U]AGAAAGGCAUGAAGCAU U	1282
D-1558	UGCUUCAUGCCUUUC[L NA-T]ACAG{INVDA}	1283	UCUGU[GNA- A]GAAAGGCAUGAAGCAUU	1284
D-1559	UGCUUCAUGCCUUUCU ACA[LNA-G]{INVDA}	1285	U[AB]UGUAGAAAGGCAUG AAGCAUU	1286

D-1560	UGCUUCAUGCCUUUCU AC[LNA-A]G{INVDA}	1287	UC[AB]GUAGAAAGGCAUG AAGCAUU	1288
D-1561	UCAUGCCUUUCUACA[L NA-G]UGGC{INVAB}	1289	AGCCA[AB]UGUAGAAAGG CAUGAUU	1290
D-1562	UCAUGCCUUUCUACAG [LNA-T]GGC{INVAB}	1291	AGCCA[AB]UGUAGAAAGG CAUGAUU	1292
D-1563	UCAUGCCUUUCUACAG UGGC{INVAB}	1293	AGCCA[AB]UGUAGAAAGG CAUGAUU	1294
D-1564	GGUAUGUCCUGCUUC AUUUU	2257	AAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	2258
D-1565	GGUAUGUCCUGCUUC AUAUU	2259	UAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	2260
D-1566	GUAUGUCCUGCUUCA UGUUU	2261	ACAUGAAGCAGGAACAU CUU	2262
D-1567	UAUGUCCUGCUUCAU GCAUU	2263	UGCAUGAAGCAGGAACAU AUU	2264
D-1568	AUGUCCUGCUUCAUG CCUUU	2265	AGGCAUGAAGCAGGAACA UUU	2266
D-1569	UGUCCUGCUUCAUGC CUUUU	2267	AAGGCAUGAAGCAGGAAC AUU	2268
D-1570	GUUCCUGCUUCAUGCC UUUUU	2269	AAAGGCAUGAAGCAGGAA CUU	2270
D-1571	UUCCUGCUUCAUGCCU UUUUU	2271	AAAAGGCAUGAAGCAGGA AUU	2272
D-1572	UUCCUGCUUCAUGCCU UUAUU	2273	UAAAGGCAUGAAGCAGGA AUU	2274
D-1573	UCCUGCUUCAUGCCUU UCUUU	2275	AGAAAGGCAUGAAGCAGG AUU	2276
D-1574	CCUGCUUCAUGCCUUU CUAUU	2277	UAGAAAGGCAUGAAGCAG GUU	2278

D-1575	CUGCUUCAUGCCUUUC UAUUU	2279	AUAGAAAGGCAUGAAGCA GUU	2280
D-1576	CUGCUUCAUGCCUUUC UAAUU	2281	UUAGAAAGGCAUGAAGCA GUU	2282
D-1577	UGCUUCAUGCCUUUCU ACAUU	2283	UGUAGAAAGGCAUGAAGC AUU	2284
D-1578	GCUUCAUGCCUUUCUA CAUUU	2285	AUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	2286
D-1579	GCUUCAUGCCUUUCUA CAAUU	2287	UUGUAGAAAGGCAUGAAG CUU	2288
D-1580	CUUCAUGCCUUUCUAC AGUUU	2289	ACUGUAGAAAGGCAUGAA GUU	2290
D-1581	UUCAUGCCUUUCUACA GUUUU	2291	AACUGUAGAAAGGCAUGA AUU	2292
D-1582	UUCAUGCCUUUCUACA GUAUU	2293	UACUGUAGAAAGGCAUGA AUU	2294
D-1583	UCAUGCCUUUCUACAG UGUUU	2295	ACACUGUAGAAAGGCAUG AUU	2296
D-1584	UCAUGCCUUUCUACAG UGAUU	2297	UCACUGUAGAAAGGCAUG AUU	2298
D-1585	CAUGCCUUUCUACAGU GGUUU	2299	ACCACUGUAGAAAGGCAU GUU	2300
D-1586	CAUGCCUUUCUACAGU GGAUU	2301	UCCACUGUAGAAAGGCAU GUU	2302
D-1587	AUGCCUUUCUACAGUG GCUUU	2303	AGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	2304
D-1588	AUGCCUUUCUACAGUG GCAUU	2305	UGCCACUGUAGAAAGGCA UUU	2306
D-1589	UGCCUUUCUACAGUGG CCUUU	2307	AGGCCACUGUAGAAAGGC AUU	2308

D-1590	GCCUUUCUACAGUGGC CUUUU	2309	AAGGCCACUGUAGAAAGG CUU	2310
D-1591	GGUAUGUCCUGCUUC AUCUU	2311	GAUGAAGCAGGAACAUAC CUU	2312
D-1592	GUAUGUCCUGCUUCA UCCUU	2313	GGAUGAAGCAGGAACAU CUU	2314
D-1593	UAUGUCCUGCUUCAU CCCUU	2315	GGGAUGAAGCAGGAACAU AUU	2316
D-1594	AUGUCCUGCUUCAUC CCCUU	2317	GGGAUGAAGCAGGAACA UUU	2318
D-1595	UGUCCUGCUUCAUCC CCUUU	2319	AGGGGAUGAAGCAGGAAC AUU	2320
D-1596	GUUCCUGCUUCAUCCC CUUUU	2321	AAGGGGAUGAAGCAGGAA CUU	2322
D-1597	UUCUGCUUCAUCCCC UUCUU	2323	GAAGGGGAUGAAGCAGGA AUU	2324
D-1598	UCCUGCUUCAUCCCCU UCUUU	2325	AGAAGGGGAUGAAGCAGG AUU	2326
D-1599	CCUGCUUCAUCCCCUU CUAUU	2327	UAGAAGGGGAUGAAGCAG GUU	2328
D-1600	CUGCUUCAUCCCCUUC UACUU	2329	GUAGAAGGGGAUGAAGCA GUU	2330
D-1601	UGCUUCAUCCCCUUCU ACAUU	2331	UGUAGAAGGGGAUGAAGC AUU	2332
D-1602	GCUUCAUCCCCUUCUA CAGUU	2333	CUGUAGAAGGGGAUGAAG CUU	2334
D-1603	CUUCAUCCCCUUCUAC AGUUU	2335	ACUGUAGAAGGGGAUGAA GUU	2336
D-1604	UUCAUCCCCUUCUACA GUGUU	2337	CACUGUAGAAGGGGAUGA AUU	2338

D-1605	UCAUCCCCUUCUACAG UGGUU	2339	CCACUGUAGAAGGGGAUG AUU	2340
D-1606	CAUCCCCUUCUACAGU GGCUU	2341	GCCACUGUAGAAGGGGAU GUU	2342
D-1607	AUCCCCUUCUACAGUG GCCUU	2343	GGCCACUGUAGAAGGGGA UUU	2344
D-1608	UCCCCUUCUACAGUGG CCUUU	2345	AGGCCACUGUAGAAGGGG AUU	2346
D-1609	CCCCUUCUACAGUGGC CUUUU	2347	AAGGCCACUGUAGAAGGG GUU	2348

[180] Чтобы повысить активность и стабильность *in vivo* последовательностей siRNA PNPLA3, встраивали химические модификации в молекулы siRNA PNPLA3. В частности, встраивали 2'-О-метил- и 2'-фтор-модификации рибозного сахара в определенные положения siRNA PNPLA3. Также встраивали фосфоротионатные межнуклеотидные связи в концевые участки антисмысловых и/или смысловых последовательностей. В нижеприведенной таблице 2 изображены модификации в смысловой и антисмысловой последовательностях для каждой из модифицированных siRNA PNPLA3. Нуклеотидные последовательности в таблице X перечислены в соответствии со следующими обозначениями: A, U, G и C=соответствующий рибонуклеотид; dT=дезокситимидин; а, ц, g и с=соответствующий 2'-О-метилрибонуклеотид; Af, Uf, Gf и Cf=соответствующий 2'-дезоксид-2'-фтор ("2'-фтор") рибонуклеотид. Вставка "s" в последовательность означает, что два соседних нуклеотида связаны фосфоротиодифирной группой (например, фосфоротионатной межнуклеотидной связью). Если не указано иное, все другие нуклеотиды связаны 3'-5'-фосфодиэфирными группами. Каждое из соединений на основе siRNA в таблице 2 содержит дуплексный участок длиной в 19 пар оснований, содержащий либо липкий конец из 2 нуклеотидов на 3'-конце обеих нитей, либо тупой конец на одном или на обоих концах. GalNAc3K2AhxC6 представляет собой:

Дуплекс №	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (смысловая)	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (антисмысловая)
D-2000	GfsgsGfcAfaUfaAfAfGfuAfcCfuGfcUfsusUf	167	asGfscAfgGfuAfcuuUfaUfuGfcCfcsUfsu	168
D-2001	CfsgsGfcCfaAfuGfUfCfcAfcCfaGfcUfsusUf	169	asGfscUfgGfuGfgacAfuUfgGfcCfcsUfsu	170
D-2002	GfsgsUfcCfaGfcCfUfGfaAfcUfuCfuUfsusUf	171	asAfsgAfaGfuUfcagGfcUfgGfaCfcsUfsu	172
D-2003	GfscsUfuCfaUfcCfCfCfuUfcUfaCfaGfsusUf	173	csUfsgUfaGfaAfgggGfaUfgAfaGfcsUfsu	174
D-2004	GfscsGfgCfuUfcCfUfGfgGfcUfuCfuAfsusUf	175	usAfsgAfaGfcCfcagGfaAfgCfcGfcsUfsu	176
D-2005	GfscsCfuCfuGfaGfCfUfgAfgUfuGfgUfsusUf	177	asCfscAfaCfuCfagcUfcAfgAfgGfcsUfsu	178
D-2006	GfsusGfaCfaAfcGfUfAfcCfcUfuCfaUfsusUf	179	asUfsgAfaGfgGfuacGfuUfgUfcAfcUfsu	180
D-2007	CfscsCfgCfcUfcCfAfGfgUfcCfcAfaAfsusUf	181	usUfsuGfgGfaCfcugGfaGfgCfgGfgsUfsu	182
D-2008	CfsusUfcAfuCfcCfCfUfuCfuAfcAfgUfsusUf	183	asCfsuGfuAfgAfaggGfgAfuGfaAfgsUfsu	184

Дуплекс №	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (смысловая)	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (антисмысловая)
D-2000	GfsgsGfcAfaUfaAfAfGfuAfcCfuGfcUfsusUf	167	asGfscAfgGfuAfcuuUfaUfuGfcCfcsUfsu	168
D-2001	CfsgsGfcCfaAfuGfUfCfcAfcCfaGfcUfsusUf	169	asGfscUfgGfuGfgacAfuUfgGfcCfcsUfsu	170
D-2002	GfsgsUfcCfaGfcCfUfGfaAfcUfuCfuUfsusUf	171	asAfsgAfaGfuUfcagGfcUfgGfaCfcsUfsu	172
D-2003	GfscsUfuCfaUfcCfCfCfuUfcUfaCfaGfsusUf	173	csUfsgUfaGfaAfgggGfaUfgAfaGfcsUfsu	174
D-2004	GfscsGfgCfuUfcCfUfGfgGfcUfuCfuAfsusUf	175	usAfsgAfaGfcCfcagGfaAfgCfcGfcsUfsu	176
D-2005	GfscsCfuCfuGfaGfCfUfgAfgUfuGfgUfsusUf	177	asCfscAfaCfuCfcagUfcAfgAfgGfcsUfsu	178
D-2006	GfsusGfaCfaAfcGfUfAfcCfcUfuCfaUfsusUf	179	asUfsgAfaGfgGfuacGfuUfgUfcAfcUfsu	180
D-2007	CfscsCfgCfcUfcCfAfGfgUfcCfcAfaAfsusUf	181	usUfsuGfgGfaCfcugGfaGfgCfgGfcsUfsu	182
D-2008	CfsusUfcAfuCfcCfCfUfuCfuAfcAfgUfsusUf	183	asCfsuGfuAfgAfaggGfgAfuGfaAfgsUfsu	184

D-2009	GfsgsUfaUfgUfuCfCfU fgCfuUfcAfuGfsusUf	185	csAfsuGfaAfgCfagg AfaCfaUfaCfcsUfsu	186
D-2010	GfsusAfuGfuUfcCfUfG fcUfuCfaUfgCfsusUf	187	gsCfsaUfgAfaGfcag GfaAfcAfuAfcsUfsu	188
D-2011	UfsasUfgUfuCfcUfGfC fuUfcAfuGfcCfsusUf	189	gsGfscAfuGfaAfgca GfgAfaCfaUfasUfsu	190
D-2012	AfsusGfuUfcCfuGfCfU fuCfaUfgCfcCfsusUf	191	gsGfsgCfaUfgAfagc AfgGfaAfcAfusUfsu	192
D-2013	UfsgsUfuCfcUfgCfUfU fcAfuGfcCfcUfsusUf	193	asGfsgGfcAfuGfaag CfaGfgAfaCfasUfsu	194
D-2014	GfsusUfcCfuGfcUfUfC faUfgCfcCfuUfsusUf	195	asAfsgGfgCfaUfgaa GfcAfgGfaAfcsUfsu	196
D-2015	UfsusCfcUfgCfuUfCfA fuGfcCfcUfuCfsusUf	197	gsAfsaGfgGfcAfuga AfgCfaGfgAfasUfsu	198
D-2016	UfscsCfuGfcUfuCfAfU fgCfcCfuUfcUfsusUf	199	asGfsaAfgGfgCfaug AfaGfcAfgGfasUfsu	200
D-2017	CfscsUfgCfuUfcAfUfG fcCfcUfuCfuAfsusUf	201	usAfsgAfaGfgGfcu GfaAfgCfaGfgsUfsu	202
D-2018	CfsusGfcUfuCfaUfGfCf cCfuUfcUfaCfsusUf	203	gsUfsaGfaAfgGfgca UfgAfaGfcAfgsUfsu	204
D-2019	UfsgsCfuUfcAfuGfCfC fcUfuCfuAfcAfsusUf	205	usGfsuAfgAfaGfggc AfuGfaAfgCfasUfsu	206
D-2020	GfscsUfuCfaUfgCfCfCf uUfcUfaCfaGfsusUf	207	csUfsgUfaGfaAfggg CfaUfgAfaGfcsUfsu	208
D-2021	CfsusUfcAfuGfcCfCfUf uCfuAfcAfgUfsusUf	209	asCfsuGfuAfgAfagg GfcAfuGfaAfgsUfsu	210
D-2022	UfsusCfaUfgCfcCfUfUf cUfaCfaGfuGfsusUf	211	csAfscUfgUfaGfaag GfgCfaUfgAfasUfsu	212
D-2023	UfscsAfuGfcCfcUfUfCf uAfcAfgUfgGfsusUf	213	csCfsaCfuGfuAfgaa GfgGfcAfuGfasUfsu	214
D-2024	CfsasUfgCfcCfuUfCfUf aCfaGfuGfgCfsusUf	215	gsCfscAfcUfgUfaga AfgGfgCfaUfgsUfsu	216
D-2025	AfsusGfcCfcUfuCfUfA fcAfgUfgGfcCfsusUf	217	gsGfscCfaCfuGfuag AfaGfgGfcAfusUfsu	218

D-2026	UfsgsCfcCfuUfcUfAfCf aGfuGfgCfcUfsusUf	219	asGfsgCfcAfcUfgua GfaAfgGfgCfasUfsu	220
D-2027	GfscsCfcUfuCfuAfCfAf gUfgGfcCfuUfsusUf	221	asAfsgGfcCfaCfugu AfgAfaGfgGfcsUfsu	222
D-2028	GfsgsUfaUfgUfuCfCfU fgCfuUfcAfuCfsusUf	223	gsAfsuGfaAfgCfagg AfaCfaUfaCfcsUfsu	224
D-2029	GfsusAfuGfuUfcCfUfG fcUfuCfaUfcCfsusUf	225	gsGfsaUfgAfaGfcag GfaAfcAfuAfcUfsu	226
D-2030	UfsasUfgUfuCfcUfGfC fuUfcAfuCfcCfsusUf	227	gsGfsgAfuGfaAfgca GfgAfaCfaUfasUfsu	228
D-2031	AfsusGfuUfcCfuGfCfU fuCfaUfcCfcCfsusUf	229	gsGfsgGfaUfgAfagc AfgGfaAfcAfusUfsu	230
D-2032	UfsgsUfuCfcUfgCfUfU fcAfuCfcCfcUfsusUf	231	asGfsgGfgAfuGfaag CfaGfgAfaCfasUfsu	232
D-2033	GfsusUfcCfuGfcUfUfC faUfcCfcCfuUfsusUf	233	asAfsgGfgGfaUfgaa GfcAfgGfaAfcUfsu	234
D-2034	UfsusCfcUfgCfuUfCfA fuCfcCfcUfuCfsusUf	235	gsAfsaGfgGfgAfuga AfgCfaGfgAfasUfsu	236
D-2035	UfscsCfuGfcUfuCfAfU fcCfcCfuUfcUfsusUf	237	asGfsaAfgGfgGfaug AfaGfcAfgGfasUfsu	238
D-2036	CfscsUfgCfuUfcAfUfCf cCfcUfuCfuAfsusUf	239	usAfsgAfaGfgGfgau GfaAfgCfaGfgsUfsu	240
D-2037	CfsusGfcUfuCfaUfCfCf cCfuUfcUfaCfsusUf	241	gsUfsaGfaAfgGfgga UfgAfaGfcAfgsUfsu	242
D-2038	UfsgsCfuUfcAfuCfCfCf cUfuCfuAfcAfsusUf	243	usGfsuAfgAfaGfggg AfuGfaAfgCfasUfsu	244
D-2039	UfsusCfaUfcCfcCfUfUf cUfaCfaGfuGfsusUf	245	csAfscUfgUfaGfaag GfgGfaUfgAfasUfsu	246
D-2040	UfscsAfuCfcCfcUfUfCf uAfcAfgUfgGfsusUf	247	csCfsaCfuGfuAfgaa GfgGfgAfuGfasUfsu	248
D-2041	CfsasUfcCfcCfuUfCfUf aCfaGfuGfgCfsusUf	249	gsCfscAfcUfgUfaga AfgGfgGfaUfgsUfsu	250
D-2042	UfscsCfcCfuUfcUfAfCf aGfuGfgCfcUfsusUf	251	asGfsgCfcAfcUfgua GfaAfgGfgGfasUfsu	252

D-2043	GfsasUfcAfgGfaCfCfCf gAfgCfcGfaUfsusUf	253	asUfscGfgCfuCfggg UfcCfuGfaUfcsUfsu	254
D-2044	UfsgsGfgCfuUfcUfAfC fcAfcGfuCfgUfsusUf	255	asCfsgAfcGfuGfgua GfaAfgCfcCfasUfsu	256
D-2045	GfsasGfcGfaGfcAfCfGf cCfcCfgCfaUfsusUf	257	asUfsgCfgGfgGfcgu GfcUfcGfcUfcsUfsu	258
D-2046	UfsgsCfaCfuGfcGfUfCf gGfcGfuCfcUfsusUf	259	asGfsgAfcGfcCfgac GfcAfgUfgCfasUfsu	260
D-2047	UfsgsGfaGfcAfgAfCfU fcUfgCfaGfgUfsusUf	261	asCfscUfgCfaGfagu CfuGfcUfcCfasUfsu	262
D-2048	UfsgsCfaGfgUfcCfUfCf uCfaGfaUfcUfsusUf	263	asGfsaUfcUfgAfgag GfaCfcUfgCfasUfsu	264
D-2049	CfscsCfgGfcCfaAfUfGf uCfcAfcCfaUfsusUf	265	asUfsgGfuGfgAfcu UfgGfcCfgGfgsUfsu	266
D-2050	UfsusCfuAfcAfgUfGfG fcCfuUfaUfcUfsusUf	267	asGfsaUfaAfgGfcca CfuGfuAfgAfasUfsu	268
D-2051	UfscsUfaCfaGfuGfGfCf cUfuAfuCfcUfsusUf	269	asGfsgAfuAfaGfgcc AfcUfgUfaGfasUfsu	270
D-2052	CfsusUfcCfuUfcAfGfA fgGfcGfuGfcUfsusUf	271	asGfscAfcGfcCfucu GfaAfgGfaAfgsUfsu	272
D-2053	UfsusCfcUfuCfaGfAfG fgCfgUfgCfgAfsusUf	273	usCfsgCfaCfgCfcuc UfgAfaGfgAfasUfsu	274
D-2054	GfscsGfuGfcGfaUfAfU fgUfgGfaUfgUfsusUf	275	asCfsaUfcCfaCfaua UfcGfcAfcGfcsUfsu	276
D-2055	CfsgsUfgCfgAfuAfUfG fuGfgAfuGfgAfsusUf	277	usCfscAfuCfcAfcau AfuCfgCfaCfcsUfsu	278
D-2056	UfsgsGfaUfgGfaGfGfA fgUfgAfgUfgAfsusUf	279	usCfsaCfuCfaCfucc UfcCfaUfcCfasUfsu	280
D-2057	AfscsGfuAfcCfcUfUfCf aUfuGfaUfgUfsusUf	281	asCfsaUfcAfaUfgaa GfgGfuAfcGfusUfsu	282
D-2058	UfsgsGfaCfaUfcAfCfCf aAfgCfuCfaUfsusUf	283	asUfsgAfgCfuUfggu GfaUfgUfcCfasUfsu	284
D-2059	CfsasCfcUfgCfgUfCfUf cAfgCfaUfcUfsusUf	285	asGfsaUfgCfuGfaga CfgCfaGfgUfgsUfsu	286

D-2060	AfscsCfuGfcGfuCfUfCf aGfcAfuCfcUfsusUf	287	asGfsgAfuGfcUfgag AfcGfcAfgGfusUfsu	288
D-2061	CfscsAfgAfgAfcUfGfG fuGfaCfaUfgUfsusUf	289	asCfsaUfgUfcAfcca GfuCfuCfuGfgsUfsu	290
D-2062	AfsusGfgCfuUfcCfAfG faUfaUfgCfcUfsusUf	291	asGfsgCfaUfaUfcug GfaAfgCfcAfusUfsu	292
D-2063	CfscsGfcCfuCfcAfGfGf uCfcCfaAfaUfsusUf	293	asUfsuUfgGfgAfccu GfgAfgGfcGfgsUfsu	294
D-2064	UfsasCfcUfgCfuGfGfU fgCfuGfaGfgUfsusUf	295	asCfscUfcAfgCfacc AfgCfaGfgUfasUfsu	296
D-2065	AfscsCfuGfcUfgGfUfG fcUfgAfgGfgUfsusUf	297	asCfscCfuCfaGfcac CfaGfcAfgGfusUfsu	298
D-2066	CfsusCfuCfcAfcCfUfUf uCfcCfaGfuUfsusUf	299	asAfscUfgGfgAfaag GfuGfgAfgAfgsUfs u	300
D-2067	UfsusUfuUfcAfcCfUfA faCfuAfaAfaUfsusUf	301	asUfsuUfuAfgUfuag GfuGfaAfaAfasUfsu	302
D-2068	CfgGfcCfaAfuGfUfCfc AfcCfaGfcUfsusUf	303	asGfscUfgGfuGfgac AfuUfgGfcCfgsUfsu	304
D-2069	GfgUfcCfaGfcCfUfGfa AfcUfuCfuUfsusUf	305	asAfsgAfaGfuUfcag GfcUfgGfaCfcsUfsu	306
D-2070	GfcGfgCfuUfcCfUfGfg GfcUfuCfuAfsusUf	307	usAfsgAfaGfcCfcag GfaAfgCfcGfcsUfsu	308
D-2071	GfuGfaCfaAfcGfUfAfc CfcUfuCfaUfsusUf	309	asUfsgAfaGfgGfuac GfuUfgUfcAfcsUfsu	310
D-2072	GfgUfaUfgUfuCfCfUfg CfuUfcAfuGfsusUf	311	csAfsuGfaAfgCfagg AfaCfaUfaCfcsUfsu	312
D-2073	GfuAfuGfuUfcCfUfGfc UfuCfaUfgCfsusUf	313	gsCfsaUfgAfaGfcag GfaAfcAfuAfcsUfsu	314
D-2074	UfgUfuCfcUfgCfUfUfc AfuGfcCfcUfsusUf	315	asGfsgGfcAfuGfaag CfaGfgAfaCfasUfsu	316
D-2075	GfuUfcCfuGfcUfUfCfa UfgCfcCfuUfsusUf	317	asAfsgGfgCfaUfgaa GfcAfgGfaAfcsUfsu	318
D-2076	CfcUfgCfuUfcAfUfGfc	319	usAfsgAfaGfgGfcau	320

	CfcUfuCfuAfsusUf		GfaAfgCfaGfgsUfsu	
D-2077	GfcUfuCfaUfgCfCfCfu UfcUfaCfaGfsusUf	321	csUfsgUfaGfaAfggg CfaUfgAfaGfcsUfsu	322
D-2078	CfuUfcAfuGfcCfCfUfu CfuAfcAfgUfsusUf	323	asCfsuGfuAfgAfagg GfcAfuGfaAfgsUfsu	324
D-2079	UfuCfaUfgCfcCfUfUfc UfaCfaGfuGfsusUf	325	csApscUfgUfaGfaag GfgCfaUfgAfasUfsu	326
D-2080	AfuGfgCfuUfcCfAfGfa UfaUfgCfcUfsusUf	327	asGfsgCfaUfaUfcug GfaAfgCfcAfusUfsu	328
D-2081	AfuGfcCfcUfuCfUfAfc AfgUfgGfcCfsusUf	329	gsGfscCfaCfuGfuag AfaGfgGfcAfusUfsu	330
D-2082	GfcUfuCfaUfgCfCfCfu UfcUfaCfaUfsusUf	331	asUfsgUfaGfaAfggg CfaUfgAfaGfcsUfsu	332
D-2083	{Φocφar}GfsgsAfaAfg AfcUfGfUfuCfcAfaAfa AfsusUf	1295	{Φocφar}usUfsuUf uGfgAfacaGfuCfuU fuCfcsUfsu	1296
D-2084	{GalNAc3K2AhxC6}g gsuaugUfuCfCfUfGfcu ucaugsusu	1297	{Φocφar}csAfsuGfa AfGfcaggAfaCfauac csusu	1298
D-2085	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfUfGfCfuuc augcsusu	1299	{Φocφar}gsCfsaUfg AfAfgcagGfaAfcaua csusu	1300
D-2086	{GalNAc3K2AhxC6}u guuccUfgCfUfUfCfaug cccsusu	1301	{Φocφar}asGfsgGfc AfUfgaagCfaGfgaac asusu	1302
D-2087	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucua agsusu	1303	{Φocφar}csUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1304
D-2088	{GalNAc3K2AhxC6}cu ucauGfcCfCfUfUfcuaca gususu	1305	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaggGfcAfugaa gsusu	1306
D-2089	{GalNAc3K2AhxC6}gc ggcuUfcCfUfGfGfgcuu cuasusu	1307	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccagGfaAfgcc gcsusu	1308

D-2090	{GalNAc3K2AhxC6}g uuccuGfcUfUfCfAfugc ccuususu	1309	{Φocφar}asAfsgGf gCfAfugaaGfcAfgga acsusu	1310
D-2091	{GalNAc3K2AhxC6}A fuGfgCfuUfcCfAfGfaU faUfgCfcUfsusUf	1311	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfcugGfaAfgCfc AfusUfsu	1312
D-2092	{GalNAc3K2AhxC6}cc ugcuUfcAfUfGfCfccuu cuasusu	1313	{Φocφar}usAfsgAf aGfGfgcauGfaAfgca ggsusu	1314
D-2093	{GalNAc3K2AhxC6}u ucaugCfcCfUfUfCfuaca guususu	1315	{Φocφar}asAfscUfg UfAfgaagGfgCfauga asusu	1316
D-2094	{GalNAc3K2AhxC6}u ucaugCfcCfUfUfCfuaca gugsusu	1317	{Φocφar}csAfscUfg UfAfgaagGfgCfauga asusu	1318
D-2095	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucua aususu	1319	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1320
D-2096	{GalNAc3K2AhxC6}g guccaGfcCfUfGfAfacuu cuususu	1321	{Φocφar}asAfsgAfa GfUfucagGfcUfggac csusu	1322
D-2097	{GalNAc3K2AhxC6}G fcGfgCfuUfcCfUfGfGf gcUfuCfuAfsusUf	1323	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccagGfaAfgCf cGfcsUfsu	1324
D-2098	{GalNAc3K2AhxC6}G fcGfgCfuUfcCfuGfGfgc UfuCfuAfsusUf	1325	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccAfgGfaAfg CfcGfcsUfsu	1326
D-2099	{GalNAc3K2AhxC6}G fuUfcCfuGfcUfUfCfAf ugCfcCfuUfsusUf	1327	{Φocφar}asAfsgGf gCfAfugaaGfcAfgG faAfcUfsu	1328
D-2100	{GalNAc3K2AhxC6}G fuUfcCfuGfcUfuCfAfu gCfcCfuUfsusUf	1329	{Φocφar}asAfsgGf gCfAfugAfaGfcAfg GfaAfcUfsu	1330
D-2101	{GalNAc3K2AhxC6}C	1331	{Φocφar}usAfsgAf	1332

	fcUfgCfuUfcAfUfGfCf ccUfuCfuAfsusUf		aGfGfgcauGfaAfgCf aGfgsUfsu	
D-2102	{GalNAc3K2AhxC6}C fcUfgCfuUfcAfuGfCfcc UfuCfuAfsusUf	1333	{Φocφar}usAfsgAf aGfGfgcAfuGfaAfg CfaGfgsUfsu	1334
D-2103	{GalNAc3K2AhxC6}au gcccUfuCfUfAfCfagug gcsusu	1335	{Φocφar}gsGfscCfa CfUfguagAfaGfggca ususu	1336
D-2104	{GalNAc3K2AhxC6}au ggcuUfcCfAfGfAfuaug ccususu	1337	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgcca ususu	1338
D-2105	{GalNAc3K2AhxC6}g ugacaAfcGfUfAfCfccuu caususu	1339	{Φocφar}asUfsgAfa GfGfguacGfuUfguca csusu	1340
D-2106	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfUfGfCfuuc augcsusu	1341	{Φocφar}gsCfsaUfg AfAfgcAfgGfaAfca uacsusu	1342
D-2107	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfuGfCfuucau gcsusu	1343	{Φocφar}gsCfsaUfg AfAfgcagGfaAfcaua csusu	1344
D-2108	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfuGfCfuucau gcsusu	1345	{Φocφar}gsCfsaUfg AfAfgcAfgGfaAfca uacsusu	1346
D-2109	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfUfGfCfuuc augcsusu	1347	{Φocφar}asGfsgCfa UfgAfAfgcagGfaAf cauacsusu	1348
D-2110	{GalNAc3K2AhxC6}u ggauGfuUfCfCfUfgcu ucausgsu	1349	{Φocφar}gsCfsaUfg AfaGfCfaggaAfcAfu accasusu	1350
D-2111	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfUfGfCfuuc ausgsu	1351	{Φocφar}gsCfsaUfg AfAfgcagGfaAfcaua csusu	1352
D-2112	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfUfGfCfuuc	1353	{Φocφar}gsCfsaUfg AfAfgcagGfaAfcaua	1354

	augcs{invAb}		csusu	
D-2113	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfCfUfu cUfaCfaUfsusUf	1355	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgAf aGfcsUfsu	1356
D-2114	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfcCfUfuc UfaCfaUfsusUf	1357	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagGfgCfaUfgA faGfcsUfsu	1358
D-2115	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucua aususu	1359	{Φocφar}asusguaGf AfagggCfaUfgaagcs usu	1360
D-2116	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucUf aCfaUfsusUf	1361	{Φocφar}asusguaGf AfagggCfaUfgaagcs usu	1362
D-2117	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfCfUfu cuacaususu	1363	{Φocφar}asusguaGf AfagggCfaUfgaagcs usu	1364
D-2118	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucua aususu	1365	{Φocφar}asusguaGf AfagggCfaUfgAfaG fcsUfsu	1366
D-2119	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucua aususu	1367	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgAf aGfcsUfsu	1368
D-2120	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfCfUfu cUfaCfaUfsusUf	1369	{Φocφar}asusguaGf AfagggCfaUfgaagcs usu	1370
D-2121	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfCfUfu cuacaususu	1371	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1372
D-2122	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucUf aCfaUfsusUf	1373	{Φocφar}asusguaGf AfagggCfaUfgAfaG fcsUfsu	1374
D-2123	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucUf aCfaUfsusUf	1375	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1376

D-2124	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfCfUfu cuacaususu	1377	{Φocφar}asusguaGf AfagggCfaUfgAfaG fcsUfsu	1378
D-2125	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfCfUfu cuacaususu	1379	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgAf aGfcsUfsu	1380
D-2126	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucUf aCfaUfsusUf	1381	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgAf aGfcsUfsu	1382
D-2127	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfCfUfu cUfaCfaUfsusUf	1383	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1384
D-2128	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfCfUfu cUfaCfaUfsusUf	1385	{Φocφar}asusguaGf AfagggCfaUfgAfaG fcsUfsu	1386
D-2129	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfg[dC]CfCfuucua caususu	1387	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1388
D-2130	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCf[dC]Ufucu acaususu	1389	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1390
D-2131	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCf[dC]CfUfucu acaususu	1391	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1392
D-2132	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucuac aususu	1393	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagGfgCfaUfgaa gcsusu	1394
D-2133	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucuaca ususu	1395	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1396
D-2134	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucuaca ususu	1397	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagGfgCfaUfgaa gcsusu	1398
D-2135	{GalNAc3K2AhxC6}G	1399	{Φocφar}asUfsgUfa	1400

	fscsUfuCfaUfgCfcCfUf ucUfaCfaUfsusUf		GfAfagggCfaUfgAf aGfcsUfsu	
D-2136	{GalNAc3K2AhxC6}G fscsUfuCfaUfgCfcCfU fucUfaCfaUfsusUf	1401	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagGfgCfaUfgA faGfcsUfsu	1402
D-2137	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucua agsusu	1403	{Φocφar}asAfscUfg UfaGfAfagggCfaUf gaagsusu	1404
D-2138	{GalNAc3K2AhxC6}cu gcuuCfaUfGfCfcCfcuuc acsasu	1405	{Φocφar}asUfsgUfa GfaAfGfggcaUfgAf agcagsusu	1406
D-2139	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucua sasusu	1407	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1408
D-2140	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucua aus{invAb}	1409	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1410
D-2141	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucua auuus{invAb}	1411	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1412
D-2142	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucua aususu	1413	{Φocφar}AfsusGfu AfgAfagggCfaUfgaa gcsusu	1414
D-2143	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfuCfu acaususu	1415	{Φocφar}AfsusGfu AfgAfagggCfaUfgaa gcsusu	1416
D-2144	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaugCfcCfUfucua usususu	1417	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1418
D-2145	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucua aususu	1419	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaugaagc susu	1420
D-2146	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfcCfUfucua	1421	{Φocφar}asusgUfa GfAfagggCfaUfgaag	1422

	aususu		csusu	
D-2147	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucuac aususu	1423	{Φocφar}asUfsgUfa gAfagggCfaUfgaagc susu	1424
D-2148	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucuac aususu	1425	{Φocφar}asusgUfag AfagggCfaUfgaagcs usu	1426
D-2149	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucuac aususu	1427	{Φocφar}asUfsguag AfagggCfaUfgaagcs usu	1428
D-2150	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfCfUfucuac aususu	1429	{Φocφar}asusguag AfagggCfaUfgaagcs usu	1430
D-2151	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfUfGfCfuuc augcuus{invAb}	1431	{Φocφar}gsCfsaUfg AfAfgcagGfaAfcaua csusu	1432
D-2152	{GalNAc3K2AhxC6}g guaugUfuCfCfUfGfcuu cauususu	1433	{Φocφar}aAfsuGfa AfGfcaggAfaCfauac csusu	1434
D-2153	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfUfGfCfuuc augususu	1435	{Φocφar}asCfsaUfg AfAfgcagGfaAfcaua csusu	1436
D-2154	{GalNAc3K2AhxC6}cg gccaAfuGfUfCfCfaccag cususu	1437	{Φocφar}asGfscUfg GfUfggacAfuUfggcc gsusu	1438
D-2155	{GalNAc3K2AhxC6}u ggagcAfgAfCfUfCfugc aggususu	1439	{Φocφar}asCfscUfg CfAfgaguCfuGfcucc asusu	1440
D-2156	{GalNAc3K2AhxC6}ac guacCfcUfUfCfAfuuga ugususu	1441	{Φocφar}aCfsaUfc AfAfugaaGfgGfuacg usususu	1442
D-2157	{GalNAc3K2AhxC6}cc agagAfcUfGfGfUfgaca ugususu	1443	{Φocφar}asCfsaUfg UfCfaccaGfuCfucug gsusu	1444

D-2158	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCfU fUfucuacaususu	1445	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag csusu	1446
D-2159	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCfU fUfucuacaususu	1447	{Φocφar}asAfsaUfg UfaGfAfaaggCfaUfg aagcsusu	1448
D-2160	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCfU UfUfCfuacaususu	1449	{Φocφar}asAfsaUfg UfAfgaaaGfgCfaUfg aagcsusu	1450
D-2161	{GalNAc3K2AhxC6}u gcuucAfuGfCfCfUfuuc uacaususu	1451	{Φocφar}usGfsuAf gAfAfaggcAfuGfaag casusu	1452
D-2162	{GalNAc3K2AhxC6}ua uguuCfcUfGfCfUfucau gcususu	1453	{Φocφar}asGfscAfu GfAfagcaGfgAfacau asusu	1454
D-2163	{GalNAc3K2AhxC6}u uccugCfuUfCfAfUfgcc uuuususu	1455	{Φocφar}asAfsaAfg GfCfaugaAfgCfagga asusu	1456
D-2164	{GalNAc3K2AhxC6}uc augcCfuUfUfCfUfacagu gususu	1457	{Φocφar}asCfscCfu GfUfagaaAfgGfcaug asusu	1458
D-2165	{GalNAc3K2AhxC6}ca ugccUfuUfCfUfAfcagu ggususu	1459	{Φocφar}asCfscAfc UfGfuagaAfaGfgcau gsusu	1460
D-2166	{GalNAc3K2AhxC6}au gccuUfuCfUfAfCfagug gcususu	1461	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguagAfaAfggca ususu	1462
D-2167	{GalNAc3K2AhxC6}g guaugUfuCfCfUfGfcuu cauasusu	1463	{Φocφar}usAfsuGf aAfGfcaggAfaCfaua ccsusu	1464
D-2168	{GalNAc3K2AhxC6}g uauguUfcCfUfGfCfuuc augasusu	1465	{Φocφar}usCfsaUfg AfAfgcagGfaAfcaua csusu	1466
D-2169	{GalNAc3K2AhxC6}ua	1467	{Φocφar}usGfscAf	1468

	uguuCfcUfGfCfUfucau gcasusu		uGfAfagcaGfgAfaca uasusu	
D-2170	{GalNAc3K2AhxC6}u uccugCfuUfCfAfUfgcc uuuasusu	1469	{Φocφar}usAfsaAf gGfCfaugaAfgCfagg aasusu	1470
D-2171	{GalNAc3K2AhxC6}cu gcuuCfaUfGfCfCfuuc uaasusu	1471	{Φocφar}usUfsaGfa AfAfggcaUfgAfagca gsusu	1472
D-2172	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfUfUfucac aasusu	1473	{Φocφar}usUfsgUf aGfAfaaggCfaUfgaa gsusu	1474
D-2173	{GalNAc3K2AhxC6}u ucaugCfcUfUfUfCfuaca guasusu	1475	{Φocφar}usAfscUf gUfAfgaaaGfgCfaug aasusu	1476
D-2174	{GalNAc3K2AhxC6}uc augcCfuUfUfCfUfacagu gasusu	1477	{Φocφar}usCfsaCfu GfUfagaaAfgGfcaug asusu	1478
D-2175	{GalNAc3K2AhxC6}ca ugccUfuUfCfUfAfcagu ggasusu	1479	{Φocφar}usCfscAfc UfGfuagaAfaGfgcau gsusu	1480
D-2176	{GalNAc3K2AhxC6}au gccuUfuCfUfAfCfagug gcasusu	1481	{Φocφar}usGfscCfa CfUfguagAfaAfggca ususu	1482
D-2177	{GalNAc3K2AhxC6}ac guacCfcUfUfCfAfuuga ugasusu	1483	{Φocφar}usCfsaUfc AfAfugaaGfgGfuacg ususu	1484
D-2178	{GalNAc3K2AhxC6}cc agagAfcUfGfGfUfgaca ugasusu	1485	{Φocφar}usCfsaUfg UfCfaccaGfuCfucug gsusu	1486
D-2179	{GalNAc3K2AhxC6}au ggcuUfcCfAfGfAfuaug ccasusu	1487	{Φocφar}usGfsgCfa UfAfucugGfaAfgcca ususu	1488
D-2180	{GalNAc3K2AhxC6}g uuccuGfcUfUfCfAfugc	1489	{Φocφar}asAfsaGfg CfAfugaaGfcAfggaa	1490

	cuuususu		csusu	
D-2181	{GalNAc3K2AhxC6}cc ugcuUfcAfUfGfCfcuuu cuasusu	1491	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcauGfaAfgca ggsusu	1492
D-2182	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfgCfCfUfUfucua aususu	1493	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag csusu	1494
D-2183	{GalNAc3K2AhxC6}cu ucauGfcCfUfUfUfcuaca gususu	1495	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1496
D-2184	{GalNAc3K2AhxC6}u ucaugCfcUfUfUfCfuaca guususu	1497	{Φocφar}asAfscUfg UfAfgaaaGfgCfauga asusu	1498
D-2185	{GalNAc3K2AhxC6}gc uucaUfcCfCfUfUfucua aususu	1499	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggGfaUfgaag csusu	1500
D-2186	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCfC fUfucuaaususu	1501	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1502
D-2187	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCfC fUfucuaaususu	1503	{Φocφar}asAfsaUfg UfaGfAfagggCfaUf gaagcsusu	1504
D-2188	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfcCf UfUfCfuacaususu	1505	{Φocφar}asAfsaUfg UfAfgaagGfgCfaUf gaagcsusu	1506
D-2189	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcggcuUfcCfUfG fGfgcuucuasusu	1507	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccagGfaAfgcc gsusu	1508
D-2190	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]CfuGfcGfgCfuUf cCfuGfGfgcUfuCfsusAf	1509	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccAfgGfaAfg CfcGfcAfgsUfsu	1510
D-2191	{GalNAc3K2AhxC6}cu gcggCfuUfCfCfUfgggc uucus{invAb}	1511	{Φocφar}usAfsgAf aGfcCfCfaggaAfgCf cgcagsusu	1512

D-2192	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]cugcgGcFuUfCfC fUfggGcuucsusa	1513	{Φocφar}usAfsgAf aGfcCfCfaggaAfgCf cgcagsusu	1514
D-2193	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcggGcuUfcCfUfG fGfgcUfuCfuAfsusUf	1515	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccagGfaAfgcc gcsusu	1516
D-2194	{GalNAc3K2AhxC6}cu gcggCfuUfCfCfUfggGf cUfuCfus{invAb}	1517	{Φocφar}usAfsgAf aGfcCfCfaggaAfgCf cgcagsusu	1518
D-2195	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]cugcgGcFuUfCfC fUfggGfcUfuCfsusAf	1519	{Φocφar}usAfsgAf aGfcCfCfaggaAfgCf cgcagsusu	1520
D-2196	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]GfcGfgCfuUfcCf uGfGfgcUfuCfuAfsusU f	1521	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccAfgGfaAfg CfcGfcsUfsu	1522
D-2197	{GalNAc3K2AhxC6}C fuGfcGfgCfuUfcCfUfg gGfcUfuCfus{invAb}	1523	{Φocφar}usAfsgAf aGfcCfCfagGfaAfg CfcGfcAfgsUfsu	1524
D-2198	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]CfuGfcGfgCfuUf cCfUfggGfcUfuCfsusAf	1525	{Φocφar}usAfsgAf aGfcCfCfagGfaAfg CfcGfcAfgsUfsu	1526
D-2199	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]GfcGfgCfuUfcCf UfGfGfgGcuucasusu	1527	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccagGfaAfgCf cGfcsUfsu	1528
D-2200	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]CfuGfcGfgCfuUf CfCfUfggGcuucsusa	1529	{Φocφar}usAfsgAf aGfcCfCfaggaAfgCf cGfcAfgsUfsu	1530
D-2201	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]cugcgGcuUfcCfU fGfGfgcUfuCfusAf	1531	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccagGfaAfgcc gcagsusu	1532
D-2202	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]CfuGfcGfgCfuUf cCfUfGfGfgGcuucsusa	1533	{Φocφar}usAfsgAf aGfCfccagGfaAfgCf cGfcAfgsUfsu	1534

D-2203	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]auggcuUfcCfAfG fAfuaugccususu	1535	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgcca ususu	1536
D-2204	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]AfcAfuGfgCfuUf cCfaGfAfuaUfgCfscsUf	1537	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucUfgGfaAfgC fcAfuGfusUfsu	1538
D-2205	{GalNAc3K2AhxC6}ac auggCfuUfCfCfAfgaua ugccs{invAb}	1539	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfCfuggaAfgCfc augususu	1540
D-2206	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]acauggCfuUfCfC fAfgauaugcscsu	1541	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfCfuggaAfgCfc augususu	1542
D-2207	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]auggcuUfcCfAfG fAfuaUfgCfcUfsusUf	1543	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgcca ususu	1544
D-2208	{GalNAc3K2AhxC6}ac auggCfuUfCfCfAfgaUf aUfgCfcs{invAb}	1545	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfCfuggaAfgCfc augususu	1546
D-2209	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]acauggCfuUfCfC fAfgaUfaUfgCfscsUf	1547	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfCfuggaAfgCfc augususu	1548
D-2210	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]AfuGfgCfuUfcCf aGfAfuaUfgCfcUfsusUf	1549	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucUfgGfaAfgC fcAfuGfusUfsu	1550
D-2211	{GalNAc3K2AhxC6}A fcAfuGfgCfuUfcCfAfga UfaUfgCfcs{invAb}	1551	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfCfugGfaAfgC fcAfuGfusUfsu	1552
D-2212	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]AfcAfuGfgCfuUf cCfAfgaUfaUfgCfscsUf	1553	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfCfugGfaAfgC fcAfuGfusUfsu	1554
D-2213	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]AfuGfgCfuUfcCf AfGfAfuaugccususu	1555	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgCf cAfuGfusUfsu	1556
D-2214	{GalNAc3K2AhxC6}A	1557	{Φocφar}asGfsgCfa	1558

	fcAfuGfgCfuUfCfCfAf gauaugces{invAb}		UfaUfCfuggaAfgCfc AfuGfusUfsu	
D-2215	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]AfcAfuGfgCfuUf CfCfAfgauaugcesu	1559	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfCfuggaAfgCfc AfuGfusUfsu	1560
D-2216	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]acauggcuUfcCfAf GfAfuaugcesu	1561	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgcca ugususu	1562
D-2217	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]acauggcuUfcCfAf GfAfuaUfgCfesUf	1563	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgcca ugususu	1564
D-2218	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]AfcAfuGfgCfuUf cCfAfGfAfuaugcesu	1565	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgCf cAfuGfusUfsu	1566
D-2219	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]acguacCfcUfUfCf Afuugaugususu	1567	{Φocφar}asCfsaUfc AfAfugaaGfgGfuacg ususu	1568
D-2220	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]CfaAfcGfuAfcCf cUfuCfAfuGfaUfsgsU f	1569	{Φocφar}asCfsaUfc AfAfugAfaGfgGfuA fcGfuUfsgsUfsu	1570
D-2221	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]caacguAfcCfCfUf Ufcauugaugsu	1571	{Φocφar}asCfsaUfc AfaUfGfaaggGfuAf cguugsusu	1572
D-2222	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]acguacCfcUfUfCf AfuGfaUfgUfsusUf	1573	{Φocφar}asCfsaUfc AfAfugaaGfgGfuacg ususu	1574
D-2223	{GalNAc3K2AhxC6}ca acguAfcCfCfUfUfcaUf uGfaUfsgs{invAb}	1575	{Φocφar}asCfsaUfc AfaUfGfaaggGfuAf cguugsusu	1576
D-2224	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]AfcGfuAfcCfcUf uCfAfuGfaUfgUfsusU f	1577	{Φocφar}asCfsaUfc AfAfugAfaGfgGfuA fcGfusUfsu	1578

D-2225	{GalNAc3K2AhxC6}CfaAfcGfuAfcCfcUfUfcaUfuGfaUfsgs{invAb}	1579	{Φocφar}asCfsaUfcAfaUfGfaaGfgGfuAfcGfuUfsgsUfsu	1580
D-2226	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfaAfcGfuAfcCfcUfUfcaUfuGfaUfsgsUf	1581	{Φocφar}asCfsaUfcAfaUfGfaaGfgGfuAfcGfuUfsgsUfsu	1582
D-2227	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfcGfuAfcCfcUfUfCfAfuugaugususu	1583	{Φocφar}asCfsaUfcAfAfugaaGfgGfuAfcGfusUfsu	1584
D-2228	{GalNAc3K2AhxC6}CfaAfcGfuAfcCfcUfUfcauugaugs{invAb}	1585	{Φocφar}asCfsaUfcAfaUfGfaaggGfuAfcGfuUfsgsUfsu	1586
D-2229	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfaAfcGfuAfcCfcUfUfcauugaugsu	1587	{Φocφar}asCfsaUfcAfaUfGfaaggGfuAfcGfuUfsgsUfsu	1588
D-2230	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]caacguacCfcUfUfCfAfuugaugsu	1589	{Φocφar}asCfsaUfcAfAfugaaGfgGfuacguugsusu	1590
D-2231	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]caacguacCfcUfUfCfAfuGfaUfsgsUf	1591	{Φocφar}asCfsaUfcAfAfugaaGfgGfuacguugsusu	1592
D-2232	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfaAfcGfuAfcCfcUfUfCfAfuugaugsu	1593	{Φocφar}asCfsaUfcAfAfugaaGfgGfuAfcGfuUfsgsUfsu	1594
D-2233	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfcUfUfucuaacsasu	1595	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1596
D-2234	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfcUfUfucUfaCfsasUf	1597	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaggCfaUfgaagcagsusu	1598
D-2235	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucUfaCfaUfsusUf	1599	{Φocφar}asUfsgUfaGfAfaaGfgCfaUfgAfaGfcsUfsu	1600
D-2236	{GalNAc3K2AhxC6}[i	1601	{Φocφar}asUfsgUfa	1602

	nvAb]GfcUfuCfaUfgCf CfUfUfucuacaususu		GfAfaaggCfaUfgAfa GfcsUfsu	
D-2237	{GalNAc3K2AhxC6}C fuGfcUfuCfaUfgCfcUf UfucUfaCfsasUf	1603	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaGfgCfaUfgA faGfcAfgsUfsu	1604
D-2238	{GalNAc3K2AhxC6}C fuGfcUfuCfaUfgCfCfU fUfucuacsasu	1605	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgAfa GfcAfgsUfsu	1606
D-2239	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]CfuGfcUfuCfaUf gCfCfUfUfucuacsasu	1607	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgAfa GfcAfgsUfsu	1608
D-2240	{GalNAc3K2AhxC6}C fuGfcUfuCfaUfgCfCfU fUfucuacas{invAb}	1609	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1610
D-2241	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]CfuGfcUfuCfaUf gCfCfUfUfucuacsasu	1611	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1612
D-2242	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]cugcuucaUfgCf[d C]UfUfucuacsasu	1613	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1614
D-2243	{GalNAc3K2AhxC6}cu gcuucaUfgCfCfUfUfuc uacsasu	1615	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaGfgCfaUfgaa gcagsusu	1616
D-2244	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]cugcuucaUfgCfCf UfUfucuacsasu	1617	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaGfgCfaUfgaa gcagsusu	1618
D-2245	{GalNAc3K2AhxC6}cu gcuucaUfgCfcUfUfucua csasu	1619	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1620
D-2246	{GalNAc3K2AhxC6}cu gcuucaUfgCfcUfUfucua cas{invAb}	1621	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1622
D-2247	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]cugcuucaUfgCfc	1623	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag	1624

	UfUfucuacsasu		cagsusu	
D-2248	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacsasu	1625	{Φocφar}asUfsgUfa gAfaaggCfaUfgaagc agsusu	1626
D-2249	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas{invAb}	1627	{Φocφar}asUfsgUfa gAfaaggCfaUfgaagc agsusu	1628
D-2250	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacsasu	1629	{Φocφar}asUfsgUfa gAfaaggCfaUfgaagc agsusu	1630
D-2251	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacas{invAb}	1631	{Φocφar}asUfsguag AfaaggCfaUfgaagca gsusu	1632
D-2252	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfCfUfUfucuacsasu	1633	{Φocφar}asUfsguag AfaaggCfaUfgaagca gsusu	1634
D-2253	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfcUfUfucUfaCfaUfsusUf	1635	{Φocφar}asUfsgUfa gAfaaGfgCfaUfgAfa GfcsUfsu	1636
D-2254	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucuacaususu	1637	{Φocφar}asUfsgUfa gAfaaggCfaUfgAfa GfcsUfsu	1638
D-2255	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCfCfUfUfucuacaususu	1639	{Φocφar}asUfsgUfa gAfaaggCfaUfgaagc susu	1640
D-2256	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCfUfUfucuacaususu	1641	{Φocφar}asUfsgUfa gAfaaGfgCfaUfgaag csusu	1642
D-2257	{GalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCfUfUfucuacaususu	1643	{Φocφar}asUfsgUfa gAfaaGfgCfaUfgaag csusu	1644
D-2258	{GalNAc3K2AhxC6}cugcuucaUfgCfCfCfUfucuacsasu	1645	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag cagsusu	1646

D-2259	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCfC fUfucUfaCfaUfsusUf	1647	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1648
D-2260	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]GfcUfuCfaUfgCf cCfUfucUfaCfaUfsusUf	1649	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagGfgCfaUfgA faGfcsUfsu	1650
D-2261	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]GfcUfuCfaUfgCf CfCfUfucuacaususu	1651	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgAf aGfcsUfsu	1652
D-2262	{GalNAc3K2AhxC6}cu gcuucaUfgCfCfCfUfucu acas{invAb}	1653	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag cagsusu	1654
D-2263	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]cugcuucaUfgCfCf CfUfucuacsasu	1655	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag cagsusu	1656
D-2264	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]GfcUfuCfaUfgCf CfCfUfucuacaususu	1657	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1658
D-2265	{GalNAc3K2AhxC6}au guucCfuGfCfUfUfcaug ccususu	1659	{Φocφar}asGfsgCfa UfGfaagcAfgGfaaca usususu	1660
D-2266	{GalNAc3K2AhxC6}u guuccUfgCfUfUfCfaug ccuususu	1661	{Φocφar}asAfsgGfc AfUfgaagCfaGfgaac asusu	1662
D-2267	{GalNAc3K2AhxC6}u gccuuUfcUfAfCfAfgug gccususu	1663	{Φocφar}asGfsgCfc AfCfuguaGfaAfaggc asusu	1664
D-2268	cguacuUfcGfUfCfCfu guaugsusu	1665	{Φocφar}csAfsuAfc AfAfggacGfaAfguac gsusu	1666
D-2269	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCf[dC] CfUfucuacaususu	1667	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1668
D-2270	{GalNAc3K2AhxC6}[i	1669	{Φocφar}asUfsgUfa	1670

	nvAb]gcuucaUfgCfCfC fUfucuacaususu		GfAfagGfgCfaUfgaa gcsusu	
D-2271	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCf Ufucuacaususu	1671	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1672
D-2272	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCfC fUfucuacaususu	1673	{Φocφar}asUfsgUfa gAfagggCfaUfgaagc susu	1674
D-2273	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]gcuucaUfgCfCfC fUfucuacaususu	1675	{Φocφar}asUfsguag AfagggCfaUfgaagcs usu	1676
D-2274	{GalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]GfcUfuCfaUfgCf cCfUfucuacaususu	1677	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfagggCfaUfgaag csusu	1678
D-2275	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ccugcuUfcAfUf GfCfcuUfuCfuAfsusUf	1679	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcauGfaAfgca ggsusu	1680
D-2276	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfcUfgCfuUfcAf uGfCfcuUfuCfuAfsusU f	1681	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcAfuGfaAfg CfaGfgsUfsu	1682
D-2277	{sGalNAc3K2AhxC6} UfuCfcUfgCfuUfcAfUf gcCfuUfuCfus{invAb}	1683	{Φocφar}usAfsgAf aAfgGfCfauGfaAfg CfaGfgAfasUfsu	1684
D-2278	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfcUfgCfuUfcAf UfGfCfcuuucuasusu	1685	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcauGfaAfgCf aGfgsUfsu	1686
D-2279	{sGalNAc3K2AhxC6} UfuCfcUfgCfuUfcAfU fgccuuucus{invAb}	1687	{Φocφar}usAfsgAf aAfgGfCfaugaAfgCf aGfgAfasUfsu	1688
D-2280	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]augccuUfuCfUf AfCfaguggcsusu	1689	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguagAfaAfggca ususu	1690
D-2281	{sGalNAc3K2AhxC6}[	1691	{Φocφar}asGfscCfa	1692

	invAb]augccuUfuCfUf AfCfagUfgGfcUfsusUf		CfUfguagAfaAfggca usus	
D-2282	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfuGfcCfuUfuC fuAfCfagUfgGfcUfsus Uf	1693	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguAfgAfaAfgG fcAfusUfsu	1694
D-2283	{sGalNAc3K2AhxC6} UfcAfuGfcCfuUfuCfUf acAfgUfgGfcs{invAb}	1695	{Φocφar}asGfscCfa CfuGfUfagAfaAfgG fcAfuGfasUfsu	1696
D-2284	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfuGfcCfuUfuC fUfAfCfaguggcusus	1697	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguagAfaAfgGf cAfusUfsu	1698
D-2285	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfcAfuGfcCfuU fUfCfUfacaguggscsu	1699	{Φocφar}asGfscCfa CfuGfUfagaaAfgGfc AfuGfasUfsu	1700
D-2286	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]jugcuucAfuGfCf CfUfuucuacagsu	1701	{Φocφar}asCfsuGfu AfgAfAfaggcAfuGf aagcasusu	1702
D-2287	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf UfUfcuAfcAfgUfsusUf	1703	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1704
D-2288	{sGalNAc3K2AhxC6} UfgCfuUfcAfuGfcCfUf uuCfuAfcAfgs{invAb}	1705	{Φocφar}asCfsuGfu AfgAfAfagGfcAfuG faAfgCfasUfsu	1706
D-2289	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfuUfcAfuGfcCf UfUfUfcuacagususu	1707	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfuGfa AfgsUfsu	1708
D-2290	{sGalNAc3K2AhxC6} UfgCfuUfcAfuGfCfCfU fuucuacags{invAb}	1709	{Φocφar}asCfsuGfu AfgAfAfaggcAfuGf aAfgCfasUfsu	1710
D-2291	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfgCfuUfcAfuG fCfCfUfuucuacagsu	1711	{Φocφar}asCfsuGfu AfgAfAfaggcAfuGf aAfgCfasUfsu	1712
D-2292	{sGalNAc3K2AhxC6}[	1713	{Φocφar}asCfsuGfu	1714

	invAb]ugcuucauGfcCfU fUfUfcuacasgsu		AfGfaaagGfcAfugaa gcasusu	
D-2293	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ugcuucauGfcCfU fUfUfcuAfcAfgsUf	1715	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gcasusu	1716
D-2294	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfgCfuUfcAfuG fcCfUfUfUfcuacasgsu	1717	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfuGfa AfgCfasUfsu	1718
D-2295	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]guuccuGfcUfUf CfAfugccuuususu	1719	{Φocφar}asAfsaGfg CfAfugaaGfcAfggaa csusu	1720
D-2296	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ccugcuUfcAfUf GfCfcuuucasusu	1721	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcauGfaAfgca ggsusu	1722
D-2297	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf UfUfcuacagususu	1723	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1724
D-2298	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfuCfcUfgCfuU fcAfuGfCfcuUfuCfsusA f	1725	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcAfuGfaAfg CfaGfgAfasUfsu	1726
D-2299	{sGalNAc3K2AhxC6}u uccugCfuUfCfAfUfgcc uuucus{invAb}	1727	{Φocφar}usAfsgAf aAfgGfCfaugaAfgCf aggaasusu	1728
D-2300	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uuccugCfuUfCf AfUfgccuuucsusa	1729	{Φocφar}usAfsgAf aAfgGfCfaugaAfgCf aggaasusu	1730
D-2301	{sGalNAc3K2AhxC6}u uccugCfuUfCfAfUfgcC fuUfuCfus{invAb}	1731	{Φocφar}usAfsgAf aAfgGfCfaugaAfgCf aggaasusu	1732
D-2302	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uuccugCfuUfCf AfUfgcCfuUfuCfsusAf	1733	{Φocφar}usAfsgAf aAfgGfCfaugaAfgCf aggaasusu	1734
D-2303	{sGalNAc3K2AhxC6}[	1735	{Φocφar}usAfsgAf	1736

	invAb]UfuCfcUfgCfuU fcAfUfgcCfuUfuCfsusA f		aAfgGfCfauGfaAfg CfaGfgAfasUfsu	
D-2304	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfuCfcUfgCfuU fCfAfUfgccuuucsusa	1737	{Φocφar}usAfsgAf aAfgGfCfaugaAfgCf aGfgAfasUfsu	1738
D-2305	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uuccugcuUfcAf UfGfCfcuuucsusa	1739	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcauGfaAfgca ggaasusu	1740
D-2306	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uuccugcuUfcAf UfGfCfcuUfuCfusAf	1741	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcauGfaAfgca ggaasusu	1742
D-2307	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfuCfcUfgCfuU fcAfUfGfCfcuuucsusa	1743	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcauGfaAfgCf aGfgAfasUfsu	1744
D-2308	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfcAfuGfcCfuU fuCfuAfCfagUfgGfscsU f	1745	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguAfgAfaAfgG fcAfuGfasUfsu	1746
D-2309	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugcCfuUfUfCfUfacag uggcs{invAb}	1747	{Φocφar}asGfscCfa CfuGfUfagaaAfgGfc augasusu	1748
D-2310	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugcCfuUfUf CfUfacaguggscsu	1749	{Φocφar}asGfscCfa CfuGfUfagaaAfgGfc augasusu	1750
D-2311	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugcCfuUfUfCfUfacA fgUfgGfcs{invAb}	1751	{Φocφar}asGfscCfa CfuGfUfagaaAfgGfc augasusu	1752
D-2312	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugcCfuUfUf CfUfacAfgUfgGfscsUf	1753	{Φocφar}asGfscCfa CfuGfUfagaaAfgGfc augasusu	1754
D-2313	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfcAfuGfcCfuU fuCfUfacAfgUfgGfscsU	1755	{Φocφar}asGfscCfa CfuGfUfagAfaAfgG fcAfuGfasUfsu	1756

	f			
D-2314	{sGalNAc3K2AhxC6} UfcAfuGfcCfuUfuCfu facaguggcs{invAb}	1757	{Φocφar}asGfscCfa CfuGfUfagaaAfgGfc AfuGfasUfsu	1758
D-2315	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugccuUfuCfu fAfCfaguggscsu	1759	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguagAfaAfggca ugasusu	1760
D-2316	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugccuUfuCfu fAfCfagUfgGfcsUf	1761	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguagAfaAfggca ugasusu	1762
D-2317	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfcAfuGfcCfuU fuCfuUfAfCfaguggscsu	1763	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguagAfaAfgGf cAfuGfasUfsu	1764
D-2318	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfgCfuUfcAfuG fcCfuUfUfcuAfcAfsgsU f	1765	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaAfgGfcAfuG faAfgCfasUfsu	1766
D-2319	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucAfuGfCfCfuuc uacags{invAb}	1767	{Φocφar}asCfsuGfu AfgAfAfaggcAfuGf aagcasusu	1768
D-2320	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucAfuGfCfCfuCfu fuAfcAfgs{invAb}	1769	{Φocφar}asCfsuGfu AfgAfAfaggcAfuGf aagcasusu	1770
D-2321	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]jugcuucAfuGfCf CfUfuCfuAfcAfsgsUf	1771	{Φocφar}asCfsuGfu AfgAfAfaggcAfuGf aagcasusu	1772
D-2322	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfuUfcAfuGfcCf uUfUfcuAfcAfgUfsusU f	1773	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaAfgGfcAfuG faAfgsUfsu	1774
D-2323	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]UfgCfuUfcAfuG fcCfuUfuCfuAfcAfsgsU f	1775	{Φocφar}asCfsuGfu AfgAfAfagGfcAfuG faAfgCfasUfsu	1776

D-2324	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCf UfUfucuacausus	1777	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag csusu	1778
D-2325	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]caugccUfuUfCf UfAfcaguggusus	1779	{Φocφar}asCfscAfc UfGfuagaAfaGfgcau gsusu	1780
D-2326	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuuCfaUfGf CfCfuucuaasusu	1781	{Φocφar}usUfsaGfa AfAfggcaUfgAfagca gsusu	1782
D-2327	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCf UfUfucuacaasusu	1783	{Φocφar}usUfsgUf aGfAfaaggCfaUfgaa gsusu	1784
D-2328	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uucaugCfcUfUf UfCfuacaguasusu	1785	{Φocφar}usAfscUf gUfAfgaaaGfgCfaug aasusu	1786
D-2329	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]guuccuGfcUfUf CfAfugCfcUfuUfsusUf	1787	{Φocφar}asAfsaGfg CfAfugaaGfcAfggaa csusu	1788
D-2330	{sGalNAc3K2AhxC6}a uguucCfuGfCfUfUfcaU fgCfcUfus{invAb}	1789	{Φocφar}asAfsaGfg CfaUfGfaagcAfgGfa acausus	1790
D-2331	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]auguucCfuGfCf UfUfcaUfgCfcUfsusUf	1791	{Φocφar}asAfsaGfg CfaUfGfaagcAfgGfa acausus	1792
D-2332	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfuUfcCfuGfcU fuCfAfugCfcUfuUfsus Uf	1793	{Φocφar}asAfsaGfg CfAfugAfaGfcAfgG faAfcUfsu	1794
D-2333	{sGalNAc3K2AhxC6} AfuGfuUfcCfuGfcUfUf caUfgCfcUfus{invAb}	1795	{Φocφar}asAfsaGfg CfaUfGfaaGfcAfgG faAfcAfusUfsu	1796
D-2334	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfuGfuUfcCfuG fcUfUfcaUfgCfcUfsusU	1797	{Φocφar}asAfsaGfg CfaUfGfaaGfcAfgG faAfcAfusUfsu	1798

	f			
D-2335	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfuUfcCfuGfcU fUfCfAfugccuuususu	1799	{Φocφar}asAfsaGfg CfAfugaaGfcAfgGfa AfcUfsu	1800
D-2336	{sGalNAc3K2AhxC6} AfuGfuUfcCfuGfCfUf Ufcaugccuus{invAb}	1801	{Φocφar}asAfsaGfg CfaUfGfaagcAfgGfa AfcAfusUfsu	1802
D-2337	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfuGfuUfcCfuG fCfUfUfcaugccususu	1803	{Φocφar}asAfsaGfg CfaUfGfaagcAfgGfa AfcAfusUfsu	1804
D-2338	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]auguuccuGfcUf UfCfAfugccususu	1805	{Φocφar}asAfsaGfg CfAfugaaGfcAfggaa caususu	1806
D-2339	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]auguuccuGfcUf UfCfAfugCfcUfusUf	1807	{Φocφar}asAfsaGfg CfAfugaaGfcAfggaa caususu	1808
D-2340	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcUfuCfaUfgCf cUfuUfCfuaCfaGfsusAf	1809	{Φocφar}usAfscUf gUfAfgaAfaGfgCfa UfgAfaGfcsUfsu	1810
D-2341	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCf UfUfucuacagsusa	1811	{Φocφar}usAfscUf gUfaGfAfaaggCfaUf gaagcsusu	1812
D-2342	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]uucaugCfcUfUf UfCfuaCfaGfuAfsusUf	1813	{Φocφar}usAfscUf gUfAfgaaaGfgCfaug aasusu	1814
D-2343	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCf UfUfucUfaCfaGfsusAf	1815	{Φocφar}usAfscUf gUfaGfAfaaggCfaUf gaagcsusu	1816
D-2344	{sGalNAc3K2AhxC6} GfcUfuCfaUfgCfCfUfU fucuacagus{invAb}	1817	{Φocφar}usAfscUf gUfaGfAfaaggCfaUf gAfaGfcsUfsu	1818
D-2345	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]GfcGfgCfuUfcCf UfGfGfgcuucuasusu	1819	{Φocφar}usAfsGaf aGfCfccagGfaAfgCf cGfcsUfsu	1820

D-2346	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]auggcuUfcCfAf GfAfuaugccususu	1821	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgcca ususu	1822
D-2347	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]acauggCfuUfCfC fAfgaUfaUfgCfscsUf	1823	{Φocφar}asGfsgCfa UfaUfCfuggaAfgCfc augususu	1824
D-2348	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]AfcAfuGfgCfuU fcCfAfGfAfuaugscsu	1825	{Φocφar}asGfsgCfa UfAfucugGfaAfgCf cAfuGfusUfsu	1826
D-2349	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]caacguAfcCfCfU fUfcauugausgsu	1827	{Φocφar}asCfsaUfc AfaUfGfaaggGfuAf cguugsusu	1828
D-2350	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]caacguacCfcUfU fCfAfuUgfaUfgsUf	1829	{Φocφar}asCfsaUfc AfAfugaaGfgGfuacg uugsusu	1830
D-2351	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]acguacCfcUfUfC fAfuugaugususu	1831	{Φocφar}asCfsaUfc AfAfugaaGfgGfuacg ususu	1832
D-2352	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1833	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1834
D-2353	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucuaacsasu	1835	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1836
D-2354	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCf UfUfucUfaCfaUfsusUf	1837	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag csusu	1838
D-2355	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cUfaCfas{invAb}	1839	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1840
D-2356	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucUfaCfasUf	1841	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1842
D-2357	{sGalNAc3K2AhxC6}c	1843	{Φocφar}asUfsguag	1844

	ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}		AfaaggCfaUfgaagca gsusu	
D-2358	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucuacas{invAb}	1845	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgaag cagsusu	1846
D-2359	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCf UfUfucuacaususu	1847	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaGfgCfaUfgaa gcsusu	1848
D-2360	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfuUfcAfuGfcCf UfUfUfcuacagususu	1849	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1850
D-2361	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}	1851	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gcasusu	1852
D-2362	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucuacsasu	1853	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaGfgCfaUfgaa gcagsusu	1854
D-2363	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfcUfUfucu acas{invAb}	1855	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggcaUfgaagc agsusu	1856
D-2364	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1857	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaGfgCfaUfgaa gcagsusu	1858
D-2365	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauCfcCfUfU fUfcuacagususu	1859	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfgAfugaa gsusu	1860
D-2366	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfcCfCfU fUfucuacaususu	1861	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggGfaUfgaag csusu	1862
D-2367	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauCfcCfUfUfUfcu acags{invAb}	1863	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfgAfugaa gcasusu	1864
D-2368	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfcCfCfUfUfuc	1865	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggGfaUfgaag	1866

	uacas{invAb}		cagsusu	
D-2369	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]acauugCfUfUf UfUfcaccugasusu	1867	{Φocφar}usCfsaGfg UfGfaaagAfgCfaaug ususu	1868
D-2370	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1869	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1870
D-2371	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1871	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcasgsusu	1872
D-2372	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1873	asUfsgsUfaGfAfaag gCfaUfgaagcagsusu	1874
D-2373	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1875	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagusu	1876
D-2374	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1877	asUfsgsUfaGfAfaag gCfaUfgaagcagusu	1878
D-2375	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1879	asUfgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1880
D-2376	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1881	asUfgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcasgsusu	1882
D-2377	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacsas{invAb}	1883	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1884
D-2378	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuascas{invAb}	1885	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1886
D-2379	{sGalNAc3K2AhxC6}c sugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1887	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1888

D-2380	{sGalNAc3K2AhxC6}c susgcuucaUfgCfCfUfUf ucuacas{invAb}	1889	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	1890
D-2381	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCf[dT]UfUfcuacagususu	1891	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1892
D-2382	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf UfUfcuacagususu	1893	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaAfgGfcAfug aagsusu	1894
D-2383	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfuUf Ufcuacagususu	1895	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1896
D-2384	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf UfUfcuacagususu	1897	{Φocφar}asCfsuGfu aGfaaagGfcAfugaag susu	1898
D-2385	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf UfUfcuacagususu	1899	{Φocφar}asCfsugua GfaaagGfcAfugaags usu	1900
D-2386	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfc[dC]U fUfUfcuacagususu	1901	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1902
D-2387	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf[dT]Ufcuacagususu	1903	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1904
D-2388	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgGfGf AfUfucuacaususu	1905	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfauccCfaUfgaag csusu	1906
D-2389	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcGfAf AfUfcuacagususu	1907	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfauucGfcAfugaa gsusu	1908
D-2390	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1909	{Φocφar}usUfsgUf aGfAfaaggCfaUfgaa gcagsusu	1910
D-2391	{sGalNAc3K2AhxC6}[	1911	{Φocφar}usUfsgUf	1912

	invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucuacsasa		aGfAfaaggCfaUfgaa gcagsusu	
D-2392	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invDA}	1913	{Φocφar}usUfsgUf aGfAfaaggCfaUfgaa gcagsusu	1914
D-2393	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgGfGfAfUfu cuacas{invAb}	1915	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfauccCfaUfgaag cagsusu	1916
D-2394	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgGf GfAfUfucuacsasu	1917	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfauccCfaUfgaag cagsusu	1918
D-2395	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]CfuUfcAfuGfcCf UfUfUfcuAfcAfgUfsus Uf	1919	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfugaa gsusu	1920
D-2396	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf UfUfcuAfcAfgUfsusUf	1921	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfuGfa AfgsUfsu	1922
D-2397	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]gcuucaUfgCfCf UfUfucuacaususu	1923	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcsusu	1924
D-2398	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]jugcuucauGfcCfU fUfUfcuacags{invAb}	1925	asCfsuGfuAfGfaaag GfcAfugaagcasusu	1926
D-2399	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf UfUfcuacagususu	1927	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfuGfa AfgsUfsu	1928
D-2400	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uAfcAfgs{invAb}	1929	asCfsuGfuAfGfaaag GfcAfugaagcasusu	1930
D-2401	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}	1931	asCfsuGfuAfGfaaAf gGfcAfugaagcasusu	1932
D-2402	{sGalNAc3K2AhxC6}u	1933	asCfsuguaGfaaagGf	1934

	gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}		cAfugaagcasusu	
D-2403	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfUf UfUfcuacagususu	1935	asCfsuGfuAfGfaaag GfcAfugaagsusu	1936
D-2404	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}	1937	asCfsuGfuAfGfaaag GfcAfugaagcasusu	1938
D-2405	{GalNAc3K2AhxC6}au gccuuuCfuAfCfAfGfug gcusus{invAb}	1939	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguAfgAfaAfgG fcAfuGfasUfsu	1940
D-2406	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invAb}	1941	asGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaugasusu	1942
D-2407	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]augccuUfuCfUf AfCfaguggcususu	1943	asGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaususu	1944
D-2408	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]augccuUfuCfUf AfCfagUfgGfcUfsusUf	1945	asGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaususu	1946
D-2409	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugccuUfuCfU fAfCfaguggscsu	1947	asGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaugasusu	1948
D-2410	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag UfgGfcs{invAb}	1949	asGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaugasusu	1950
D-2411	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]augccuUfuCfUf AfCfaguggcususu	1951	asGfscCfaCfUfguAf gAfaAfggcaususu	1952
D-2412	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invAb}	1953	asGfscCfaCfUfguAf gAfaAfggcaugasusu	1954
D-2413	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag	1955	asGfscacUfguagAf aAfggcaugasusu	1956

	uggcs{invAb}			
D-2414	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugccuUfuCfU fAfCfaguggcs{invAb}	1957	asGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaugasusu	1958
D-2415	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]augccuUfuCfUf AfCfaguggcasusu	1959	usGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaususu	1960
D-2416	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invAb}	1961	usGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaugasusu	1962
D-2417	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ucaugccuUfuCfU fAfCfaguggscsa	1963	usGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaugasusu	1964
D-2418	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invDA}	1965	usGfscCfaCfUfguag AfaAfggcaugasusu	1966
D-2419	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1967	asUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	1968
D-2420	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1969	usUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	1970
D-2421	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invDA}	1971	usUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	1972
D-2422	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invAb}	1973	usGfscacUfguagAf aAfggcaugasusu	1974
D-2423	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invDA}	1975	usGfscacUfguagAf aAfggcaugasusu	1976
D-2424	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cuucauGfcCfuUf Ufcuacagususu	1977	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaAfgGfcAfug aagsusu	1978

D-2425	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1979	asUfsgUfa[Ab]Afaa ggCfaUfgaagcagsus u	1980
D-2426	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1981	asUfsgua[Ab]Afaag gCfaUfgaagcagsusu	1982
D-2427	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}	1983	asCfsuGfu[Ab]Gfaa agGfcAfugaagcasus u	1984
D-2428	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}	1985	asCfsugu[Ab]Gfaaag GfcAfugaagcasusu	1986
D-2429	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invAb}	1987	asGfscCfa[Ab]Ufgu agAfaAfggcaugasus u	1988
D-2430	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invAb}	1989	asGfscCa[Ab]Ufguag AfaAfggcaugasusu	1990
D-2431	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1991	asUfs[GNA- G]uagAfaaggCfaUfg aagcagsusu	1992
D-2432	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1993	asUfsg[GNA- U]agAfaaggCfaUfga agcagsusu	1994
D-2433	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1995	asUfsgu[GNA- A]gAfaaggCfaUfgaa gcagsusu	1996
D-2434	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1997	asUfsgua[GNA- G]AfaaggCfaUfgaag cagsusu	1998
D-2435	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	1999	asUfsguag[GNA- A]aaggCfaUfgaagca gsusu	2000
D-2436	{sGalNAc3K2AhxC6}c	2001	asUfsguagAf[GNA-	2002

	ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}		A]aggCfaUfgaagcag susu	
D-2437	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2003	asUfsgUfagAfaaggC faUfgaagcagsusu	2004
D-2438	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucuacsasu	2005	asUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	2006
D-2439	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucuacas{invAb}	2007	asUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	2008
D-2440	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2009	asUfsguagAfaaGfgC faUfgaagcagsusu	2010
D-2441	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cUfaCfas{invAb}	2011	asUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	2012
D-2442	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucUfaCfasUf	2013	asUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	2014
D-2443	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cUfaCfas{invAb}	2015	asUfsguagAfaaGfgC faUfgaagcagsusu	2016
D-2444	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2017	asUfsgUfaGfAfaaGf gCfaUfgaagcagsusu	2018
D-2445	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucuacsasu	2019	asUfsgUfaGfAfaaGf gCfaUfgaagcagsusu	2020
D-2446	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]cugcuucaUfgCfC fUfUfucuacas{invAb}	2021	asUfsgUfaGfAfaagg CfaUfgaagcagsusu	2022
D-2447	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu	2023	as[Ab]guagAfaaggC faUfgaagcagsusu	2024

	cuacas{invAb}			
D-2448	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2025	asUfs[Ab]uagAfaag gCfaUfgaagcagsusu	2026
D-2449	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2027	asUfsg[Ab]agAfaag gCfaUfgaagcagsusu	2028
D-2450	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2029	asUfsgu[Ab]gAfaag gCfaUfgaagcagsusu	2030
D-2451	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2031	asUfsguag[Ab]aagg CfaUfgaagcagsusu	2032
D-2452	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2033	asUfsguagAf[Ab]ag gCfaUfgaagcagsusu	2034
D-2453	{sGalNAc3K2AhxC6}c aacguacCfcUfUfCfAfu gaugs{invAb}	2035	asCfsaucaAfugaaGf gGfuacguugsusu	2036
D-2454	{sGalNAc3K2AhxC6}c aacguacCfcUfUfCfAfu gaugs{invAb}	2037	asCfsaUfcAfAfugaa GfgGfuacguugsusu	2038
D-2455	{sGalNAc3K2AhxC6}a cauggcuUfcCfAfGfAfu augccs{invAb}	2039	asGfsgcauAfucugGf aAfgccaugususu	2040
D-2456	{sGalNAc3K2AhxC6}a cauggcuUfcCfAfGfAfu augccs{invAb}	2041	asGfsgCfaUfAfucug GfaAfgccaugususu	2042
D-2457	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2043	asUfsguaGfAfaaggC faUfgaagcagsusu	2044
D-2458	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cUfacas{invAb}	2045	asUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	2046

D-2459	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuaCfas{invAb}	2047	asUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	2048
D-2460	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcgguUfcCfUfGfGfg cuucus{invAb}	2049	usAfsgAfaGfCfccag GfaAfgccgcagsusu	2050
D-2461	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcgguUfcCfUfGfGfg cuucus{invAb}	2051	usAfsgaagCfccagGf aAfgccgcagsusu	2052
D-2462	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}	2053	asCfsuGfuaGfaaagG fcAfugaagcasusu	2054
D-2463	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ugcuucauGfcCfU fUfUfcuacagsu	2055	asCfsuGfuaGfaaagG fcAfugaagcasusu	2056
D-2464	{sGalNAc3K2AhxC6}[invAb]ugcuucauGfcCfU fUfUfcuacags{invAb}	2057	asCfsuGfuaGfaaagG fcAfugaagcasusu	2058
D-2465	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}	2059	asCfsuGfuaGfaaAfg GfcAfugaagcasusu	2060
D-2466	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uAfcAfgs{invAb}	2061	asCfsuGfuaGfaaagG fcAfugaagcasusu	2062
D-2467	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uAfcAfgs{invAb}	2063	asCfsuGfuAfGfaaag GfcAfuGfaAfgCfas Ufsu	2064
D-2468	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuuCfaUfGfCfcuuucu acsasu	2065	asUfsguaGfaaAfggc aUfgAfagcagsusu	2066
D-2469	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuuCfaUfGfCfcuuucu acsasu	2067	asUfsguaGfaaaggca UfgAfagcagsusu	2068
D-2470	{sGalNAc3K2AhxC6}c	2069	asUfsguaGfaAfAfgg	2070

	ugcuuCfaUfGfCfcuuucu acsasu		caUfgAfacgagsusu	
D-2471	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invAb}	2071	usCfsuguaGfaagGf cAfugaagcasusu	2072
D-2472	{sGalNAc3K2AhxC6}u gcuucauGfcCfUfUfUfc uacags{invDA}	2073	usCfsuguaGfaagGf cAfugaagcasusu	2074
D-2473	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invDT}	2075	asUfsguagAfaaggCf aUfgaagcagsusu	2076
D-2474	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2077	asUfsguagAf[sGNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2078
D-2475	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2079	asUfsguagAfs[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2080
D-2476	{sGalNAc3K2AhxC6}c ugcuucaUfgCfCfUfUfu cuacas{invAb}	2081	asUfsguagAfs[sGN A- A]aggCfaUfgaagcag susu	2082
D-2477	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2083	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2084
D-2478	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2085	asUfsguagAf[GNA- A]AfggCfaUfgaagca gsusu	2086
D-2479	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2087	asUfsguaga[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2088
D-2480	csusgcuucaUfgCfCfUfu ucuacas{invAb}	2089	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2090
D-2481	csusgcuucaUfgCfCfUfu	2091	asUfsguaga[GNA-	2092

	ucuacas{invAb}		A]aggCfaUfgaagcag susu	
D-2482	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2093	asUfsguaga[GNA- A]AfggCfaUfgaagca gsusu	2094
D-2483	csusgcuucaUfgCfCfUfu ucuacas{invAb}	2095	asUfsguagAf[GNA- A]AfggCfaUfgaagca gsusu	2096
D-2484	csusgcuucaUfgCfCfUfu ucuacas{invAb}	2097	asUfsguaga[GNA- A]AfggCfaUfgaagca gsusu	2098
D-2485	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2099	asUfsgUfaGfAf[GN A- A]aggCfaUfgaagcag susu	2100
D-2486	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2101	asUfsgUfagAf[GNA - A]aGfgCfaUfgaagca gsusu	2102
D-2487	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2103	asUfsgUfagAf[GNA - A]aggCfaUfgaagcag susu	2104
D-2488	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2105	asUfsgUfaGfAf[GN A- A]aGfgCfaUfgaagca gsusu	2106
D-2489	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2107	asUfsguagAf[GNA- A]aGfgCfaUfgaagca gsusu	2108
D-2490	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucUfaCfas{invAb}	2109	asUfsguagAf[GNA- A]aGfgCfaUfgaagca gsusu	2110
D-2491	csusgcuucaUfgCfCfUfU	2111	asUfsguagAf[GNA-	2112

	fucuacas{invAb}		A]a[dG]gCfaUfgaag cagsusu	
D-2492	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2113	asUfsguagAf[GNA- A][dA]ggCfaUfgaag cagsusu	2114
D-2493	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2115	asUfsguagAf[GNA- A]ag[dG]CfaUfgaag cagsusu	2116
D-2494	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2117	asUfsguaGfAf[GNA - A]aggCfaUfgaagcag susu	2118
D-2495	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2119	asUfsguaGfa[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2120
D-2496	csusgcuucaUfgCfCfUfU fucuacas{invAb}	2121	asUfsguaGfa[GNA- A]AfggCfaUfgaagca gsusu	2122
D-2497	csusgcuuCfaUfGfCfcuu ucuacas{invAb}	2123	asUfsguaGfa[GNA- A]aggcaUfgAfagcag susu	2124
D-2498	csusgcuuCfaUfGfCfcuu ucuacas{invAb}	2125	asUfsguaGfa[GNA- A]AfggcaUfgAfagca gsusu	2126
D-2499	csusgcuuCfaUfgCfcuuu cuacas{invAb}	2127	asUfsguaga[GNA- A]aggCfaUfgAfagca gsusu	2128
D-2500	csusgcuuCfaUfgCfcuuu cuacas{invAb}	2129	asUfsguagaaaggCfa UfgAfagcagsusu	2130
D-2501	usgscuucGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2131	us[sGNA- C]uguaGfaaagGfcAf ugaagcasusu	2132
D-2502	usgscuucGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2133	usCfs[GNA- U]guaGfaaagGfcAfu	2134

			gaagcasusu	
D-2503	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2135	usCfsug[GNA- U]aGfaaagGfcAfuga agcasusu	2136
D-2504	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2137	usCfsugu[GNA- A]GfaaagGfcAfugaa gcasusu	2138
D-2505	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2139	usCfsuguaGf[GNA- A]aagGfcAfugaagca susu	2140
D-2506	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2141	us[Ab]uguaGfaaagG fcAfugaagcasusu	2142
D-2507	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2143	usCfs[Ab]guaGfaaag GfcAfugaagcasusu	2144
D-2508	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2145	usCfsu[Ab]uaGfaaag GfcAfugaagcasusu	2146
D-2509	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2147	usCfsug[Ab]aGfaaag GfcAfugaagcasusu	2148
D-2510	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2149	usCfsugu[Ab]Gfaaa gGfcAfugaagcasusu	2150
D-2511	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2151	usCfsugua[Ab]aaag GfcAfugaagcasusu	2152
D-2512	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2153	usCfsuguaGf[Ab]aa gGfcAfugaagcasusu	2154
D-2513	uscsaugccuUfuCfUfAfC faguggcs{invDT}	2155	asGfscacUfguagAf aAfggcaugasusu	2156
D-2514	uscsaugccuUfuCfUfAfC faguggcs{invAb}	2157	usGfscacUfguagAf aAfggcaugasusu	2158
D-2515	uscsaugccuUfuCfUfAfC faguggcs{invDA}	2159	usGfscacUfguagAf aAfggcaugasusu	2160
D-2516	uscsaugccuUfuCfUfAfC fuuucas{invDT}	2161	asUfsagaaAfggcaUf gAfacaggasusu	2162
D-2517	uscsaugccuUfuCfUfAfC fuuucas{invAb}	2163	usUfsagaaAfggcaUf gAfacaggasusu	2164

D-2518	uscscugcuuCfaUfGfCfC fuuucas{invDA}	2165	usUfsagaaAfggcaUf gAfacgaggasusu	2166
D-2519	usasuguuccUfgCfUfUf Cfaugccus{invDT}	2167	asAfsaggcaUfgaagCf aGfgaacauasusu	2168
D-2520	usasuguuccUfgCfUfUf Cfaugccus{invAb}	2169	usAfsaggcaUfgaagCf aGfgaacauasusu	2170
D-2521	usasuguuccUfgCfUfUf Cfaugccus{invDA}	2171	usAfsaggcaUfgaagCf aGfgaacauasusu	2172
D-2522	{sGalNAc3K2AhxC6}u ccugcuuCfaUfGfCfCfu ucas{invAb}	2173	asUfsagaaAfggcaUf gAfacgaggasusu	2174
D-2523	{sGalNAc3K2AhxC6}u auguuccUfgCfUfUfCfa ugccus{invAb}	2175	asAfsaggcaUfgaagCf aGfgaacauasusu	2176
D-2524	{sGalNAc3K2AhxC6}u caugccuUfuCfUfAfCfag uggcs{invDT}	2177	asGfscacUfaguagAf aAfggcaugasusu	2178
D-2525	{sGalNAc3K2AhxC6}u ccugcuuCfaUfGfCfCfu ucas{invDT}	2179	asUfsagaaAfggcaUf gAfacgaggasusu	2180
D-2526	{sGalNAc3K2AhxC6}u ccugcuuCfaUfGfCfCfu ucas{invDA}	2181	usUfsagaaAfggcaUf gAfacgaggasusu	2182
D-2527	{sGalNAc3K2AhxC6}u auguuccUfgCfUfUfCfa ugccus{invDA}	2183	usAfsaggcaUfgaagCf aGfgaacauasusu	2184
D-2528	usgscuucGfcCfUfUf Ufcuacags{invDA}	2185	usCfsugua[GNA- G]aaagGfcAfugaagc asusu	2186
D-2529	cugcuucaUfgCfCfUfUfs ucuacas{invAb}	2187	asUfsaguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2188
D-2530	cugcuucaUfgCfCfUfsUf ucuacas{invAb}	2189	asUfsaguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag	2190

			susu	
D-2531	cugcuucaUfgCfCfUfsUf sucuacas{invAb}	2191	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2192
D-2532	cugcuucaUfgCfCfUfsUf ucuacas{invAb}	2193	asUfsguagAfs[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2194
D-2533	cugcuucaUfgCfCfUfsUf sucuacas{invAb}	2195	asUfsguagAfs[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2196
D-2534	cugcuucaUfgCfCfUfUfs ucuacas{invAb}	2197	asUfsguagAf[sGNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2198
D-2535	cugcuucaUfgCfCfUfsUf sucuacas{invAb}	2199	asUfsguagAf[sGNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2200
D-2536	cugcuucaUfgCfCfUfUfs ucuacas{invAb}	2201	asUfsguagAfs[sGN A- A]aggCfaUfgaagcag susu	2202
D-2537	cugcuucaUfgCfCfUfsUf ucuacas{invAb}	2203	asUfsguagAfs[sGN A- A]aggCfaUfgaagcag susu	2204
D-2538	cugcuucaUfgCfCfUf[L NA-T]ucuacas{invAb}	2205	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2206
D-2539	cugcuucaUfgCfCf[LNA -T]Ufucuacas{invAb}	2207	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2208
D-2540	cugcuucaUfgCfCfUfUf[L NA-T]cuacas{invAb}	2209	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2210
D-2541	cugcuucaUfgCfCfUfUf	2211	asUfsgu[GNA-	2212

	uc[LNA-T]acas{invAb}		A]gAfaaggCfaUfgaa gcagsusu	
D-2542	cugcuucaUfgCfCfUfUf ucu[LNA- A]cas{invAb}	2213	asUfsg[GNA- U]agAfaaggCfaUfga agcagsusu	2214
D-2543	cugcuucaUfgCfCfUfUf ucuac[sLNA- A]{invAb}	2215	as[sGNA- U]guagAfaaggCfaUf gaagcagsusu	2216
D-2544	cugcuucaUfgCfCfUfUf[LNA-T]cuacas{invAb}	2217	asUfsguag[Ab]aagg CfaUfgaagcagsusu	2218
D-2545	cugcuucaUfgCfCfUfUf uc[LNA-T]acas{invAb}	2219	asUfsgu[Ab]gAfaag gCfaUfgaagcagsusu	2220
D-2546	cugcuucaUfgCfCfUfUf ucu[LNA- A]cas{invAb}	2221	asUfsg[Ab]agAfaag gCfaUfgaagcagsusu	2222
D-2547	cugcuucaUfgCfCfUfUf ucUfaCfas{invAb}	2223	asUfsgUfagAf[GNA - A]aggCfaUfgaagcag susu	2224
D-2548	cugcuucaUfgCfCfUfUf ucUfaCfas{invAb}	2225	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2226
D-2549	cugcuucaUfgCfCfUfs[L NA-T]ucuacas{invAb}	2227	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2228
D-2550	cugcuucaUfgCfCfUfs[s LNA- T]ucuacas{invAb}	2229	asUfsguagAf[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2230
D-2551	cugcuucaUfgCfCfUf[L NA-T]ucuacas{invAb}	2231	asUfsguagAf[sGNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2232
D-2552	cugcuucaUfgCfCfUf[L NA-T]ucuacas{invAb}	2233	asUfsguagAfs[GNA- A]aggCfaUfgaagcag susu	2234

D-2553	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcu[LNA- A]cags{invDA}	2235	usCfsug[Ab]aGfaaag GfcAfugaagcasusu	2236
D-2554	usgscuucauGfcCfUfUf Ufc[LNA- T]acags{invDA}	2237	usCfsugu[Ab]Gfaaa gGfcAfugaagcasusu	2238
D-2555	usgscuucauGfcCfUfUf[LNA- T]cuacags{invDA}	2239	usCfsuguaGf[Ab]aa gGfcAfugaagcasusu	2240
D-2556	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuac[LNA- A]gs{invDA}	2241	usCfs[GNA- U]guaGfaaagGfcAfu gaagcasusu	2242
D-2557	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcu[LNA- A]cags{invDA}	2243	usCfsug[GNA- U]aGfaaagGfcAfuga agcasusu	2244
D-2558	usgscuucauGfcCfUfUf Ufc[LNA- T]acags{invDA}	2245	usCfsugu[GNA- A]GfaaagGfcAfugaa gcasusu	2246
D-2559	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuaca[sLNA- G]{invDA}	2247	us[Ab]uguaGfaaagG fcAfugaagcasusu	2248
D-2560	usgscuucauGfcCfUfUf Ufcuac[LNA- A]gs{invDA}	2249	usCfs[Ab]guaGfaaag GfcAfugaagcasusu	2250
D-2561	ucaugccuUfuCfUfAfCfa [LNA-G]uggcs{invAb}	2251	asGfscca[Ab]Ufguag AfaAfggcaugasusu	2252
D-2562	ucaugccuUfuCfUfAfCfa g[LNA-T]ggcs{invAb}	2253	asGfscca[Ab]Ufguag AfaAfggcaugasusu	2254
D-2563	ucaugccuUfuCfUfAfCfa sgsuggcs{invAb}	2255	asGfscca[Ab]Ufguag AfaAfggcaugasusu	2256
D-2564	{GalNAc3K2AhxC6}G fgUfaUfgUfuCfCfUfGf cuUfcAfuUfsusUf	2349	{Φocφar}asAfsuGfa AfGfcaggAfaCfaUfa CfcsUfsu	2350
D-2565	{GalNAc3K2AhxC6}G	2351	{Φocφar}usAfsuGf	2352

	fgUfaUfgUfuCfCfUfGf cuUfcAfuAfsusUf		aAfGfcaggAfaCfaUf aCfcsUfsu	
D-2566	{GalNAc3K2AhxC6}G fuAfuGfuUfcCfUfGfCf uuCfaUfgUfsusUf	2353	{Φocφar}asCfsaUfg AfAfgcagGfaAfcAf uAfcUfsu	2354
D-2567	{GalNAc3K2AhxC6}U faUfgUfuCfCfUfGfCfUf ucAfuGfcAfsusUf	2355	{Φocφar}usGfscAf uGfAfgcaGfgAfaCf aUfasUfsu	2356
D-2568	{GalNAc3K2AhxC6}A fuGfuUfcCfuGfCfUfUf caUfgCfcUfsusUf	2357	{Φocφar}asGfsgCfa UfGfaagcAfgGfaAfc AfusUfsu	2358
D-2569	{GalNAc3K2AhxC6}U fgUfuCfcUfgCfUfUfCf auGfcCfuUfsusUf	2359	{Φocφar}asAfsgGfc AfUfgaagCfaGfgAfa CfasUfsu	2360
D-2570	{GalNAc3K2AhxC6}G fuUfcCfuGfcUfUfCfAf ugCfcUfuUfsusUf	2361	{Φocφar}asAfsaGfg CfAfugaaGfcAfgGfa AfcUfsu	2362
D-2571	{GalNAc3K2AhxC6}U fuCfcUfgCfuUfCfAfUf gcCfuUfuUfsusUf	2363	{Φocφar}asAfsaAfg GfCfaugaAfgCfaGfg AfasUfsu	2364
D-2572	{GalNAc3K2AhxC6}U fuCfcUfgCfuUfCfAfUf gcCfuUfuAfsusUf	2365	{Φocφar}usAfsaAf gGfCfaugaAfgCfaGf gAfasUfsu	2366
D-2573	{GalNAc3K2AhxC6}U fcCfuGfcUfuCfAfUfGf ccUfuUfcUfsusUf	2367	{Φocφar}asGfsaAfa GfGfcaugAfaGfcAf gGfasUfsu	2368
D-2574	{GalNAc3K2AhxC6}C fcUfgCfuUfcAfUfGfCf cuUfuCfuAfsusUf	2369	{Φocφar}usAfsgAf aAfGfgcauGfaAfgCf aGfgsUfsu	2370
D-2575	{GalNAc3K2AhxC6}C fuGfcUfuCfaUfGfCfCf uuUfcUfaUfsusUf	2371	{Φocφar}asUfsaGfa AfAfggcaUfgAfaGf cAfgsUfsu	2372
D-2576	{GalNAc3K2AhxC6}C fuGfcUfuCfaUfGfCfCf	2373	{Φocφar}usUfsaGfa AfAfggcaUfgAfaGf	2374

	uuUfcUfaAfsusUf		cAfgsUfsu	
D-2577	{GalNAc3K2AhxC6}U fgCfuUfcAfuGfCfCfUf uuCfuAfcAfsusUf	2375	{Φocφar}usGfsuAf gAfAfaaggcAfuGfaA fgCfasUfsu	2376
D-2578	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfUfUf ucUfaCfaUfsusUf	2377	{Φocφar}asUfsgUfa GfAfaaggCfaUfgAfa GfcsUfsu	2378
D-2579	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfgCfCfUfUf ucUfaCfaAfsusUf	2379	{Φocφar}usUfsgUf aGfAfaaggCfaUfgAf aGfcsUfsu	2380
D-2580	{GalNAc3K2AhxC6}C fuUfcAfuGfcCfUfUfUf cuAfcAfgUfsusUf	2381	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaagGfcAfuGfa AfgsUfsu	2382
D-2581	{GalNAc3K2AhxC6}U fuCfaUfgCfcUfUfUfCf uaCfaGfuUfsusUf	2383	{Φocφar}asAfscUfg UfAfgaaaGfgCfaUfg AfasUfsu	2384
D-2582	{GalNAc3K2AhxC6}U fuCfaUfgCfcUfUfUfCf uaCfaGfuAfsusUf	2385	{Φocφar}usAfscUf gUfAfgaaaGfgCfaUf gAfasUfsu	2386
D-2583	{GalNAc3K2AhxC6}U fcAfuGfcCfuUfUfCfUf acAfgUfgUfsusUf	2387	{Φocφar}asCfsaCfu GfUfagaaAfgGfcAf uGfasUfsu	2388
D-2584	{GalNAc3K2AhxC6}U fcAfuGfcCfuUfUfCfUf acAfgUfgAfsusUf	2389	{Φocφar}usCfsaCfu GfUfagaaAfgGfcAf uGfasUfsu	2390
D-2585	{GalNAc3K2AhxC6}C faUfgCfcUfuUfCfUfAf caGfuGfgUfsusUf	2391	{Φocφar}asCfscAfc UfGfuagaAfaGfgCfa UfgsUfsu	2392
D-2586	{GalNAc3K2AhxC6}C faUfgCfcUfuUfCfUfAf caGfuGfgAfsusUf	2393	{Φocφar}usCfscAfc UfGfuagaAfaGfgCfa UfgsUfsu	2394
D-2587	{GalNAc3K2AhxC6}A fuGfcCfuUfuCfUfAfCf agUfgGfcUfsusUf	2395	{Φocφar}asGfscCfa CfUfguagAfaAfgGf cAfusUfsu	2396

D-2588	{ GalNAc3K2AhxC6}A fuGfcCfuUfuCfUfAfCf agUfgGfcAfsusUf	2397	{ Φocφar}usGfscCfa CfUfguagAfaAfgGf cAfusUfsu	2398
D-2589	{ GalNAc3K2AhxC6}U fgCfcUfuUfcUfAfCfAf guGfgCfcUfsusUf	2399	{ Φocφar}asGfsgCfc AfCfuguaGfaAfaGf gCfasUfsu	2400
D-2590	{ GalNAc3K2AhxC6}G fcCfuUfuCfuAfCfAfGf ugGfcCfuUfsusUf	2401	{ Φocφar}asAfsgGfc CfAfcuguAfgAfaAf gGfcsUfsu	2402
D-2591	{ GalNAc3K2AhxC6}G fgUfaUfgUfuCfCfUfGf cuUfcAfuCfsusUf	2403	{ Φocφar}gsAfsuGf aAfGfcaggAfaCfaUf aCfcsUfsu	2404
D-2592	{ GalNAc3K2AhxC6}G fuAfuGfuUfcCfUfGfCf uuCfaUfcCfsusUf	2405	{ Φocφar}gsGfsaUf gAfAfgcagGfaAfcA fuAfcUfsu	2406
D-2593	{ GalNAc3K2AhxC6}U faUfgUfuCfcUfGfCfUf ucAfuCfcCfsusUf	2407	{ Φocφar}gsGfsgAf uGfAfagcaGfgAfaCf aUfasUfsu	2408
D-2594	{ GalNAc3K2AhxC6}A fuGfuUfcCfuGfCfUfUf caUfcCfcCfsusUf	2409	{ Φocφar}gsGfsgGf aUfGfaagcAfgGfaAf cAfusUfsu	2410
D-2595	{ GalNAc3K2AhxC6}U fgUfuCfcUfgCfUfUfCf auCfcCfcUfsusUf	2411	{ Φocφar}asGfsgGf gAfUfgaagCfaGfgA faCfasUfsu	2412
D-2596	{ GalNAc3K2AhxC6}G fuUfcCfuGfcUfUfCfAf ucCfcCfuUfsusUf	2413	{ Φocφar}asAfsgGf gGfAfugaaGfcAfgG faAfcUfsu	2414
D-2597	{ GalNAc3K2AhxC6}U fuCfcUfgCfuUfCfAfUf ccCfcUfuCfsusUf	2415	{ Φocφar}gsAfsaGf gGfGfaugaAfgCfaG fgAfasUfsu	2416
D-2598	{ GalNAc3K2AhxC6}U fcCfuGfcUfuCfAfUfCfc cCfuUfcUfsusUf	2417	{ Φocφar}asGfsaAfg GfGfgaugAfaGfcAf gGfasUfsu	2418
D-2599	{ GalNAc3K2AhxC6}C	2419	{ Φocφar}usAfsgAf	2420

	fcUfgCfuUfcAfUfCfCfc cUfuCfuAfsusUf		aGfGfggauGfaAfgC faGfgsUfsu	
D-2600	{GalNAc3K2AhxC6}C fuGfcUfuCfaUfCfCfCfc uUfcUfaCfsusUf	2421	{Φocφar}gsUfsaGfa AfGfgggaUfgAfaGf cAfgsUfsu	2422
D-2601	{GalNAc3K2AhxC6}U fgCfuUfcAfuCfCfCfCfu uCfuAfcAfsusUf	2423	{Φocφar}usGfsuAf gAfAfggggAfuGfaA fgCfasUfsu	2424
D-2602	{GalNAc3K2AhxC6}G fcUfuCfaUfcCfCfCfUfu cUfaCfaGfsusUf	2425	{Φocφar}csUfsgUfa GfAfagggGfaUfgAf aGfcsUfsu	2426
D-2603	{GalNAc3K2AhxC6}C fuUfcAfuCfcCfCfUfUfc uAfcAfgUfsusUf	2427	{Φocφar}asCfsuGfu AfGfaaggGfgAfuGf aAfgsUfsu	2428
D-2604	{GalNAc3K2AhxC6}U fuCfaUfcCfcCfUfUfCfu aCfaGfuGfsusUf	2429	{Φocφar}csAfscUfg UfAfgaagGfgGfaUf gAfasUfsu	2430
D-2605	{GalNAc3K2AhxC6}U fcAfuCfcCfcUfUfCfUfa cAfgUfgGfsusUf	2431	{Φocφar}csCfsaCfu GfUfagaaGfgGfgAf uGfasUfsu	2432
D-2606	{GalNAc3K2AhxC6}C faUfcCfcCfuUfCfUfAfc aGfuGfgCfsusUf	2433	{Φocφar}gsCfscAfc UfGfuagaAfgGfgGf aUfgsUfsu	2434
D-2607	{GalNAc3K2AhxC6}A fuCfcCfcUfuCfUfAfCfa gUfgGfcCfsusUf	2435	{Φocφar}gsGfscCfa CfUfguagAfaGfgGf gAfusUfsu	2436
D-2608	{GalNAc3K2AhxC6}U fcCfcCfuUfcUfAfCfAfg uGfgCfcUfsusUf	2437	{Φocφar}asGfsgCfc AfCfuguaGfaAfgGf gGfasUfsu	2438
D-2609	{GalNAc3K2AhxC6}C fcCfcUfuCfuAfcAfGf ugGfcCfuUfsusUf	2439	{Φocφar}asAfsGfc CfAfcuguAfgAfaGf gGfgsUfsu	2440

ПРИМЕР 2: эффективность отобранных молекул siRNA PNPLA3 в анализе RNA FISH

[181] Получали панель полностью химически модифицированной siRNA, включая

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

[182] Эффективность каждой из молекул siRNA в снижении экспрессии PNPLA3 оценивали с использованием анализа трансфекции siRNA *in vitro* в 384-луночном формате с последующей флуоресцентной гибридизацией *in situ*, нацеленной на молекулы рибонуклеиновой кислоты (RNA FISH), для определения значений IC₅₀ и максимальной активности. Данный анализ выполняли на линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека Нер3В (ATCC HB-8064) и на клетках яичника китайского хомячка (CHO), экспрессирующих PNPLA3 I148I человека. Линию клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека Нер3В поддерживали в среде EMEM (ATCC 30-2003), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой и 1% антибиотиком/антимикотиком, при 37°C и 5% CO₂. Клетки линии CHO, экспрессирующие PNPLA3 I148I человека, поддерживали в среде, содержащей 50% CD-CHO (Life Technologies), 50% Ex-Cell CHO 5 Medium (Sigma), 8 mM L-глутамин, 1 x HT, 1% антибиотик/антимикотик и 10 мкг/мл пуромицина, при 37°C и 5% CO₂.

[183] Для анализов клеток Нер3В трансфекционные комплексы, состоящие из молекул siRNA и реагента для трансфекции Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) в среде EMEM (ATCC 30-2003), вносили в 384-луночные планшеты (PerkinElmer) из расчета 10 мкг на лунку в соответствии с рекомендациями производителя. Для анализов с клетками CHO человека трансфекционные комплексы, состоящие из молекул siRNA и реагента для трансфекции Lipofectamine RNAiMAX в среде F12K (Mediatech), вносили в 384-луночные планшеты из расчета 10 мкг на лунку в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки разбавляли до 67000 клеток/мл в среде без антибиотиков/антимикотиков и

[184] добавляли по 30 мкл в каждую лунку, доводя конечную плотность до 2000 клеток/лунка в 40 мкл среды. После 20-минутной инкубации при комнатной температуре планшеты переносили в инкубатор с условиями 37°C и 5% CO₂. Трансфекционные смеси с клетками Нер3В инкубировали в течение 72 часов, а трансфекционные смеси с клетками CHO с PNPLA3 I148I человека инкубировали в течение 48 часов.

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

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

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

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

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

Таблица 3. Анализ RNA FISH клеток CHO, трансфицированных PNPLA3 I148I

Дуплекс №	IC50 (мкМ)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2001	,0589	-33,9
D-2002	,0158	-67,2
D-2003	,0427	-43,4
D-2004	,00835	-63,5
D-2006	,0177	-77,8
D-2008	,125	-10,7
D-2009	,00769	-45,5
D-2010	,00558	-80

D-2011	,035	-3
D-2012	> 0,5	-3,7
D-2013	,036	-6,4
D-2014	,0122	-58,2
D-2015	> 0,5	8
D-2016	> 0,5	8
D-2017	,0153	-73,2
D-2018	,00386	-31,5
D-2019	,125	
D-2020	> 0,5	
D-2021	> 0,5	8
D-2022	> 0,167	-6,8
D-2023	,0257	-36,9
D-2024	> 0,5	4
D-2025	> 0,5	-2,5
D-2026	,022	-35,1
D-2027	,00172	-16,5
D-2028	> 0,5	10
D-2029	,0106	-56,2
D-2032	,00205	-52,9
D-2033	,0107	-61,7
D-2034	> 0,5	6
D-2035	> 0,5	-3,8
D-2036	,00665	-55,9
D-2037	> 0,5	4
D-2038	> 0,5	10
D-2039	,0116	-23,9
D-2040	> 0,5	-25,4
D-2041	> 0,5	9
D-2042	,00959	-25,5
D-2043	> 0,5	9
D-2044	,00552	-29
D-2045	> 0,5	9
D-2046	> 0,5	9

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

Таблица 4. Анализ RNA FISH клеток CHO, трансфицированных PNPLA3 I148M

Дуплекс №	IC ₅₀ (мкМ)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2000	,0316	-29,2
D-2001	,0131	-81,8
D-2002	,00216	-90,5
D-2003	,022	-50,4
D-2004	,00429	-88
D-2005	> 0,5	15
D-2006	,00301	-89,2
D-2007	> 0,5	6
D-2009	,00274	-86,9
D-2010	,00203	-93,3
D-2011	,000694	-11,9

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

RNA FISH также проводили на линии клеток печени, содержащей двойную мутацию PNPLA3-rs738408-rs738409, а также на контрольной линии клеток Hep3В дикого типа. Клетки Hep3В и HepG2 (приобретенные у ATCC) культивировали в минимальной поддерживающей среде (MEM от Corning для клеток Hep3В и EMEM от ATCC для клеток HepG2), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS, Sigma) и 1% раствором пенициллина-стрептомицина (P-S, Corning). Трансфекцию siRNA проводили следующим образом: 1 мкл тестируемых siRNA и 4 мкл простой MEM или EMEM, в зависимости от клеточной линии, добавляли в планшеты для анализа CellCarrier-384 Ultra, покрытые PDL (PerkinElmer), от BioMek FX (Beckman Coulter). 5 мкл Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific), предварительно разбавленного в простой MEM или EMEM (а именно, 0,035 мкл RNAiMAX в 5 мкл MEM для клеток Hep3В и 0,06 мкл RNAiMAX в 5 мкл EMEM для клеток HepG2), затем дозировали в планшеты для анализа с помощью дозатора для реагентов Multidrop Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific). После 20 минут инкубации смеси siRNA/RNAiMAX при комнатной температуре (RT) в трансфекционный комплекс с помощью дозатора для реагентов Multidrop Combi добавляли 30 мкл клеток Hep3В либо клеток HepG2 (2000 клеток на

лунку) в MEM или EMEM, дополненной 10% FBS и 1% P-S. Планшеты для анализа инкубировали в течение 20 мин при RT до помещения в инкубатор. Затем клетки инкубировали в течение 72 ч при 37°C и 5% CO₂. Анализ клеток ViewRNA ISH проводили в соответствии с протоколом производителя (Thermo Fisher Scientific) с использованием самостоятельно собранной автоматизированной платформы для анализа FISH, предназначенной для работы с жидкостями. Вкратце клетки фиксировали в 4% формальдегиде (Thermo Fisher Scientific) в течение 15 мин при RT, пермеабилizировали при помощи детергента в течение 3 мин при RT, а затем обрабатывали раствором протеазы в течение 10 мин при RT. Инкубацию мишень-специфических пар зондов (Thermo Fisher Scientific) проводили в течение 3 ч, в то время как для предусилителей, усилителей и зондов с метками (Thermo Fisher Scientific) ее проводили по 1 ч. Все стадии гибридизации выполняли при 40°C в автоматизированном инкубаторе Cytomat 2 C-LIN (Thermo Fisher Scientific). После реакций гибридизации проводили окрашивание клеток Hoechst и CellMask Blue (Thermo Fisher Scientific) в течение 30 мин, а затем проводили визуализацию с помощью Opera Phenix (PerkinElmer). Изображения анализировали с использованием системы для хранения и анализа данных Columbus Image (PerkinElmer) с получением среднего значения числа пятен на клетку. Подсчет пятен нормализовали с использованием контрольных лунок с высоким значением (содержащих фосфатно-буферный солевой раствор от Corning) и с низким значением (без пар целевых зондов). Нормализованные значения по отношению к концентрациям общей siRNA наносили на график, и данные сопоставляли с четырехпараметрической сигмоидальной моделью в Genedata Screener (Genedata) для получения значений IC₅₀ и максимальной активности. Результаты анализов для клеток HepG2 показаны в таблице 5, а результаты анализов для клеток Hep3B показаны в таблице 6. Нокдаун PNPLA3 приведен в виде процента нокдауна по сравнению с контролем. Отрицательные значения указывают на снижение уровней PNPLA3. В тех случаях, когда дуплекс проходил анализ более одного раза, со стандартным отклонением показано среднее значение IC₅₀.

Таблица 5. Анализ RNA FISH гепатоцитов HepG2

Дуплекс №	IC ₅₀ (мкМ)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2001	,0132	-70,5
D-2003	,0458	-46,9
D-2004	,0049	-74,2
D-2006	,00283	-69,6
D-2009	,00448	-62,2
D-2010	,00206	-52
D-2013	,00319	-71,7
D-2014	,00164	-67,4
D-2017	,00222	-60,9

D-2018	,00717	-52,7
D-2020	,00664	-68,3
D-2021	,00559	-61,5
D-2022	,004	-30,5
D-2023	> 0,5	-18
D-2025	,0041	-61,9
D-2026	,00937	-34,6
D-2564	0,009	-64,021
D-2565	0,00609	-70,965
D-2566	0,00255	-52,65
D-2567	0,00584	-56,603
D-2568	0,0157	-63,002
D-2569	0,00327	-64,898
D-2570	0,00144	-55,424
D-2571	> 0,1	-18,661
D-2572	0,00557	-25,668
D-2573	0,0115	-55,329
D-2574	0,00289	-69,84
D-2575	0,00378	-69,491
D-2576	0,00527	-64,841
D-2577	0,00511	-46,449
D-2578	0,0026	-67,821
D-2579	0,00402	-67,057
D-2580	0,00119	-64,422
D-2581	0,00915	-73,008
D-2582	0,000823	-77,053
D-2583	0,00851	-66,555
D-2584	0,00513	-54,442

D-2585	0,0154	-67,707
D-2586	0,00701	-69,624
D-2587	0,00732	-66,627
D-2588	0,00226	-70,854
D-2589	0,00837	-31,221
D-2590	0,0249	-41,857
D-2591	0,009	-64,021
D-2592	0,00609	-70,965
D-2593	0,00255	-52,65
D-2594	0,00584	-56,603
D-2595	0,0157	-63,002
D-2596	0,00327	-64,898
D-2597	0,00144	-55,424
D-2598	> 0,1	-18,661
D-2599	0,00557	-25,668
D-2600	0,0115	-55,329
D-2601	0,00289	-69,84
D-2602	0,00378	-69,491
D-2603	0,00527	-64,841
D-2604	0,00511	-46,449
D-2605	0,0026	-67,821
D-2606	0,00402	-67,057
D-2607	0,00119	-64,422
D-2608	0,00915	-73,008
D-2609	0,000823	-77,053
D-2591	0,00851	-66,555

D-2592	0,00513	-54,442
D-2593	0,0154	-67,707
D-2594	0,00701	-69,624
D-2595	0,00732	-66,627
D-2596	0,00226	-70,854
D-2597	0,00837	-31,221
D-2598	0,0249	-41,857
D-2426	85,098	-14,902
D-2444	31,575 +/- 6,79	-68,425 +/- 6,79
D-2454	53,215	-46,785
D-2473	29,35	-70,65

Таблица 6. Анализ RNA FISH гепатоцитов Нер3В

Дуплекс №	IC50 (мкМ)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2001	,00842	-37
D-2003	,0158	-32,1
D-2004	,00266	-32,4
D-2006	,00948	-54,1
D-2009	,00228	-29,5
D-2010	,00219	-37,2
D-2013	,00524	-31,5
D-2014	,00148	-37,6
D-2017	,00333	-37,6
D-2018	,00315	-21,3
D-2020	> 0,5	6
D-2021	> 0,5	-1,6
D-2022	,00272	-30,9
D-2023	> 0,5	24
D-2025	,0101	-30,3
D-2026	,00551	-23
D-2564	0,01	-63,199
D-2565	0,00938	-58,392

D-2566	0,00343	-61,484
D-2567	0,0175	-53,489
D-2568	> 0,1	-18,367
D-2569	0,0195	-62,568
D-2570	0,0127	-77,141
D-2571	> 0,1	-15,922
D-2572	> 0,1	-12,434
D-2573	> 0,1	-14,649
D-2574	0,0215	-52,515
D-2575	0,0203	-53,175
D-2576	0,018	-48,137
D-2577	> 0,1	-16,105
D-2578	> 0,1	-21,309
D-2579	> 0,1	-17,510
D-2580	> 0,1	-24,616
D-2581	> 0,1	-13,987
D-2582	0,0574	-30,543
D-2583	> 0,1	-23,990
D-2584	> 0,1	-6,715
D-2585	> 0,1	-17,518
D-2586	> 0,1	-24,518
D-2587	0,0391	-58,478
D-2588	0,0218	-56,609
D-2589	> 0,1	-17,418
D-2590	> 0,1	-21,161
D-2591	0,0167	-59,366
D-2592	0,0104	-61,548
D-2593	Не определено	-61,879
D-2594	0,0211	-43,856
D-2595	0,0272	-63,020
D-2596	> 0,1	-10,278
D-2597	0,0546	-31,743
D-2598	Не определено	-47,517
D-2599	0,00489	-70,825

D-2600	> 0,1	-8,522
D-2601	0,0364	-31,836
D-2602	0,00577	-65,062
D-2603	0,01	-58,287
D-2604	0,00353	-40,649
D-2605	0,0113	-50,691
D-2606	> 0,1	-5,097
D-2607	0,0261	-49,898
D-2608	> 0,1	-23,747
D-2609	> 0,1	-23,804
D-2426	> 0,1	-15,207
D-2454	0,00187	-51,735
D-2473	> 0,1	-21,333

ПРИМЕР 3: анализ с помощью капельной цифровой ПЦР siRNA для PNPLA3-rs738409 и PNPLA3-rs738409-rs738408

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

[191] Капельную цифровую ПЦР (ddPCR) проводили с использованием системы для капельной цифровой ПЦР AutoDG QX200 от BioRad в соответствии с инструкциями производителя. Реакционные смеси составляли в прозрачном 96-луночном планшете для

ПЦР от Eppendorf (951020303) с использованием BioRad ddPCR Supermix для зондов (1863010), и флуоресцентно меченных смесей для анализов qPCR для PNPLA3 (IDT Hs.PT.58.21464637, соотношение праймера и зонда 3.6:1 и TBP (IDT Hs.PT.53a.20105486, соотношение праймера и зонда 3.6:1) и воды, не содержащей РНКаз (Ambion, AM9937). Конечная концентрация праймера/зонда составляла 900 нМ/250 нМ соответственно, начальная концентрация кДНК отличалась для разных лунок. Капли формировали с использованием генератора капель BioRad Auto DG (1864101), настроенного с учетом рекомендуемых производителем расходных материалов (картриджи BioRad DG32 1864108, наконечники BioRad 1864121, 96-луночный планшет для ПЦР Eppendorf blue 951020362, масло для генерации капель для зондов BioRad 1864110 и собранная панель для капель BioRad). Капли подвергали амплификации на термоциклере BioRad C1000 touch (1851197), используя следующие условия: активация фермента при 95°C в течение 10 минут, денатурация при 94°C в течение 30 секунд с последующим отжигом/элонгацией при 60°C в течение одной минуты, 40 циклов со скоростью нагрева/охлаждения 2°C/секунда, инактивация фермента при 98°C в течение 10 минут с последующим (необязательно) неограниченным по времени выдерживанием при 4°C. Затем образцы считывали на устройстве для считывания BioRad QX200 Droplet Reader, измеряющем сигнал FAM/HEX, который коррелирует с концентрацией PNPLA3 или TBP. Анализ данных проводили с использованием программного пакета BioRad QuantaSoft. Образцы гейтировали по каналу (флуоресцентная метка) для определения концентрации на образец. Каждый образец затем выражали как соотношение концентрации гена, представляющего интерес (PNPLA3), и концентрации конститутивного гена (TBP) для контроля разницы в загрузке образца. Затем данные импортировали в Genedata Screener, где каждая тестируемая siRNA нормализуется по медианным значениям нейтральных контрольных лунок (содержащих только буфер). Значения IC50 представлены в таблице 7.

Таблица 7. Анализ ddPCR, выполненный на первичных гепатоцитах

Дуплекс №	IC50 (мкМ)	% нокдауна PNPLA3
D-2068	,0339	-49,628
D-2069	,00408	-52,997
D-2070	,00433	-42,193
D-2072	,00884	-53,16
D-2073	> 2,0	-7,435
D-2078	,0044	-43,123
D-2084	0,00499	-38,791
D-2085	0,00539	-64,312
D-2086	> 2,0	-14,938
D-2087	> 2,0	-25,465

D-2088	0,207	-34,944
D-2089	0,0107	-38,791
D-2090	0,0218	-38,977
D-2091	0,0508	-41,209
D-2092	0,00192	-44
D-2093	0,00634	-30,233
D-2094	> 2,0	4,93
D-2095	0,00181	-59,814
D-2096	0,0181	-52,807
D-2099	0,00549	-39,296
D-2100	0,0142	-55,281
D-2158	0,0681	-48,649
D-2159	0,0325	-36,036
D-2160	> 0,667	-13,514
D-2161	> 2,0	-24,229
D-2162	0,0726	-28,634
D-2163	> 0,667	-16,3
D-2164	> 2,0	-15,418
D-2165	0,00644	-26,872
D-2166	0,00192	-30,045
D-2167	> 0,667	-6,726
D-2168	> 2,0	-15,418
D-2169	> 2,0	-13,004
D-2170	> 2,0	-9,417
D-2171	0,00505	-44,395
D-2172	0,003	-55,336
D-2173	0,00598	-46,188
D-2174	> 2,0	-9,009
D-2175	0,017	-27,928
D-2176	0,00452	-35,426
D-2177	> 2,0	4,5
D-2178	> 2,0	1,8
D-2179	> 2,0	-6,306
D-2180	0,00546	-40,969

D-2181	0,00152	-43,119
D-2182	0,00317	-54,128
D-2183	0,00948	-58,079
D-2184	0,0109	-50,459
D-2185	> 2,0	-7,339
D-2186	0,0021	-48,624
D-2187	> 2,0	-11,009
D-2188	> 2,0	1,32
D-2191	0,0984	-66,923
D-2192	0,124	-64,231
D-2193	0,138	-60,606
D-2194	0,0478	-54,182
D-2195	0,0801	-47,515
D-2199	0,0517	-62,973
D-2201	0,0517	-62,973
D-2202	0,0165	-72,404
D-2203	0,00946	-49,459
D-2204	0,0241	-58,545
D-2205	0,0382	-45,576
D-2206	0,0222	-50,946
D-2209	0,0867	-46,622
D-2212	0,358	-60
D-2216	0,0826	-58,942
D-2218	0,0242	-63,462
D-2220	0,0113	-69,333
D-2221	0,138	-55,541
D-2224	0,0198	-66,486
D-2225	0,245	-68,077
D-2228	0,155	-44,606
D-2229	0,0651	-38,909
D-2231	0,0512	-56,892
D-2232	0,0678	-67,981
D-2233	0,00802	-57,182
D-2234	0,00473	-55,947

D-2235	0,00816	-62,115
D-2236	0,00245	-51,542
D-2237	0,00495	-60
D-2238	0,00561	-63,017
D-2239	0,00453	-55,537
D-2240	0,00584	-56,116
D-2241	0,00755	-54,76
D-2242	0,0137	-56,332
D-2243	0,00329	-57,118
D-2244	0,0127	-56,909
D-2245	0,00697	-58,364
D-2246	0,00713	-56,828
D-2247	0,00875	-57,797
D-2248	0,0098	-58,59
D-2249	0,00603	-57,759
D-2250	0,0105	-62,155
D-2251	0,00521	-59,914
D-2252	0,00988	-58,678
D-2253	0,00481	-57,118
D-2254	0,00721	-56,332
D-2255	0,00788	-52,838
D-2256	0,00831	-55,455
D-2257	0,00503	-54,545
D-2258	0,00626	-54,545
D-2259	0,00401	-55,947
D-2260	0,00379	-52,423
D-2261	0,00151	-54,31
D-2262	0,00292	-53,448
D-2263	0,00607	-59,483
D-2264	0,00703	-59,504
D-2265	> 4,0	-20,524
D-2266	0,0129	-32,727
D-2267	0,107	-27,273
D-2275	0,00359	-45,701

D-2276	0,00416	-43,891
D-2277	0,00218	-49,14
D-2278	0,00743	-42,986
D-2279	0,0116	-53,846
D-2280	0,00347	-36,652
D-2281	0,00449	-43,891
D-2282	0,0134	-37,557
D-2283	0,00864	-34,842
D-2284	0,00738	-49,558
D-2285	0,0202	-38,053
D-2286	0,00543	-45,487
D-2287	0,00934	-47,611
D-2288	0,00652	-55,575
D-2289	0,0259	-61,593
D-2290	0,00549	-53,805
D-2291	0,00476	-51,062
D-2292	0,0105	-42,584
D-2293	0,0059	-45,455
D-2294	0,0117	-45,646
D-2295	0,0109	-52,823
D-2296	0,01246 +/- 0,015	-59,847 +/- 15,2
D-2297	0,00828	-44,444
D-2298	0,0279	-41,346
D-2299	0,00529	-55,926
D-2300	0,0195	-50,423
D-2301	0,00838	-35,577
D-2302	0,00832	-40,865
D-2303	0,00371	-40,096
D-2304	0,00563	-38,365
D-2305	0,00639	-40,385
D-2306	0,00669	-41,25
D-2307	0,00212	-38,462
D-2308	0,00573	-37,736
D-2309	0,0645	-33,962

D-2310	0,00232	-33,019
D-2311	0,00181	-31,132
D-2312	0,0447	-45,283
D-2313	0,00655	-42,453
D-2314	0,00613	-41,509
D-2315	0,00941	-50
D-2316	0,0218	-41,784
D-2317	0,0142	-42,723
D-2318	0,0182	-31,455
D-2319	> 4,0	-23,005
D-2320	0,0228	-37,089
D-2321	0,00809	-45,352
D-2322	0,0165	-44,601
D-2323	0,0184	-38,373
D-2324	0,00766	-41,627
D-2325	0,00815	-46,507
D-2326	0,0168	-48,325
D-2327	0,00663	-62,254
D-2328	0,00716	-39,367
D-2329	0,044	-52,036
D-2330	0,00282	-65,701
D-2331	0,00411	-53,991
D-2332	0,0127	-51,222
D-2333	0,012	-48,357
D-2334	0,019	-42,593
D-2335	0,00448	-47,418
D-2336	0,00944	-37,327
D-2337	0,00514	-37,327
D-2338	0,154	-38,249
D-2339	0,0089	-40,092
D-2340	0,0169	-48,148
D-2341	0,00274	-46,296
D-2342	0,0225	-42,723
D-2343	0,00222 +/- 0,00136	-43,218 +/- 4,81

D-2344	0,0136	-56,561
D-2345	0,0222	-50,226
D-2346	0,0273	-55,385
D-2347	0,0164	-41,784
D-2348	0,0314	-60,282
D-2349	0,0103	-65,1
D-2350	0,0427	-63,9

Пример 4: скрининг эффективности выбранных молекул siRNA PNPLA3 на модели гуманизированной мыши

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

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

[194] Все описанные в данном документе эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) компании Amgen и были проведены в соответствии с Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition (National Research Council (U.S.), Committee for the Update Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Institute for Laboratory Animal Research (U.S.) и National Academies Press (U.S.) (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Ed., National Academies Press, Washington, D.C. Мышей содержали в одном помещении в комнате с кондиционированным воздухом с температурой 22±2°C и циклом света-темноты с двенадцатичасовым освещением и двенадцатью часами тьмы (0600-1800 часов). Животные имели свободный доступ к стандартному корму (Envigo, 2920X) и к воде (очищенной обратным осмосом) через автоматическую поилку, если не указано иное. По окончании установленного периода кровь собирали посредством пункции сердца под глубоким наркозом, а затем, следуя рекомендациям Ассоциации по оценке и аккредитации лабораторных животных (AAALAC), животных подвергали эвтаназии вторичным физическим методом. **Фигура 1A-D.** Пример пяти молекул siRNA, которые подвергали скринингу в отношении как дозозависимого нокдауна мРНК, так и функциональной стабильности *in vivo*. Мышей, экспрессирующих PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека, обрабатывали siRNA через две недели после внутривенных инъекций AAV. N=6 мышей на группу; данные представлены в виде среднего значения и стандартной погрешности среднего. (A) siRNA вводили в дозе 0,5, 1,0, 3,0 или 5,0 миллиграмма на килограмм веса тела подкожно в область живота мыши. Через четыре недели после обработки с помощью siRNA мышей умерщвляли, а ткани печени отбирали и подвергали обработке для анализа экспрессии генов. Данные представляют усредненный относительный нокдаун PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека в каждой группе мышей по сравнению с контрольной группой, обработанной средой-носителем. (B) Ткани печени, отобранные из той же группы, получавшей лечение в течение четырех недель, также подвергали обработке для определения содержания триглицеридов с целью оценки функциональной эффективности средства. Данные представляют усредненное содержание триглицеридов, выраженное в миллиграммах на грамм ткани, подвергнутой обработке. (C) siRNA вводили в дозе 1,0 и 3,0 миллиграмма на килограмм веса тела подкожно в области живота животным из параллельной когорты. У мышей отбирали ткани через шесть недель

после введения siRNA для сравнения стабильности молекул siRNA in vivo. Печень собирали и подвергали обработке для анализа экспрессии генов. Данные представляют усредненный относительный нокдаун PNPLA3^{rs738409-rs738408} человека в каждой группе мышей по сравнению с контрольной группой, обработанной средой-носителем. (D) Ткани печени, выделенные из той же группы, получавшей лечение в течение шести недель, также подвергали обработке для определения содержания триглицеридов с целью оценки функциональной эффективности средства с течением времени. Данные представляют усредненное содержание триглицеридов, выраженное в миллиграммах на грамм ткани, подвергнутой обработке.

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

Таблица 8. День 8, анализ нокдауна PNPLA3

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

D-2074	PNPLA3-WT	4,00E+11	5	-5,11
D-2084	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-87,49
D-2084	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-88,75
D-2084	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-16,49
D-2084	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	-15,42
D-2085	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-77,14
D-2085	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-84,42
D-2085	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-25,19
D-2085	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	-21,14
D-2086	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-64,54
D-2086	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-52,95
D-2087	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-20,15
D-2088	PNPLA3-I148M	4,00E+11	5	-47,18
D-2088	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-66,96
D-2089	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-85,47
D-2089	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	-21,01
D-2089	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-34,21
D-2089	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-90,55
D-2090	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-89,58
D-2090	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-50,13
D-2090	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	8,76
D-2091	PNPLA3-WT	8,00E+11	5	-35,70
D-2092	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-92,34
D-2092	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-51,35
D-2092	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	-42,88
D-2093	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-83,87
D-2094	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-70,12
D-2095	PNPLA3-I148M	8,00E+11	1	-29,95
D-2095	PNPLA3-WT	8,00E+11	1	67,40
D-2095	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-85,42
D-2096	PNPLA3-WT	8,00E+11	5	-90,44
D-2081	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	6,25
D-2081	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-11,81
D-2097	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-87,61

D-2098	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-79,84
D-2099	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-84,36
D-2100	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-79,67
D-2101	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-89,64
D-2102	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-61,49
D-2103	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-19,65
D-2104	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-79,70
D-2104	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-82,87
D-2105	PNPLA3-I148M	8,00E+11	5	-84,49
D-2105	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-87,71
D-2152	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-39,35
D-2153	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-79,04
D-2154	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-66,72
D-2155	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-44,68
D-2156	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-84,72
D-2157	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-17,25
D-2280	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-99,70
D-2280	PNPLA3 WT	1,00E+12	5	-51,13
D-2295	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-35,90
D-2295	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-94,68
D-2296	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-23,24
D-2296	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-92,78
D-2297	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	43,71
D-2297	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-94,59
D-2324	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	6,53
D-2324	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-97,39
D-2326	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-8,25
D-2326	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-77,82
D-2328	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-2,12
D-2328	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-92,49

Таблица 9. День 15, анализ нокдауна PNPLA3

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

D-2092	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-93,96
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-81,73
D-2095	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-72,99
D-2131	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-66,02
D-2186	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-87,67
D-2089	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-95,01
D-2104	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-76,01
D-2105	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-72,67
D-2123	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-56,93
D-2128	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-37,26
D-2138	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-62,16
D-2149	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-72,34
D-2156	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-75,81
D-2259	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-79,15
D-2260	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-69,97
D-2261	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-50,40
D-2262	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-84,36
D-2263	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-77,08
D-2264	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-40,86
D-2269	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-37,55
D-2270	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-77,42
D-2271	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-26,87
D-2272	PNPLA3-I148M	1,00E+12	5	-56,05
D-2280	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-86,30
D-2287	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,73
D-2289	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,48
D-2292	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-82,48
D-2297	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-72,61
D-2322	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-32,92

	DM			
D-2324	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-87,56
D-2327	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-86,70
D-2345	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-83,48
D-2346	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-75,93
D-2347	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-22,83
D-2348	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-20,09
D-2349	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-67,70
D-2350	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-57,51
D-2351	PNPLA3-WT	1,00E+12	5	-56,11
D-2352	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,21
D-2353	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-89,55
D-2354	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,21
D-2358	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,10
D-2359	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,17
D-2360	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-63,98
D-2361	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,47
D-2362	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,10
D-2364	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,31
D-2370	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,99
D-2370	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	11,88
D-2371	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-91,14

	DM			
D-2372	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,71
D-2373	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-73,80
D-2374	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-75,98
D-2375	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,68
D-2376	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,78
D-2377	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,88
D-2378	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-97,60
D-2379	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,73
D-2380	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,73
D-2381	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-76,24
D-2382	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-80,33
D-2383	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-71,98
D-2384	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-87,24
D-2385	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-78,77
D-2386	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-70,58
D-2387	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-67,09
D-2390	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-92,97

	DM			
D-2391	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,10
D-2392	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,14
D-2395	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-85,63
D-2396	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,63
D-2397	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-92,90
D-2398	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,48
D-2399	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,40
D-2400	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-97,55
D-2401	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,98
D-2402	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-97,25
D-2403	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	36,90
D-2404	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,08
D-2405	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-96,93
D-2406	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	28,80
D-2395	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-17,25
D-2396	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,70
D-2413	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-94,80
D-2415	PNPLA3-I148M	1,00E+12	3	-90,95

	DM			
D-2418	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-88,45
D-2419	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	43,72
D-2453	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-81,33
D-2454	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-83,38
D-2455	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-68,85
D-2456	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-89,03
D-2460	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-68,65
D-2461	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-47,85

Таблица 10. День 22, анализ нокдауна PNPLA3

Номер дуплекса	Вектор на основе AAV	Частицы AAV/животное	Вводимая доза (мг/кг)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2092	PNPLA3- I148M	1,00E+12	3	-74,61
D-2092	PNPLA3- I148M	1,00E+12	5	-85,78
D-2095	PNPLA3- I148M	1,00E+12	3	-27,78
D-2095	PNPLA3- I148M	1,00E+12	5	-33,60
D-2324	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	3	-56,68
D-2324	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	5	-88,02
D-2089	PNPLA3- I148M	1,00E+12	5	-80,86
D-2104	PNPLA3- I148M	1,00E+12	5	-65,61
D-2105	PNPLA3- I148M	1,00E+12	5	-39,67
D-2280	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	5	-84,12
D-2297	PNPLA3-	1,00E+12	3	-58,01

	I148M DM			
D-2297	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-76,43
D-2352	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-92,74
D-2353	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-84,54
D-2354	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-89,06
D-2355	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-95,53
D-2356	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-94,99
D-2357	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	5	-97,37

Таблица 11. День 28, анализ нокдауна PNPLA3

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

	DM			
D-2402	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-96,43
D-2402	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-85,44
D-2402	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-90,52
D-2404	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-95,67
D-2419	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	0,5	-68,83
D-2419	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	1	-76,88
D-2419	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-97,53
D-2419	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-93,95
D-2419	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-89,66
D-2419	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-93,25
D-2420	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-95,93
D-2421	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	0,5	-50,01
D-2421	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	1	-66,30
D-2421	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-94,99
D-2421	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-80,05
D-2421	PNPLA3 WT			
		1,00E+12	3	-36,65
D-2421	PNPLA3-I148M			
	DM	1,00E+12	3	-91,08

D-2425	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-16,07
D-2426	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-37,54
D-2427	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-25,19
D-2428	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-16,71
D-2437	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,78
D-2438	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,63
D-2439	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-88,10
D-2440	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,25
D-2441	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,13
D-2442	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-57,24
D-2443	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-95,43
D-2444	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,58
D-2445	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-84,55
D-2446	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-81,50
D-2427	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,09
D-2462	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-89,20
D-2463	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-41,25

D-2464	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-60,53
D-2465	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,35
D-2466	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-93,68
D-2467	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-85,15
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	0,5	-46,58
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-74,47
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-88,79
D-2472	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-23,16
D-2472	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-90,54
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	0,5	-57,95
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	1	-71,96
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-91,70
D-2473	PNPLA3-I148M DM	1,00E+12	3	-85,94
D-2473	PNPLA3 WT	1,00E+12	3	-18,70

Таблица 12. День 42, анализ нокдауна PNPLA3

Номер дуплекса	Вектор на основе AAV	Частицы AAV/животное	Вводимая доза (мг/кг)	Нокдаун PNPLA3 (%)
D-2402	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	1	-57,74
D-2402	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	3	-83,75
D-2419	PNPLA3-	1,00E+12	1	-71,07

	I148M DM			
D-2419	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	3	-70,8
D-2421	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	1	-62,21
D-2421	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	3	-80,12
D-2472	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	1	-60,54
D-2472	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	3	-74,77
D-2473	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	1	-54,55
D-2473	PNPLA3- I148M DM	1,00E+12	3	-81,13

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

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

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

печени быстро замораживали для анализа содержимого и экспрессии генов, как было описано ранее.

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

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

[200] Анализ сыворотки крови включал анализ содержания TIMP1, биомаркера, ассоциированного с NASH, и фиброза, связанного с NASH (Youssani 2011). ELISA TIMP1 (R&D Systems, MTM100) проводили в соответствии с инструкциями производителя.

[201] **Фигура 2А-Г.** Для оценки способности молекулы siRNA D-2324, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, предотвращать развитие фенотипов, ассоциированных с NAFLD и сверхэкспрессией PNPLA3^{rs738409-rs738408}, мышам вводили пустой вектор (EV) AAV8, или вектор AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, или среду-носитель, и их содержали на стандартном корме или переводили на рацион ALIOS. Через две недели после инъекций AAV мышей обрабатывали siRNA или средой-носителем раз в две недели в течение шести недель; в общей сложности проводили три цикла инъекций. У мышей отбирали ткани в момент времени восемь недель. Результаты представлены в виде усредненного значения по группе и стандартной погрешности, при N=8 на группу. Звездочки означают статистическую значимость для когорты AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, которую рассчитали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта. (А) Соотношение веса печени (грамм) и веса тела (грамм) на момент отбора тканей. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, **=0,0018, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (В) Подтверждение экспрессии и сайленсинга мРНК PNPLA3 человека в печени с помощью qPCR. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши; сравнение групп, которым скормливали рацион ALIOS, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (С) Анализ экспрессии мРНК Pnpla3 мыши в печени с помощью qPCR указывает на то, что уровень экспрессии эндогенного Pnpla3 существенно не изменяется при сверхэкспрессии, опосредованной AAV, или при сайленсинге, индуцированном siRNA. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши; сравнение группы со стандартным рационом без AAV с группами, которым скормливали рацион ALIOS, а

именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (D) Содержание триглицеридов в печени представлено в миллиграммах триглицеридов на грамм ткани печени. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, *=0,0393, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,0063. (E) Уровни TIMP1 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (F) Гистологический признак стеатоза по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,0012. (F) Гистологический признак воспаления по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001.

[202] **Фигура 3А-Г.** Для оценки способности молекулы siRNA, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, предотвращать дальнейшее прогрессирование заболевания, опосредованного PNPLA3^{rs738409-rs738408}, после начала заболевания мышам вводили пустой вектор (EV) AAV8, или вектор AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, или среду-носитель, и их содержали на стандартном корме или переводили на рацион ALIOS. Через восемь недель после инъекций AAV и изменений рациона мышей обрабатывали siRNA или средой-носителем, раз в две недели в течение дополнительных восьми недель; в общей сложности проводили четыре цикла инъекций. У мышей отбирали ткани в момент времени шестнадцать недель. Хотя не наблюдали каких-либо изменений в стеатозе, если обработку с использованием siRNA начинали после индукции заболевания, некоторые другие конечные эффекты, ассоциированные с заболеванием, были значительно снижены. Результаты представлены в виде усредненных значений и стандартной погрешности, при N=8 на группу. Звездочки означают статистическую значимость для когорты AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, которую рассчитали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта. (А) Соотношение веса печени (грамм) и веса тела (грамм) на момент отбора тканей. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ***=0,0006. (В) Подтверждение экспрессии и сайленсинга мРНК PNPLA3 человека в печени с помощью qPCR. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши; сравнение групп, которым скормливали рацион ALIOS, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (С) Анализ экспрессии мРНК Pnpla3 мыши в печени с

помощью qPCR указывает на то, что уровень экспрессии эндогенного Pnpla3 существенно не изменяется при сверхэкспрессии, опосредованной AAV, или при сайленсинге, индуцированном siRNA. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши; сравнение группы со стандартным рационом без AAV с группами, которым скармливали рацион ALIOS, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (D) Содержание триглицеридов в печени представлено в миллиграммах триглицеридов на грамм ткани печени. Скорректированные Р-значения: AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, *=0,0403. (E) Уровни TIMP1 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, **=0,0027, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,002. (F) Гистологический признак стеатоза по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, не значимо. (F) Гистологический признак воспаления по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,0068.

[203] **Фигура 4А-Д.** Для оценки способности молекулы siRNA, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, спасти ассоциированные с заболеванием фенотипы, обусловленные сверхэкспрессией PNPLA3^{rs738409-rs738408}, проводили сравнение печени и сыворотки крови, полученные от мышей, которым скармливали рацион ALIOS, которых в течение восьми недель обрабатывали AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408} со средой-носителем, с образцами печени и сыворотки крови мышей с AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, которым скармливали рацион ALIOS, которым в течение шестнадцати недель вводили siRNA. Хотя к данному моменту времени обработки с использованием siRNA не наблюдали каких-либо изменений в стеатозе, уровни триглицеридов в печени, TIMP1 в сыворотке крови и воспаление были статистически ниже на момент времени шестнадцать недель по сравнению с контрольными группами на момент времени восемь недель, которым вводили среду-носитель. Результаты представлены в виде усредненных значений и стандартной погрешности, при N=8 на группу. Звездочки означают статистическую значимость для когорты, которой в течение восьми недель вводили AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408} со средой-носителем, которую рассчитали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта. (А) Содержание триглицеридов в печени представлено в миллиграммах триглицеридов на грамм ткани печени. Скорректированные Р-значения: 16 нед. AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, не значимо; 16 нед. AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,0011.

(В) Уровни Timp1 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные Р-значения: 16 нед. AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, не значимо; 16 нед. AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, *=0,0134.

(С) Гистологический признак стеатоза по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: 16 нед. AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, не достоверно; 16 нед. AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, не значимо. (D) Гистологический признак воспаления по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: 16 нед. AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, не значимо; 16 нед. AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, *=0,0112.

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

[204] Рацион "AMLN", разработанный Amylin Pharmaceuticals (Clapper 2013), представляет собой модифицированный вариант рациона ALIOS. Такая пища предусматривает уровень холестерина, повышенный в десять раз (2%), и дополнительную сахарозу. У мышей, находящихся на рационе "AMLN", через 20-30 недель развивался фиброз со степенью от легкой или умеренной (публикации Clapper, Mells and Kristiansen). Для этих исследований самцам мышей линии C57BL/6NCrl (Charles River Laboratories Inc.) возрастом от восьми до десяти недель вводили пустой вектор AAV или вектор AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}, как было описано ранее, для ускорения начала заболевания. Во время инъекции AAV мышей продолжали содержать на стандартном корме или им скормливали рацион Envigo TD.170748 в сочетании с питьевой водой, дополненной смесью из 55% фруктозы и 45% глюкозы (Sigma, F0127 и G7021 соответственно), до умерщвления.

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

[206] Быстрозамороженную ткань печени обрабатывали для анализа экспрессии РНК и генов, как это было описано ранее. Результаты представлены как для необработанного значения Ct, так и для относительной экспрессии мРНК указанного гена, нормализованной по отношению к Gapdh мыши. (анализы TaqManTM от Invitrogen:

PNPLA3 человека, hs00228747_m1; Pnpla3 мыши, Mm00504420_m1; Colla1 мыши, Mm00801666_g1; Col3a1 мыши, Mm01254471_g1; Col4a1, Mm01210125_m1; Gapdh мыши, 4352932E). Colla1, Col3a1 и Col4a1 представляют собой маркеры внеклеточного матрикса, связанные с активацией звездчатых клеток печени и фиброзом печени (Baiocchi 2016).

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

[208] Проводили анализ сыворотки крови на содержание TIMP1 мыши (R&D Systems, MTM100) и мышиногo цитокератина 18-M30 (Cusabio, CSB-E14265m) в соответствии с инструкциями производителя. В дополнение к TIMP1, цитокин 18-M30 был идентифицирован как потенциальный биомаркер NAFLD/NASH, в том числе раннего фиброза (Neuman 2014 и Yang 2015). **Фигура 5A-L.** Для оценки способности молекулы siRNA, специфичной к PNPLA3^{rs738409-rs738408}, предотвращать развитие раннего фиброза, мышам вводили пустой вектор (EV) AAV8, или вектор AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}, или среду-носитель, и их содержали на стандартном корме или переводили на рацион AMLN. Через две недели после инъекций AAV мышей обрабатывали siRNA D-2324 или средой-носителем раз в две недели в течение шести недель; в общей сложности проводили шесть циклов инъекций. У мышей отбирали ткани в момент времени десять недель. Результаты представлены в виде усредненных значений и стандартной погрешности, стандартный корм без AAV+среда-носитель и корм AMLN с вектором AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель, N=8 на группу; рацион AMLN с вектором AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и с вектором AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, N=12 на группу. Звездочки означают статистическую значимость для когорты, которую обрабатывали AAV8-PNPLA3^{rs738409-rs738408} со средой-носителем, которую рассчитали с помощью одностороннего дисперсионного анализа с использованием критерия множественных сравнений Даннетта. (А) Соотношение веса печени (грамм) и веса тела (грамм) на момент отбора тканей. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (В) Подтверждение экспрессии и сайленсинга мРНК PNPLA3 человека в печени с помощью qPCR. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши; сравнение групп PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (С) Анализ

экспрессии мРНК Pnpla3 мыши в печени с помощью qPCR указывает на то, что уровень экспрессии эндогенного Pnpla3 существенно не изменяется при сверхэкспрессии, опосредованной AAV, или при сайленсинге, индуцированном siRNA. (слева) Необработанное значение Ct и (справа) относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши; сравнение группы со стандартным рационом без AAV с группами, которым скармливали рацион AMLN, а именно PNPLA3^{rs738409-rs738408}+среда-носитель и PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA. (D) Уровни Timp1 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (E) Уровни СК18m30 в сыворотке крови представлены в пикограммах на миллилитр сыворотки крови. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (D) Гистологический признак воспаления по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, выражаемый в баллах как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, *=0,0108, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (G) Гистологический признак гиперплазии овальных клеток/желчных протоков по результатам окрашивания гематоксилином и эозином, оцениваемый как: в пределах нормы (0), минимальный (1), легкий (2), умеренный (3) и сильно выраженный (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **=0,0081. (H) Иммуногистохимическое окрашивание антителом к актину гладких мышц, оцениваемое как: в пределах нормы (0), минимальное (1), легкое (2), умеренное (3) и сильно выраженное (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, *=0,0101, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ***=0,0002. (I) Окрашивание трихромом Массона на фиброз, оцениваемое как: в пределах нормы (0), минимальное (1), легкое (2), умеренное (3) и сильно выраженное (4). Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, не значимо, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, не значимо. (J) Экспрессия мРНК Colla1 мыши в печени, оцениваемая с помощью qPCR. Относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (K) Экспрессия мРНК Col3a1 мыши в печени, оцениваемая с помощью qPCR. Относительная кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, ****<0,0001. (L) Экспрессия мРНК Col4a1 мыши в печени, оцениваемая с помощью qPCR. Относительная

кратность экспрессии мРНК, нормализованная по отношению к Gapdh мыши. Скорректированные Р-значения: группа без AAV+среда-носитель, ****<0,0001, AAV-EV+среда-носитель, ***<0,0005, AAV- PNPLA3^{rs738409-rs738408}+siRNA, **<0,0041.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция для RNAi, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок, имеющий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности, представленной в таблице 1 или 2, и где конструкция для RNAi подавляет экспрессию белка 3, содержащего пататин-подобный фосфолипазный домен (PNPLA3).

2. Конструкция для RNAi по п. 1, где антисмысловая нить содержит участок, который комплементарен последовательности мРНК PNPLA3.

3. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где смысловая нить содержит участок, имеющий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности, представленной в таблице 1 или 2.

4. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где конструкция предпочтительно подавляет минорный аллель PNPLA3-rs738409.

5. Конструкция для RNAi по п. 4, где конструкция на по меньшей мере 10% сильнее подавляет минорный аллель PNPLA3-rs738409, чем основной аллель.

6. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где конструкция предпочтительно подавляет минорный аллель PNPLA3-rs738408.

7. Конструкция для RNAi по п. 6, где конструкция на по меньшей мере 10% сильнее подавляет два минорных аллеля PNPLA3-rs738409-rs738408, чем основной аллель.

8. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где смысловая нить содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, чтобы образовать дуплексный участок длиной от приблизительно 15 до приблизительно 30 пар оснований.

9. Конструкция для RNAi по п. 8, где длина дуплексного участка составляет от приблизительно 17 до приблизительно 24 пар оснований.

10. Конструкция для RNAi по п. 8, где длина дуплексного участка составляет от приблизительно 19 до приблизительно 21 пары оснований.

11. Конструкция для RNAi по п. 10, где длина дуплексного участка составляет 19 пар оснований.

12. Конструкция для RNAi по любому из пп. 8-11, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити составляет от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов.

13. Конструкция для RNAi по п. 12, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити составляет от приблизительно 19 до приблизительно 27 нуклеотидов.

14. Конструкция для RNAi по п. 12, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити составляет от приблизительно 21 до приблизительно 25 нуклеотидов.

15. Конструкция для RNAi по п. 12, где длина каждой из смысловой нити и

антисмысловой нити составляет от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов.

16. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-15, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один тупой конец.

17. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-15, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный липкий конец из 1-4 неспаренных нуклеотидов.

18. Конструкция для RNAi по п. 17, где нуклеотидный липкий конец имеет 2 неспаренных нуклеотида.

19. Конструкция для RNAi по п. 17 или п. 18, где конструкция для RNAi содержит нуклеотидный липкий конец на 3'-конце смысловой нити, 3'-конце антисмысловой нити или 3'-конце как смысловой нити, так и антисмысловой нити.

20. Конструкция для RNAi по любому из пп. 17-19, где нуклеотидный липкий конец содержит динуклеотид 5'-UU-3' или динуклеотид 5'-dTdT-3'.

21. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-20, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

22. Конструкция для RNAi по п. 21, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-модифицированный нуклеотид.

23. Конструкция для RNAi по п. 21, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, бициклическую нуклеиновую кислоту (BNA), гликолевую нуклеиновую кислоту, инвертированное основание или их комбинации.

24. Конструкция для RNAi по п. 23, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид или их комбинации.

25. Конструкция для RNAi по п. 21, где все нуклеотиды в смысловой и антисмысловой нитях являются модифицированными нуклеотидами.

26. Конструкция для RNAi по п. 25, где модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

27. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-26, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную межнуклеотидную связь.

28. Конструкция для RNAi по п. 27, где конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце антисмысловой нити.

29. Конструкция для RNAi по п. 27, где конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-конце антисмысловой нити и две последовательные фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце смысловой нити.

30. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-29, где антисмысловая нить содержит последовательность, выбранную из антисмысловых последовательностей, представленных в таблице 1 или таблице 2.

31. Конструкция для RNAi по п. 30, где смысловая нить содержит последовательность, выбранную из смысловых последовательностей, представленных в таблице 1 или таблице 2.

32. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-31, где конструкция для RNAi представляет собой любое из дуплексных соединений, представленных в любой из таблиц 1-2.

33. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-32, где конструкция для RNAi обеспечивает снижение уровня экспрессии PNPLA3 в клетках печени после инкубации с конструкцией для RNAi по сравнению с уровнем экспрессии PNPLA3 в клетках печени, которые инкубировали с контрольной конструкцией для RNAi.

34. Конструкция для RNAi по п. 27, где клетки печени представляют собой клетки Hep3B или HepG2.

35. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-26, где конструкция для RNAi на по меньшей мере 10% подавляет экспрессию PNPLA3 при 5 нМ в клетках Hep3B *in vitro*.

36. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-26, где конструкция для RNAi на по меньшей мере 10% подавляет экспрессию PNPLA3 при 5 нМ в клетках HepG2 *in vitro*.

37. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-26, где конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках Hep3B со значением IC₅₀, составляющим менее приблизительно 1 нМ.

38. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-26, где конструкция для RNAi подавляет экспрессию PNPLA3 в клетках HepG2 со значением IC₅₀, составляющим менее приблизительно 1 нМ.

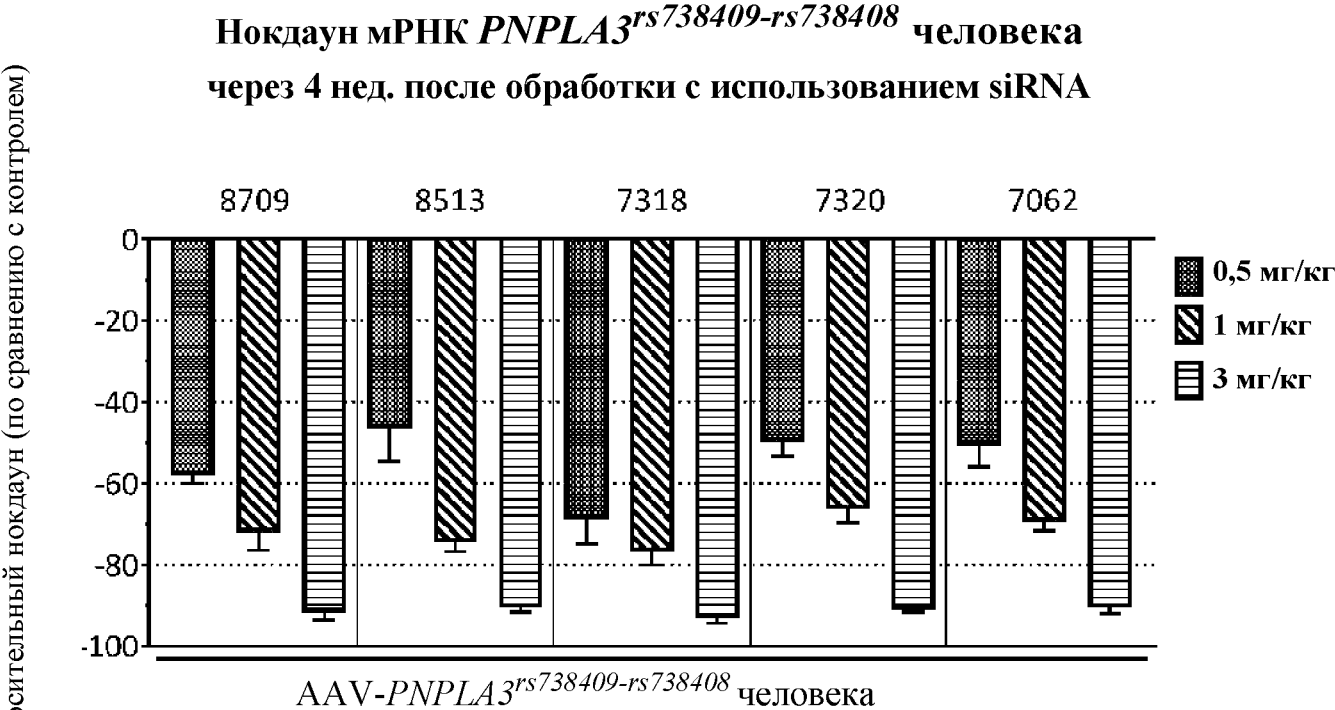
39. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию для RNAi по любому из пп. 1-38 и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

40. Способ снижения экспрессии PNPLA3 у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение пациенту конструкции для RNAi по любому из пп. 1-38.

41. Способ по п. 40, где уровень экспрессии PNPLA3 в гепатоцитах снижается у пациента после введения конструкции для RNAi по сравнению с уровнем экспрессии PNPLA3 у пациента, не получающего конструкцию для RNAi.

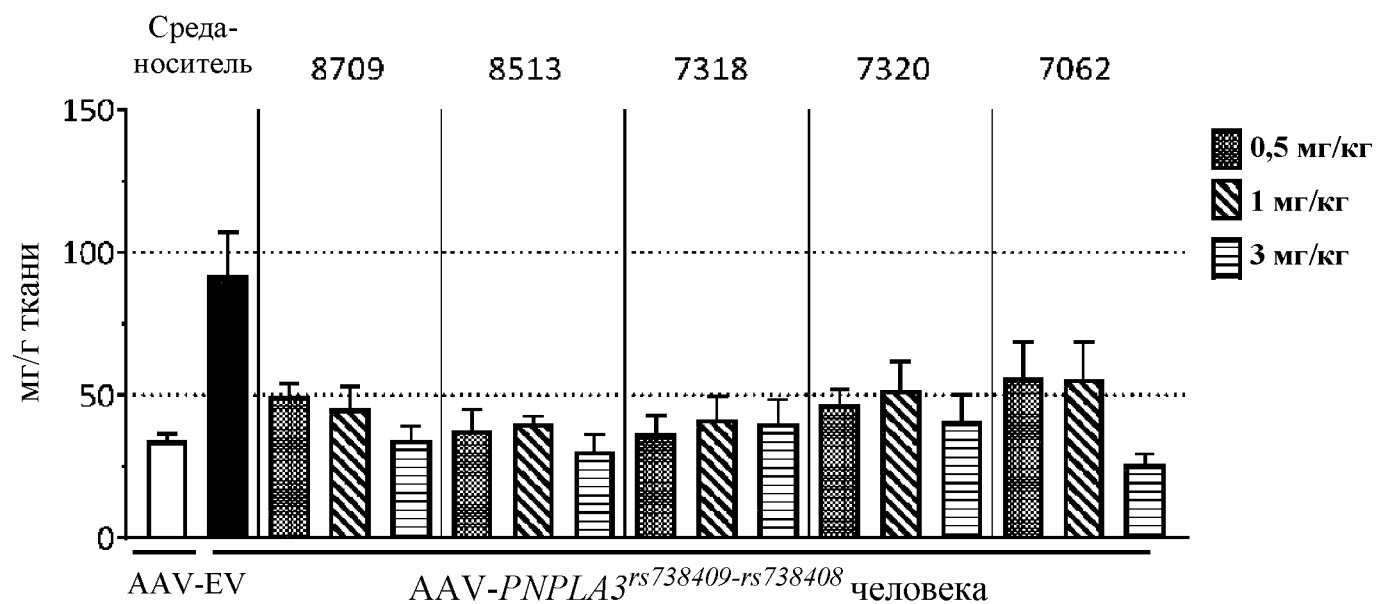
По доверенности

ФИГУРА 1А

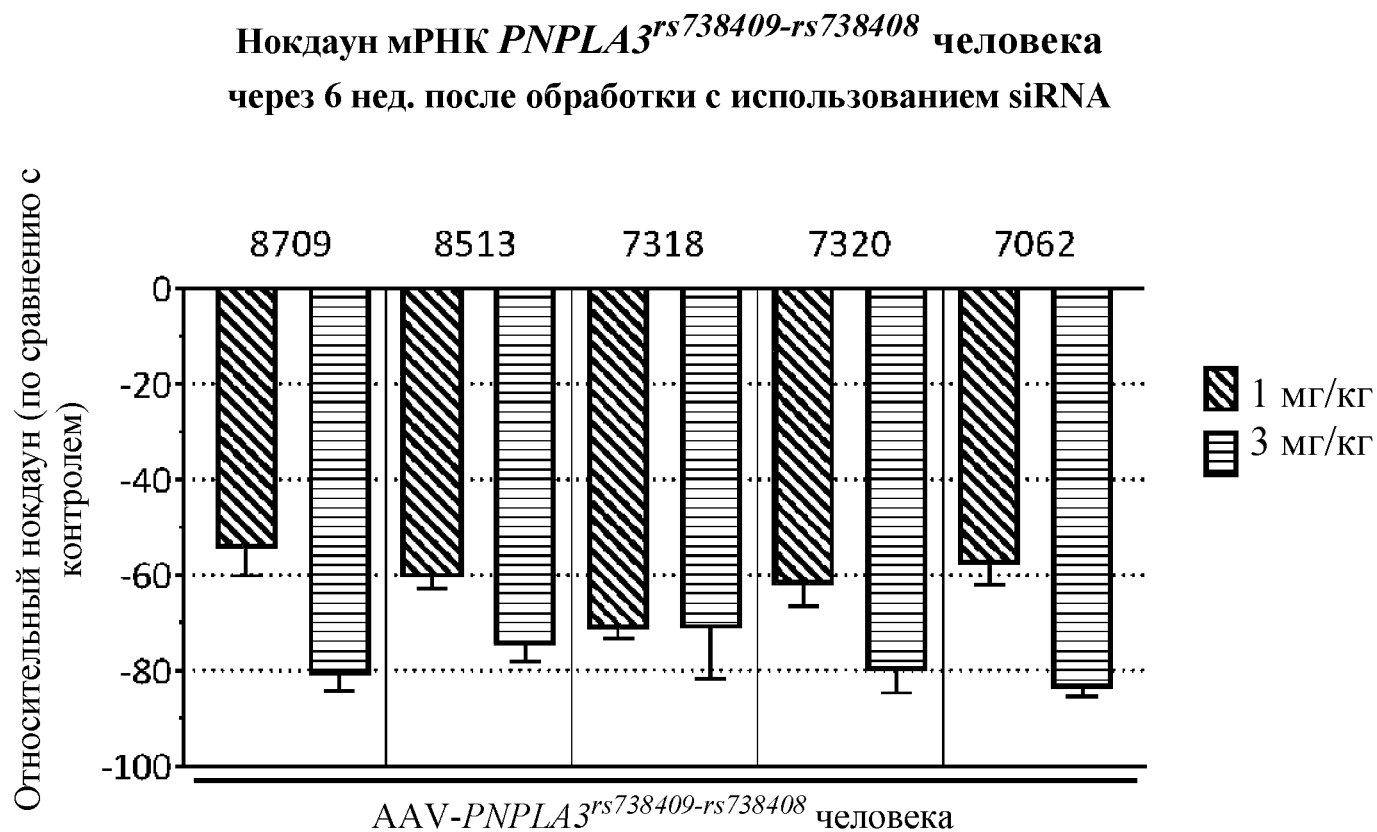


ФИГУРА 1В

Содержание триглицеридов в печени через 4 нед. после обработки с использованием siRNA



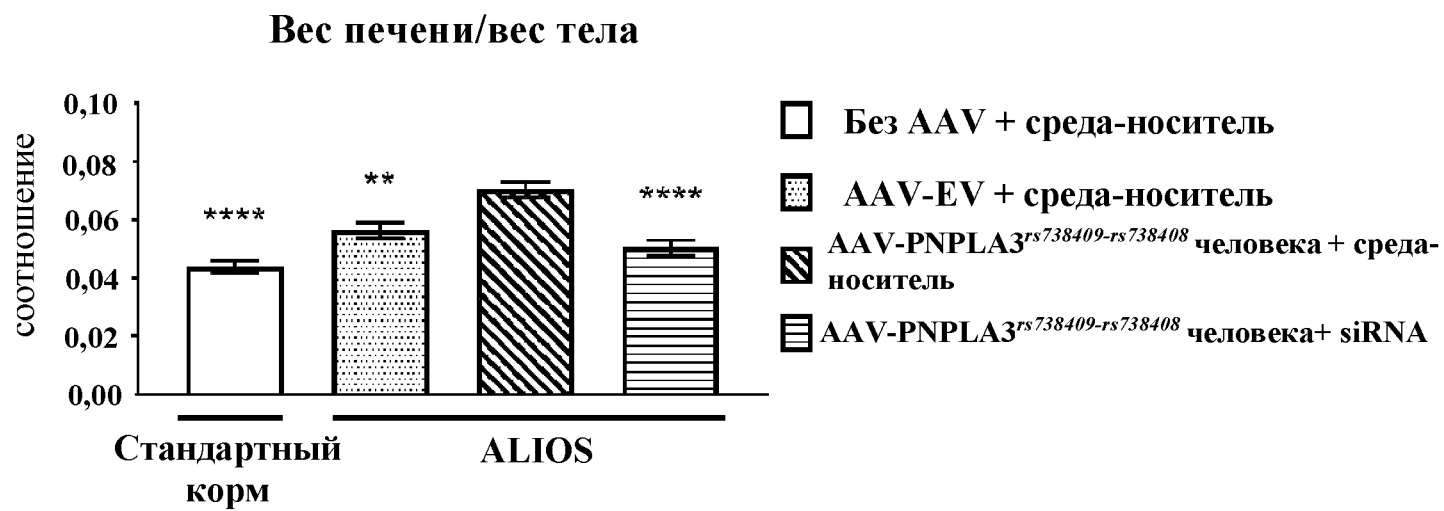
ФИГУРА 1С



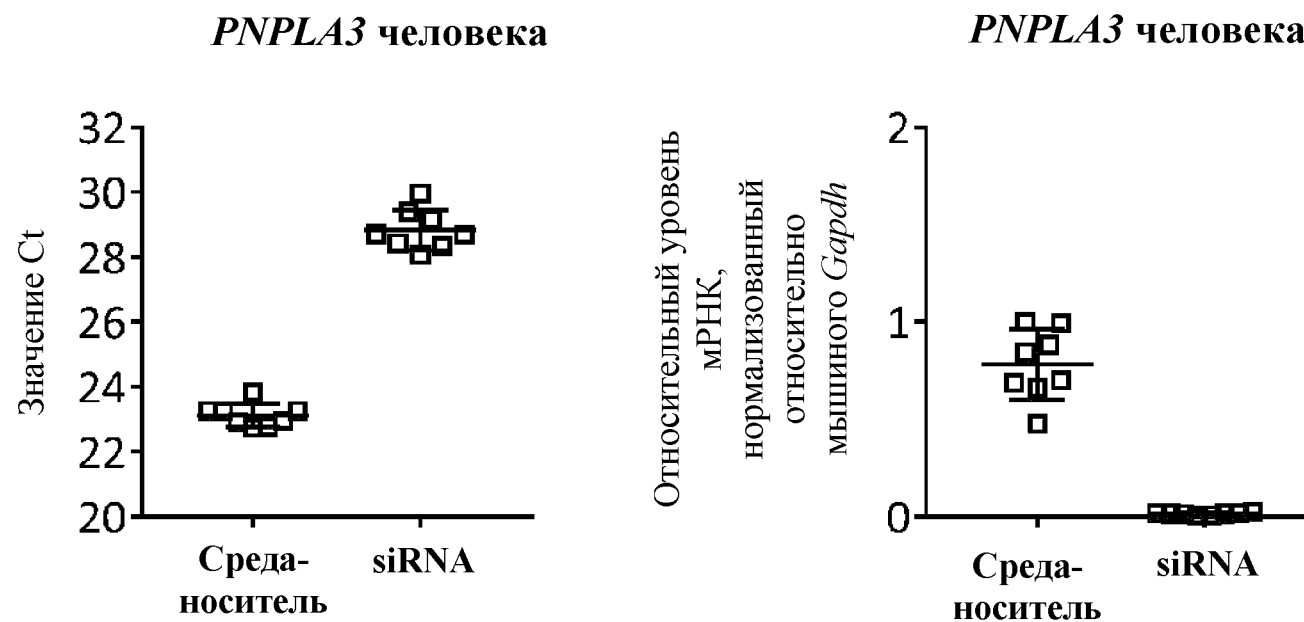
ФИГУРА 1D



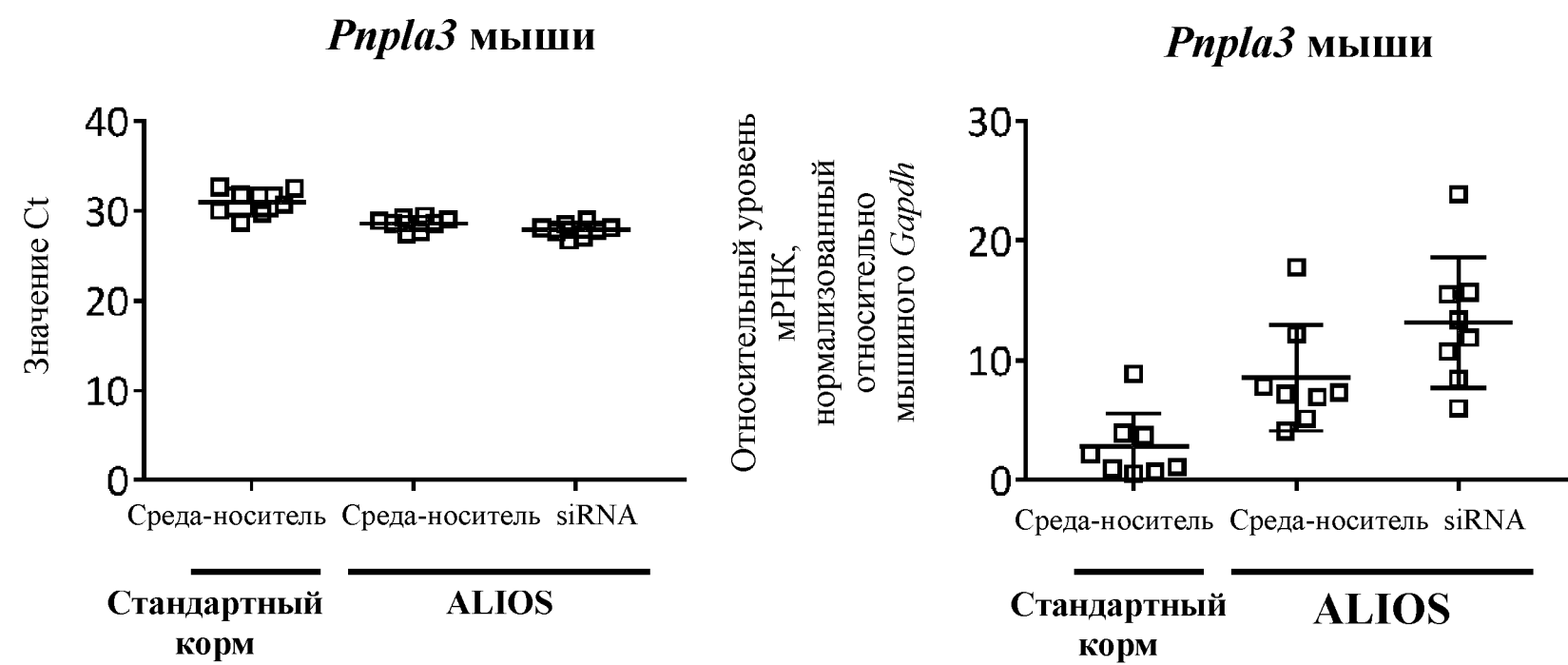
ФИГУРА 2А



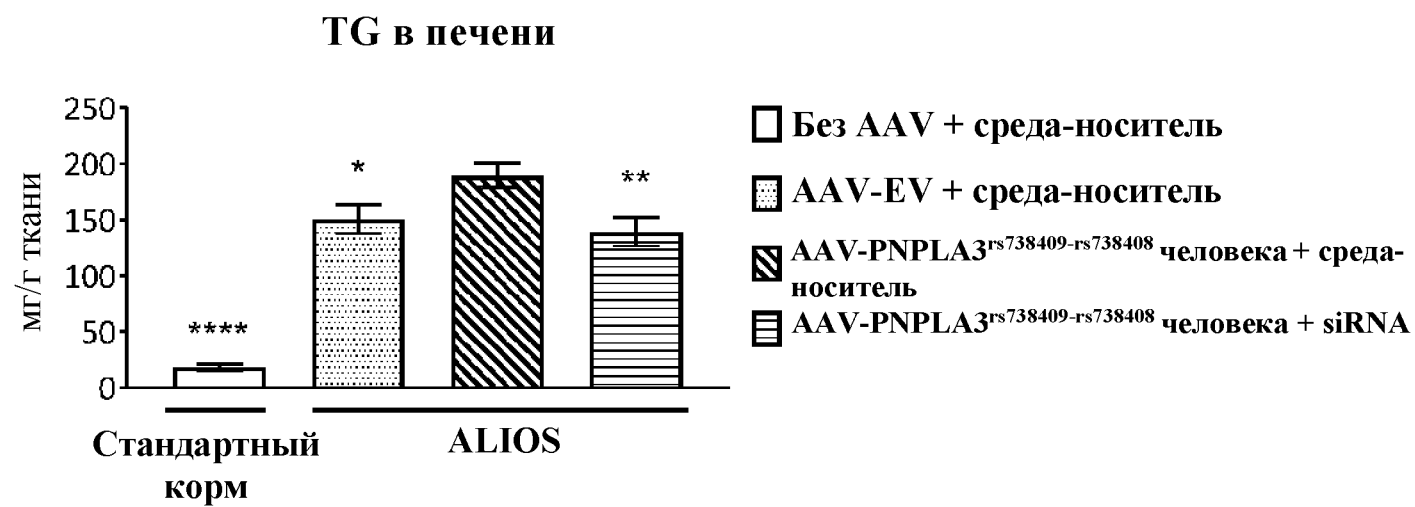
ФИГУРА 2В



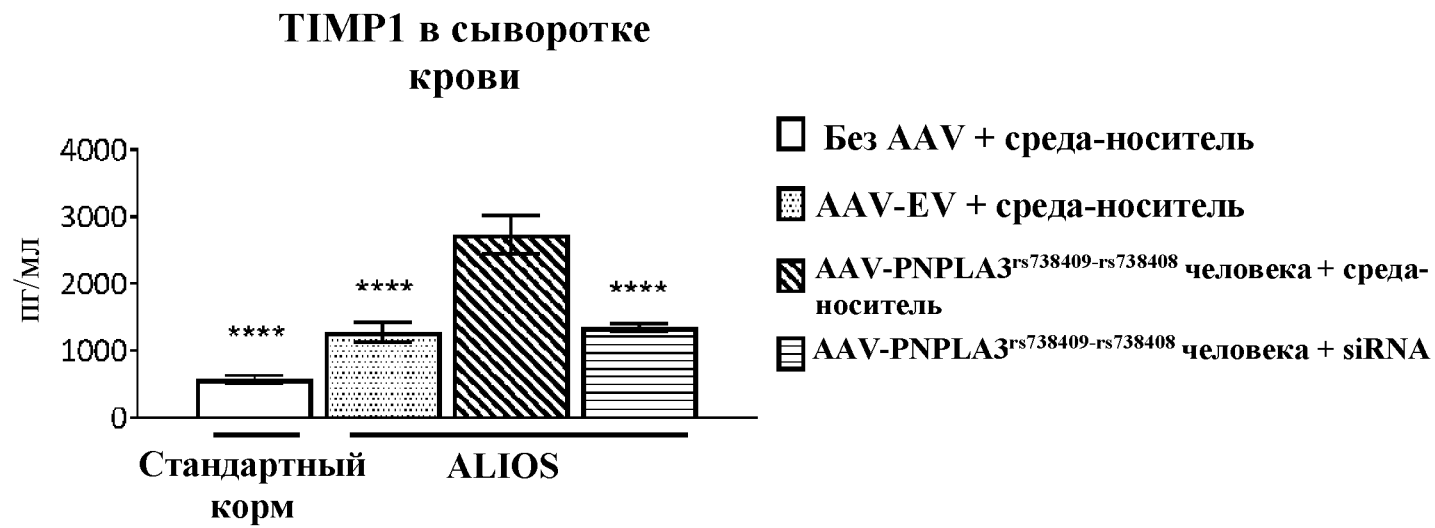
ФИГУРА 2С



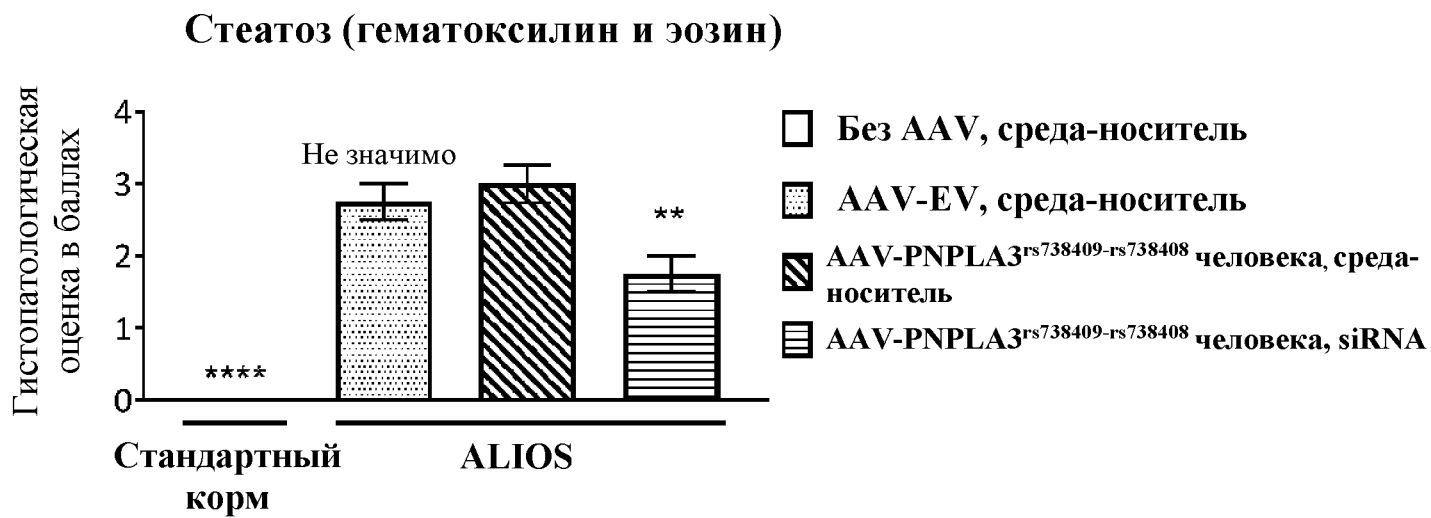
ФИГУРА 2D



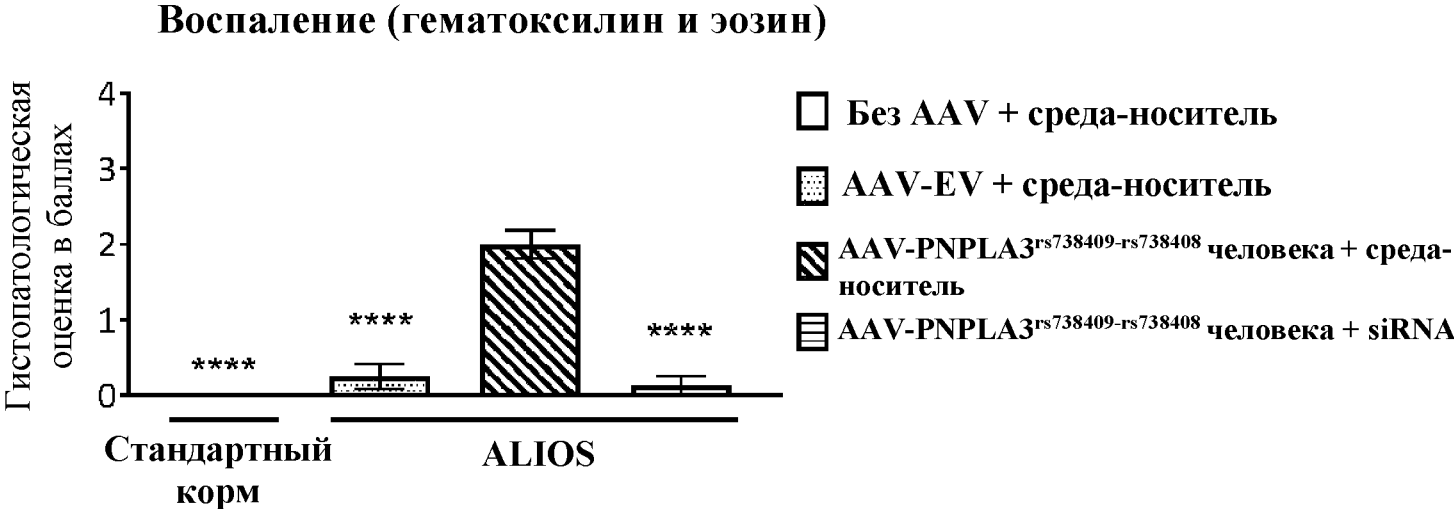
ФИГУРА 2Е



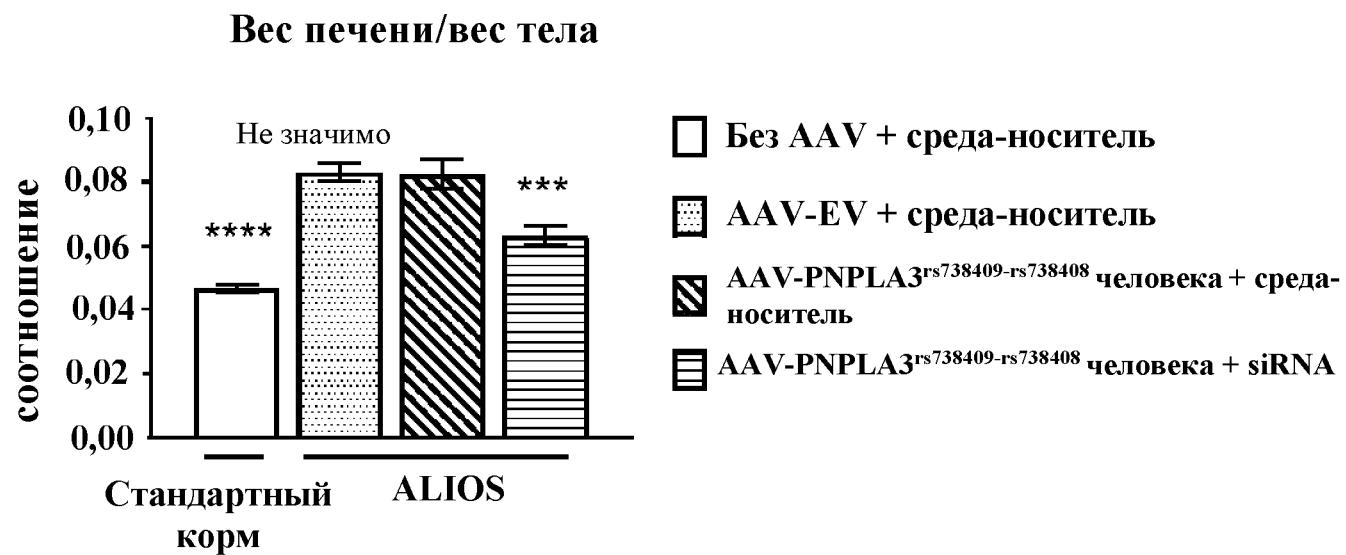
ФИГУРА 2F



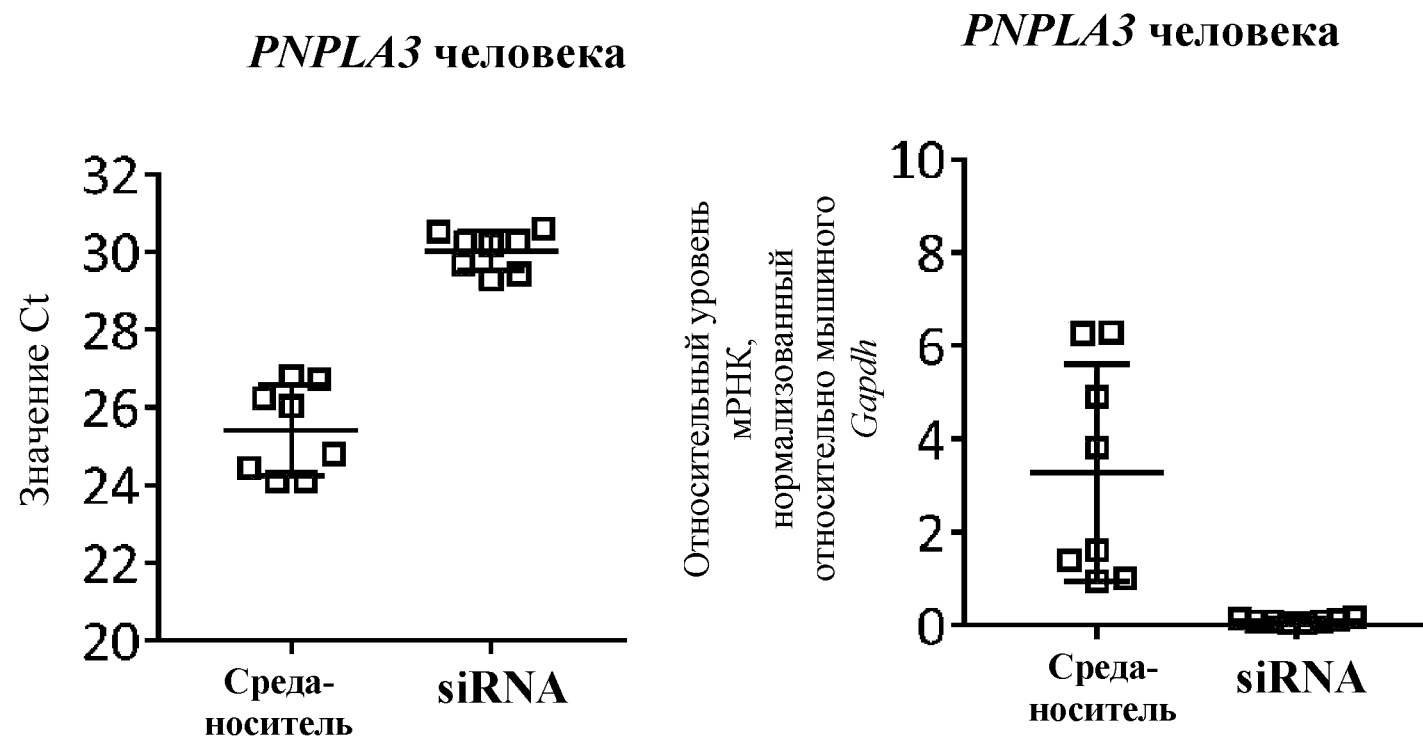
ФИГУРА 2G



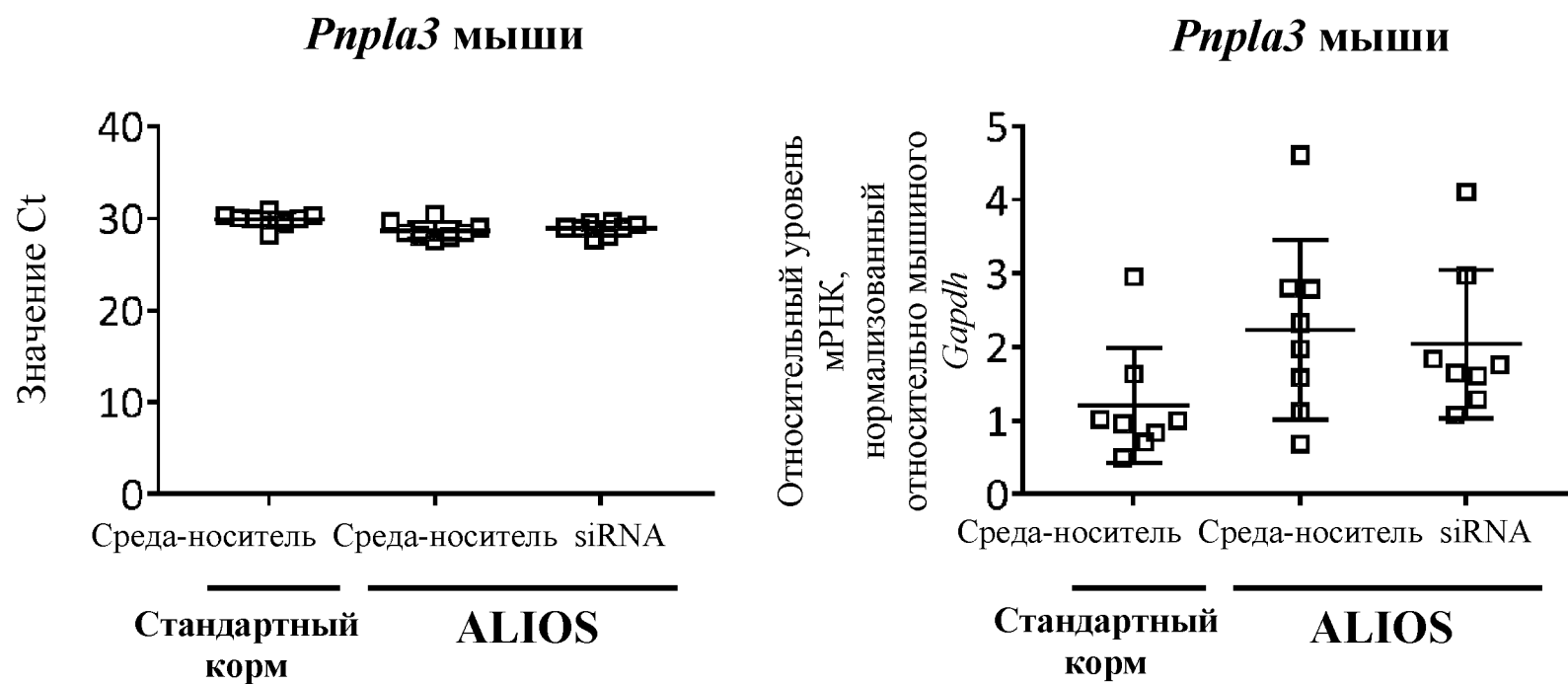
ФИГУРА 3А



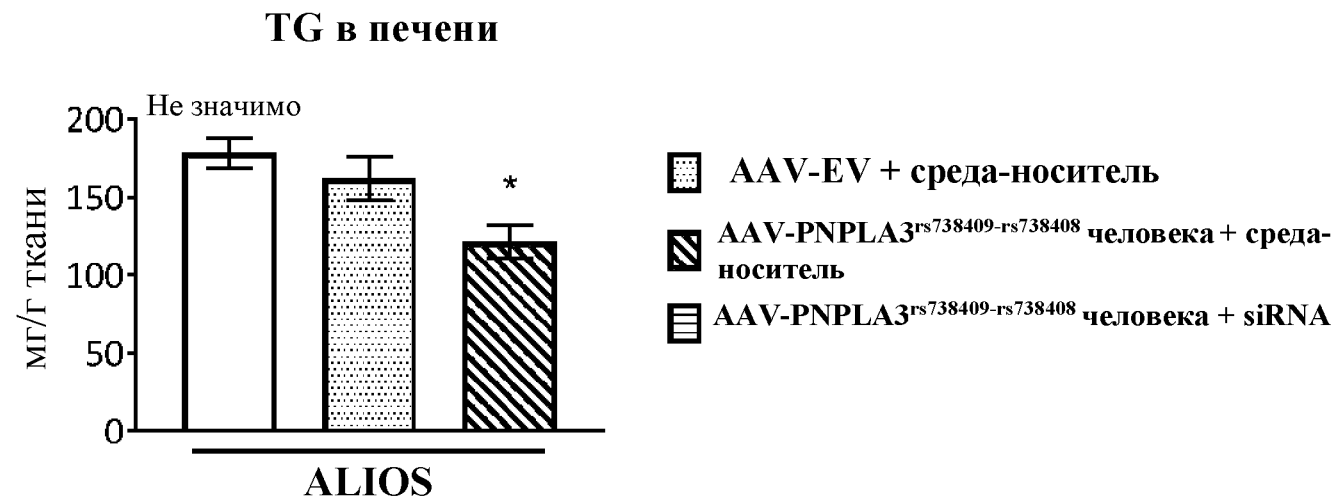
ФИГУРА 3В



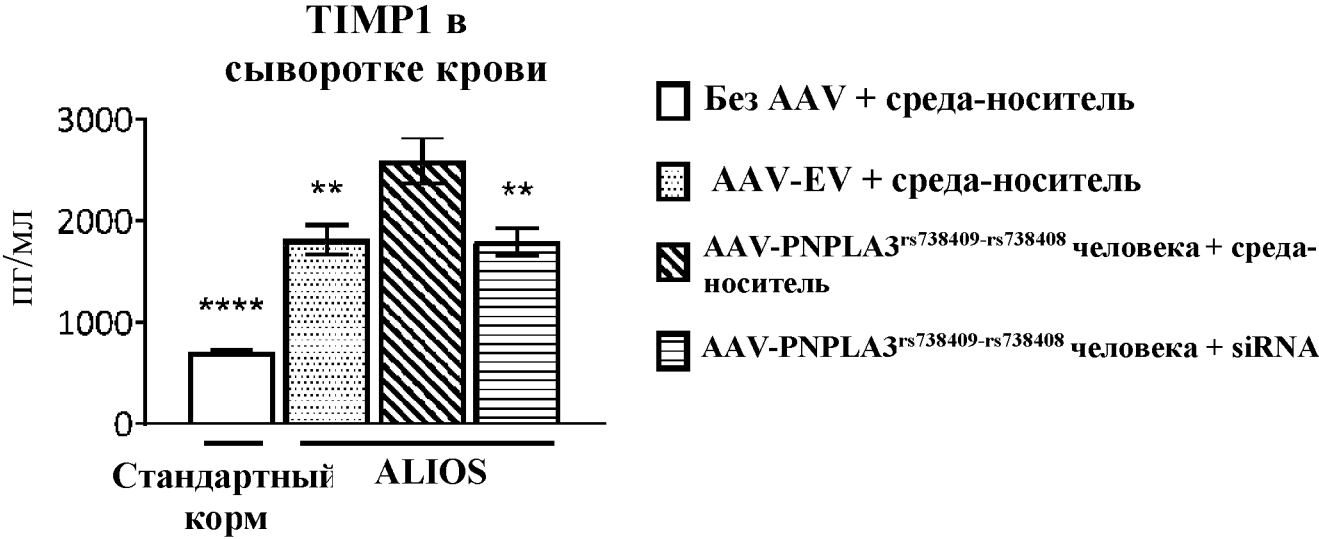
ФИГУРА 3С



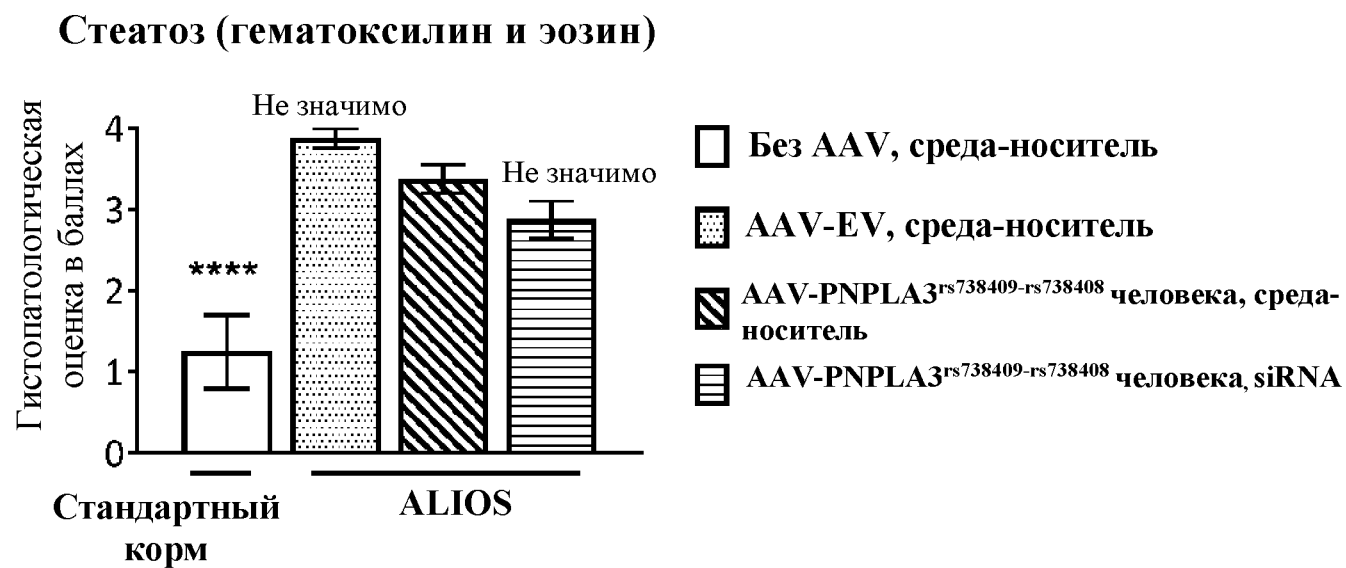
ФИГУРА 3D



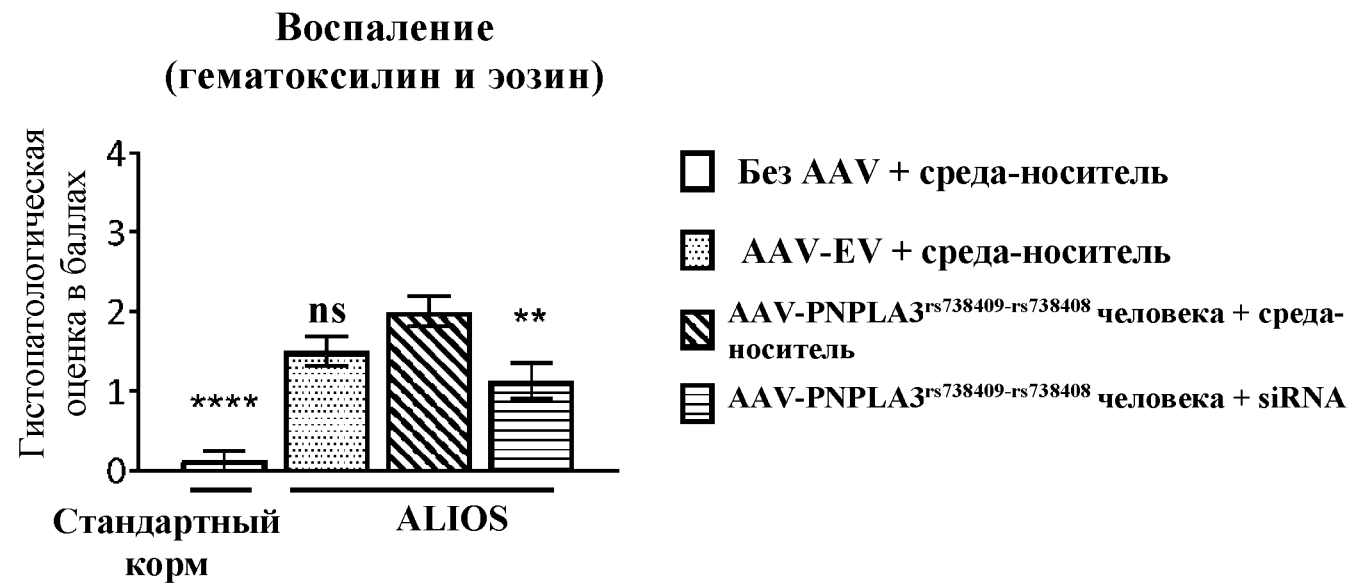
ФИГУРА 3Е



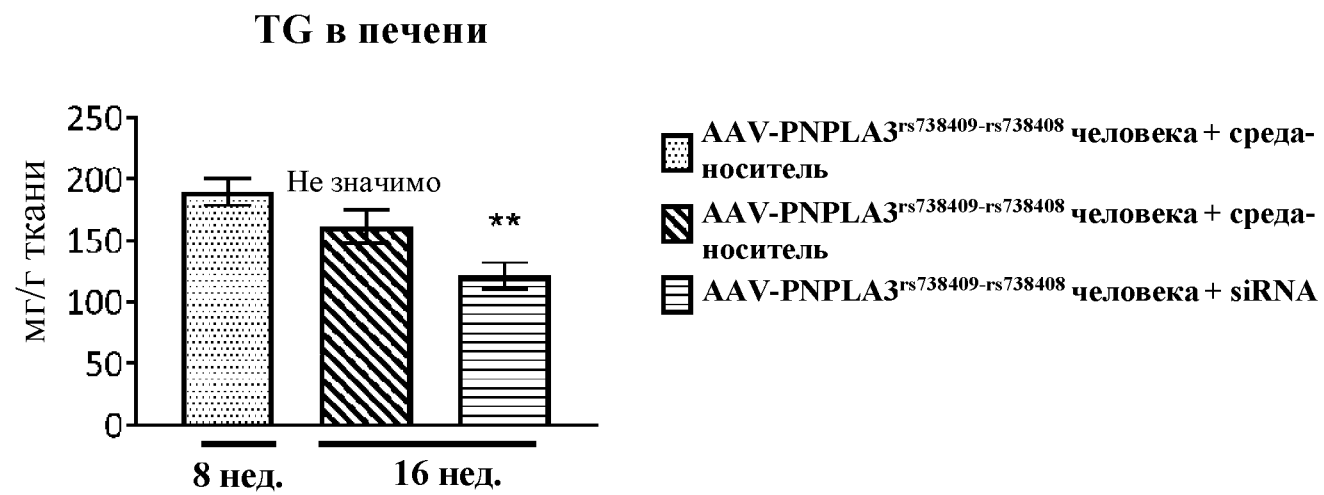
ФИГУРА 3F



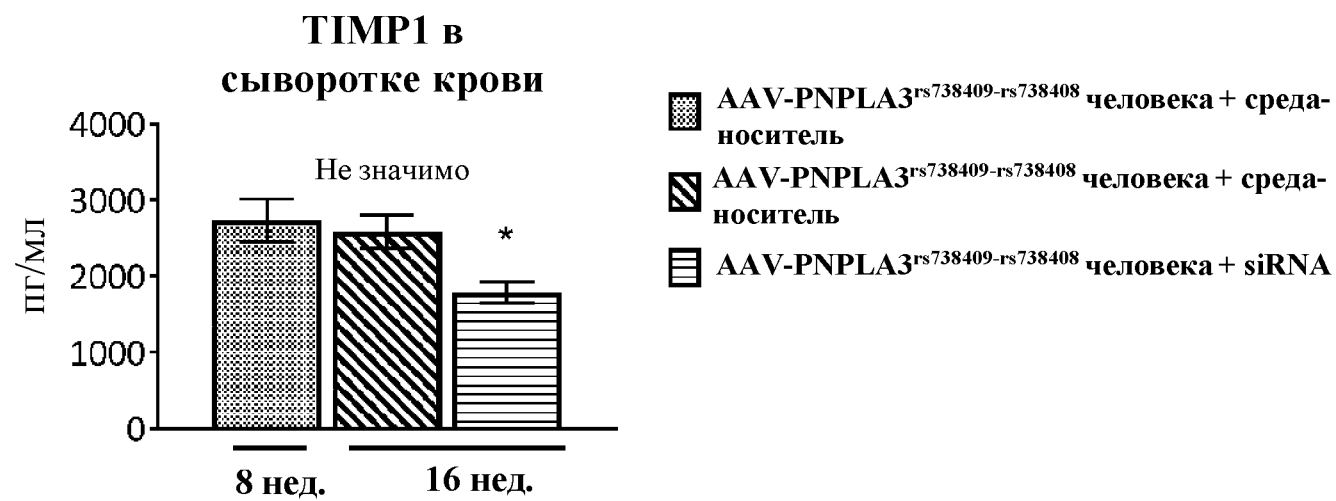
ФИГУРА 3G



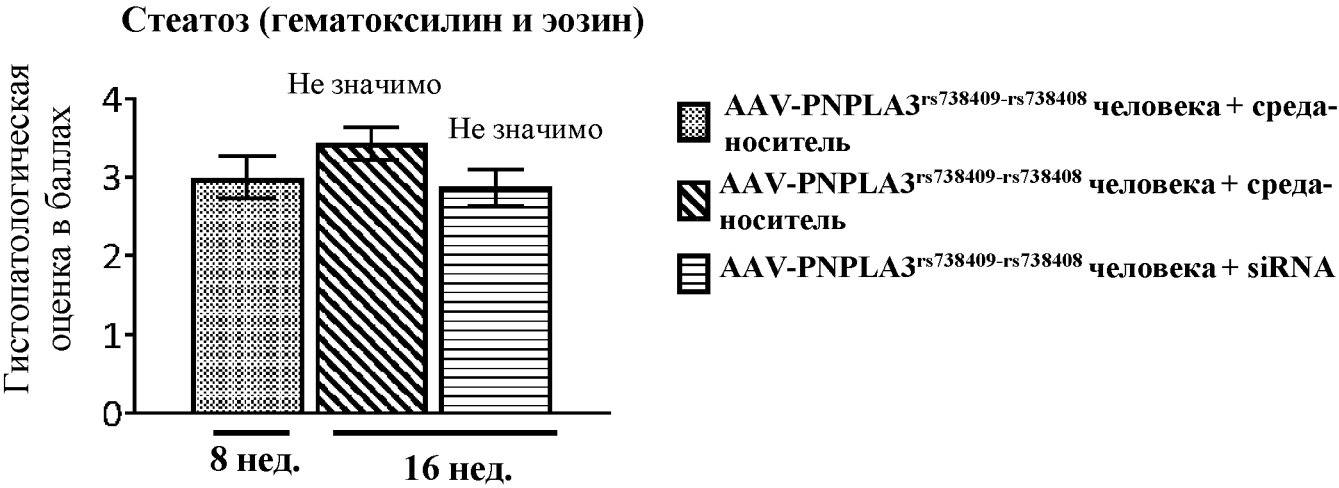
ФИГУРА 4А



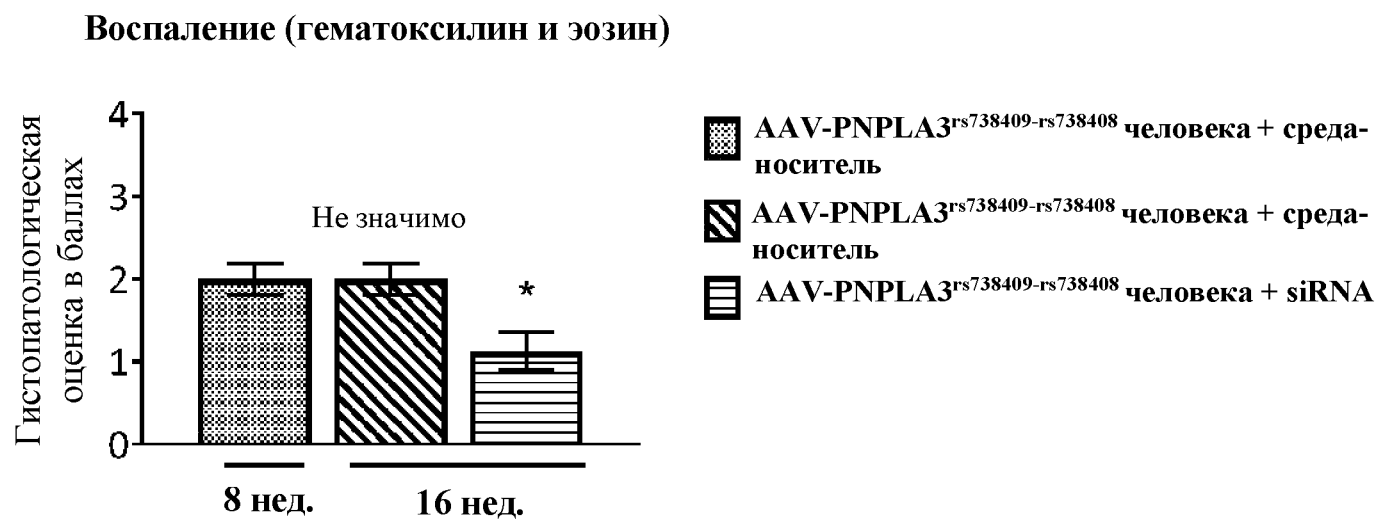
ФИГУРА 4В



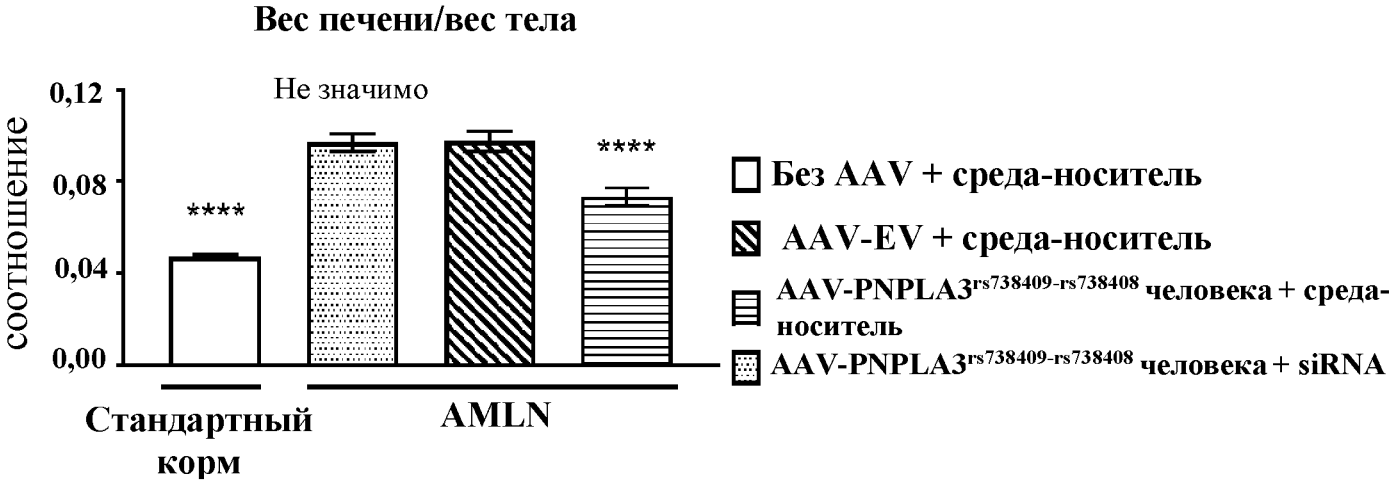
ФИГУРА 4С



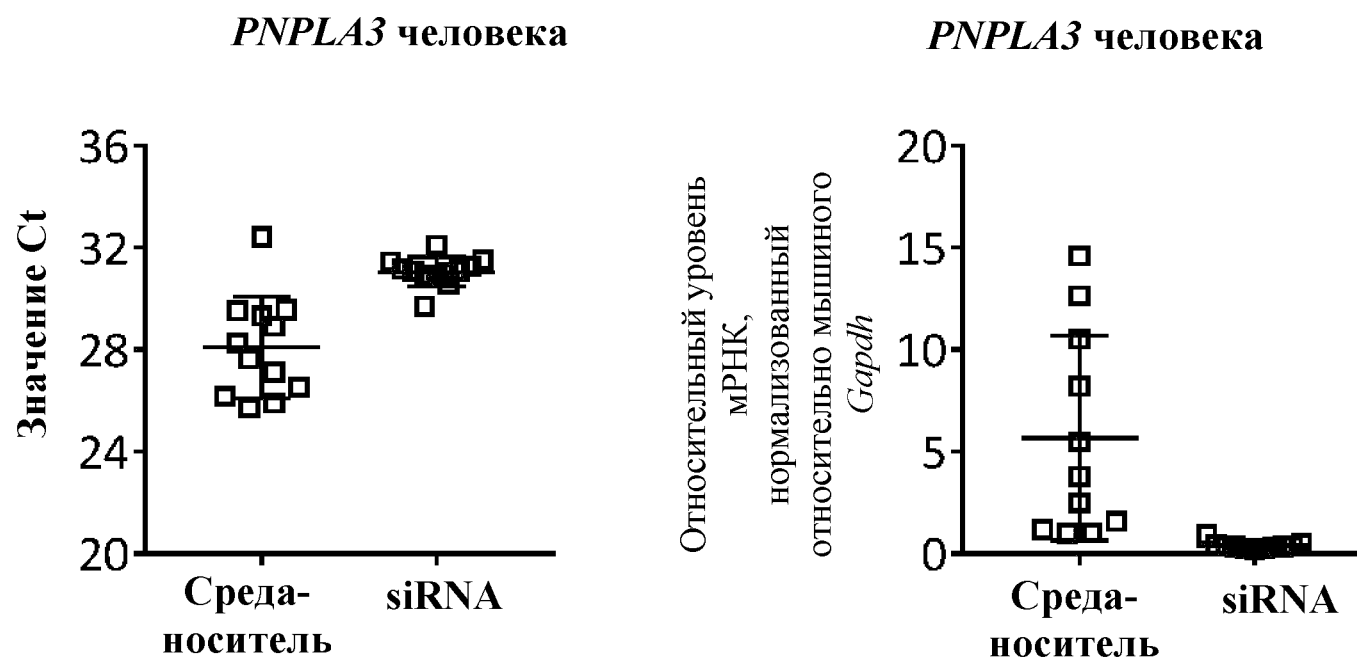
ФИГУРА 4D



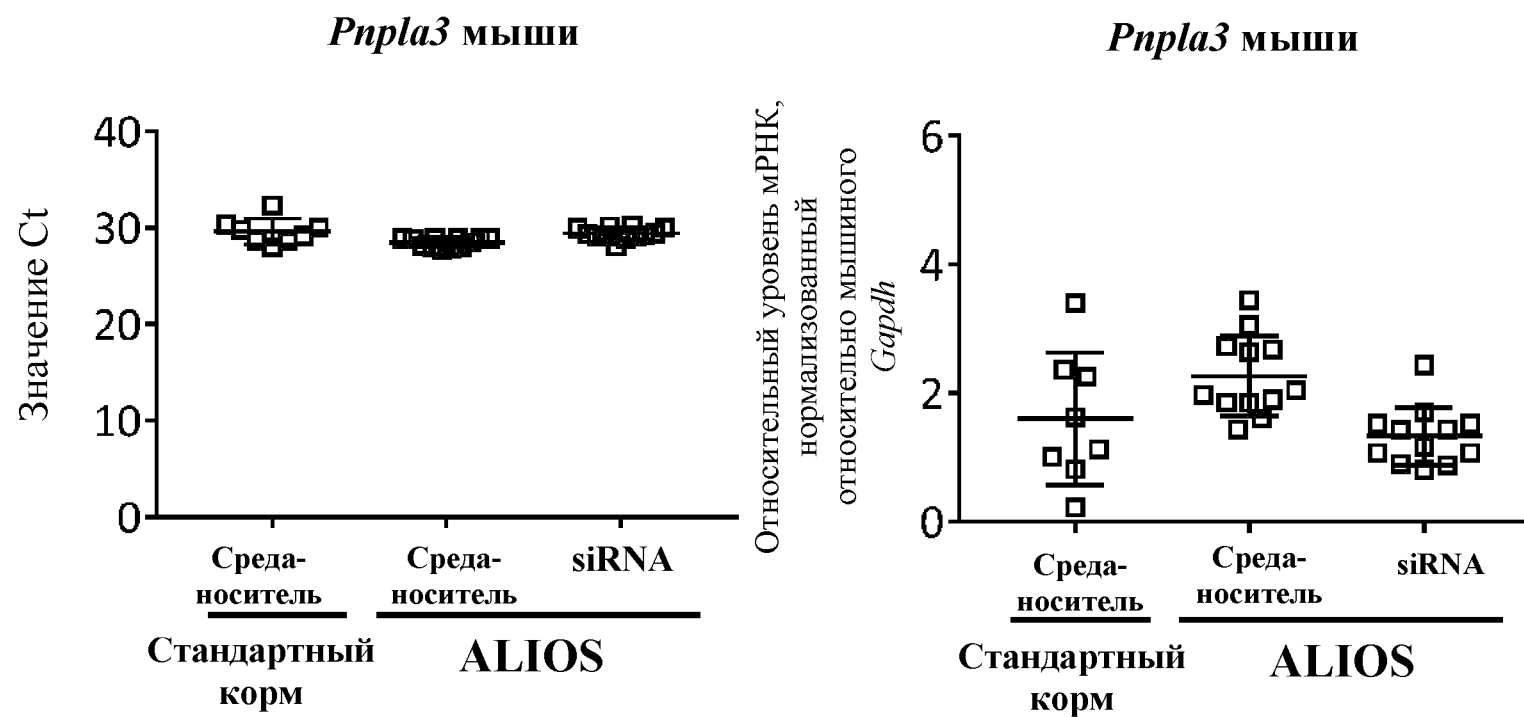
ФИГУРА 5А



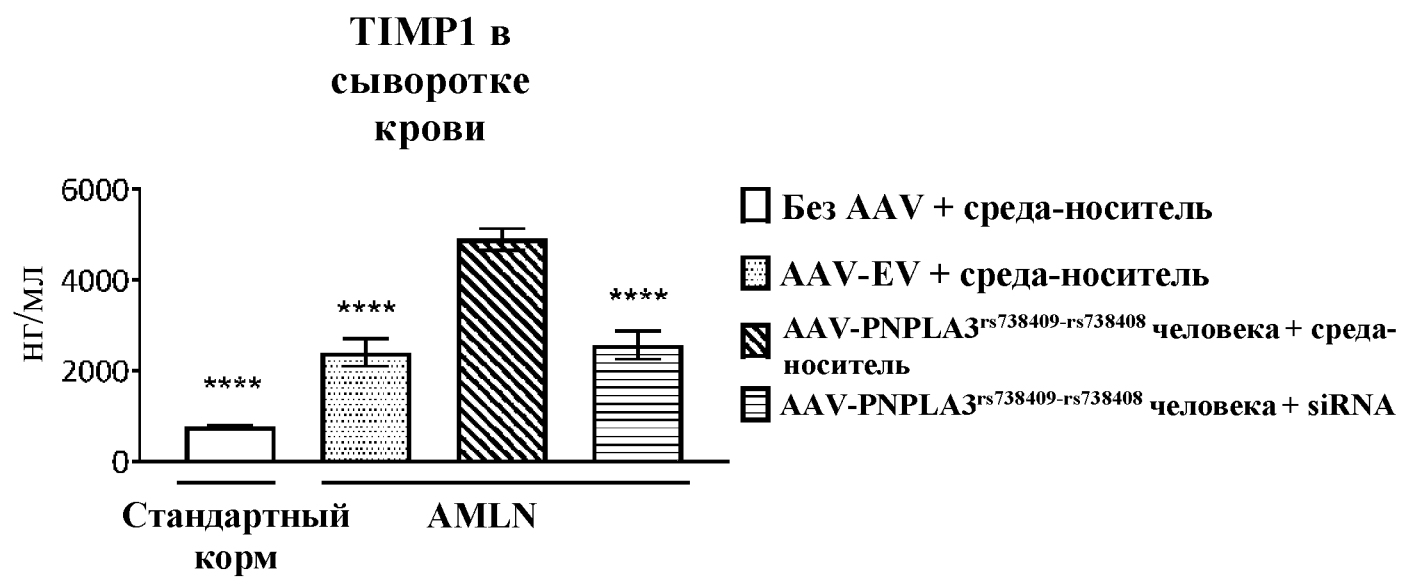
ФИГУРА 5В



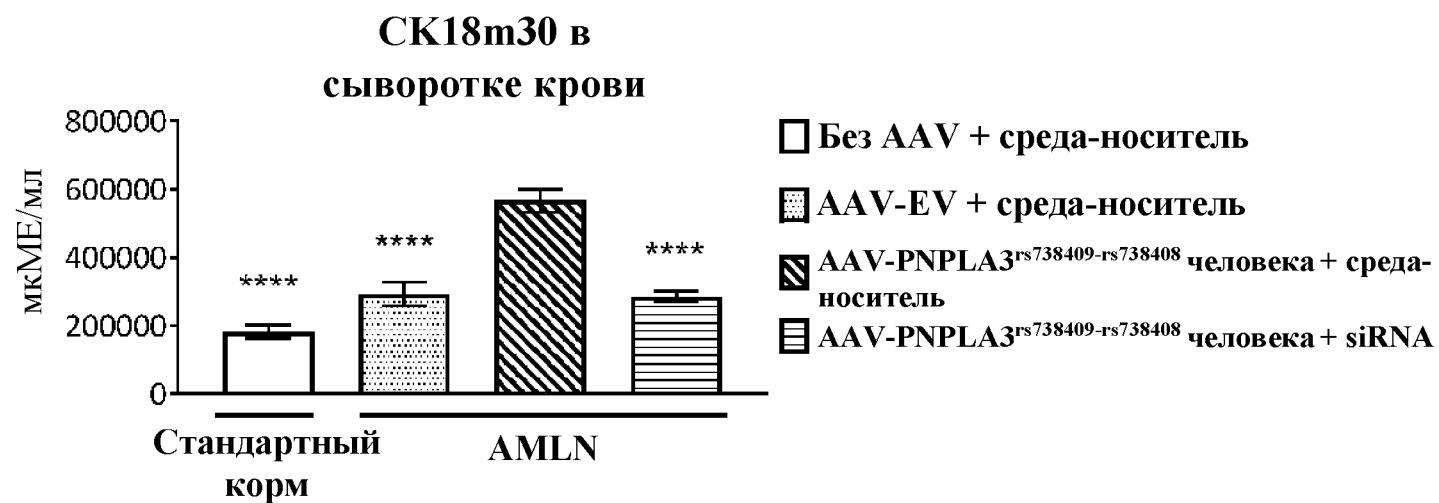
ФИГУРА 5С



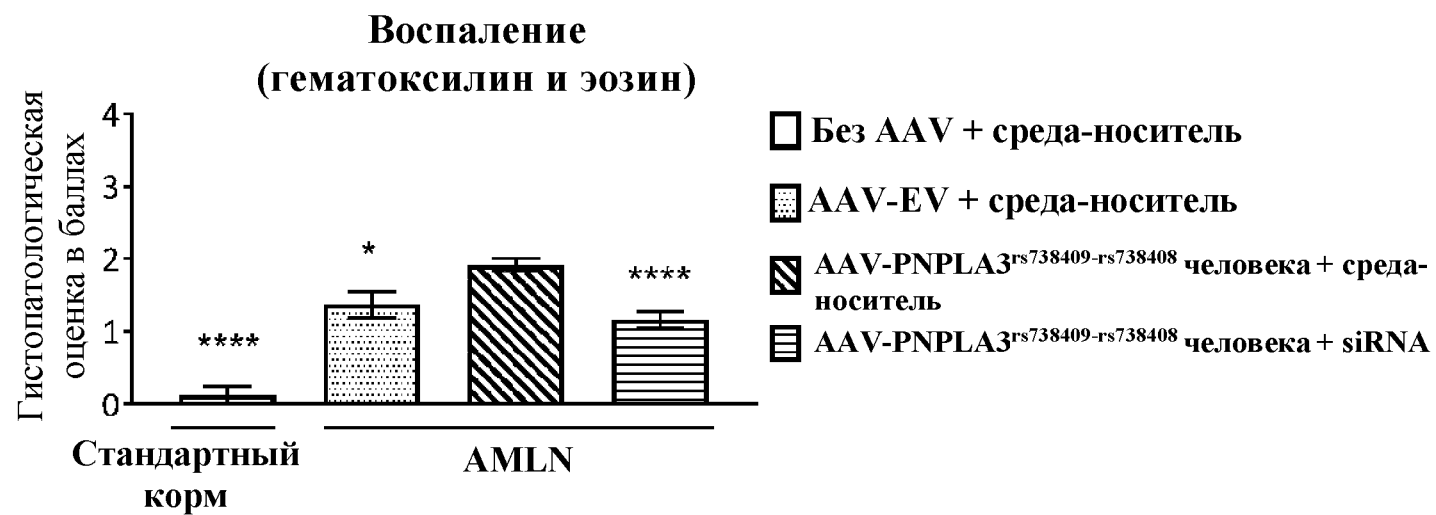
ФИГУРА 5D



ФИГУРА 5Е

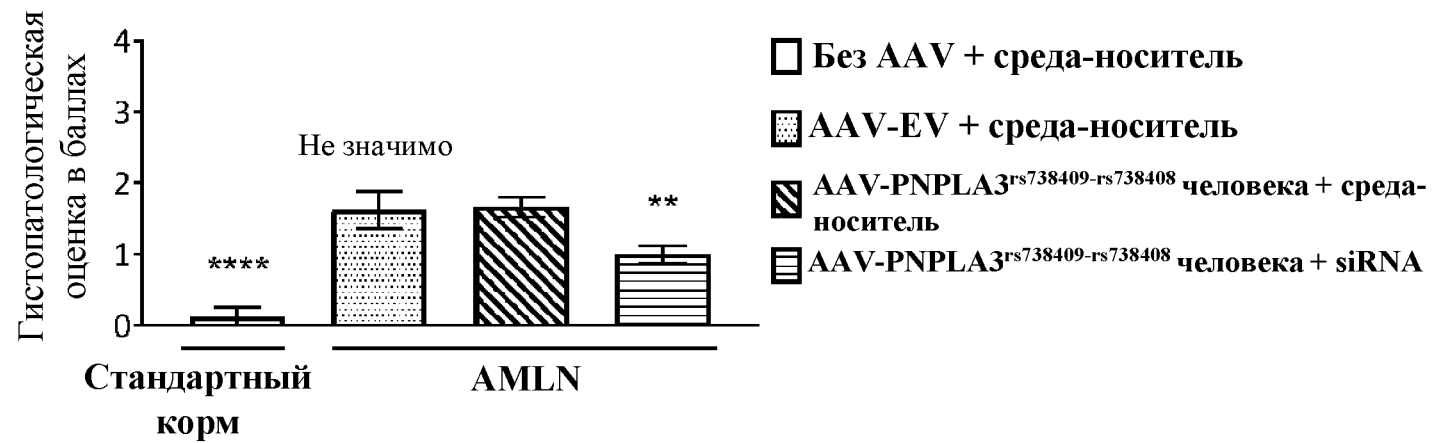


ФИГУРА 5F

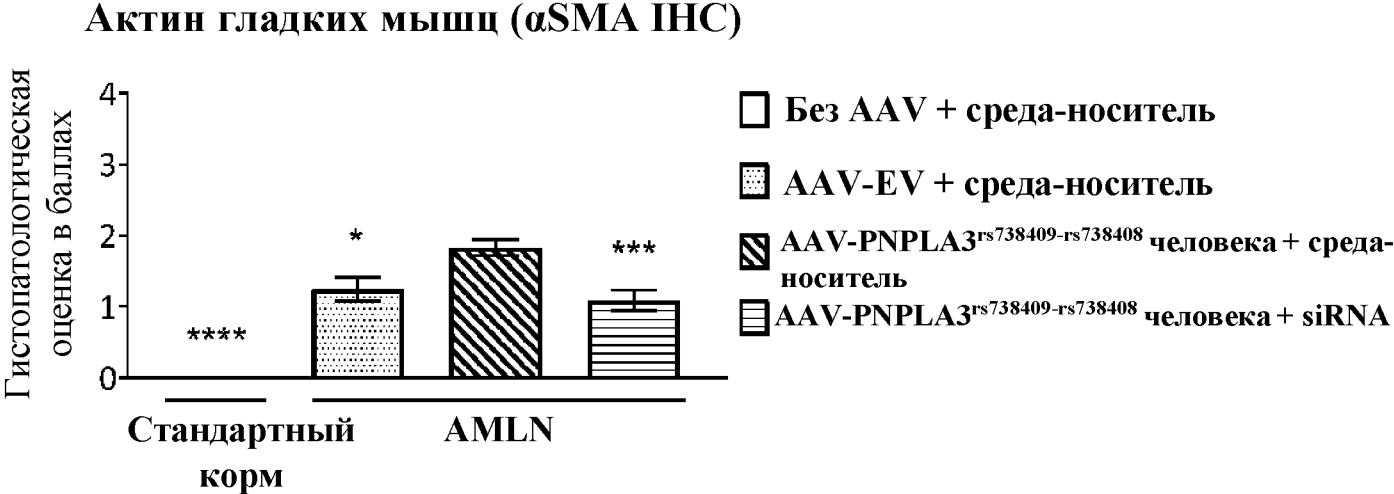


ФИГУРА 5G

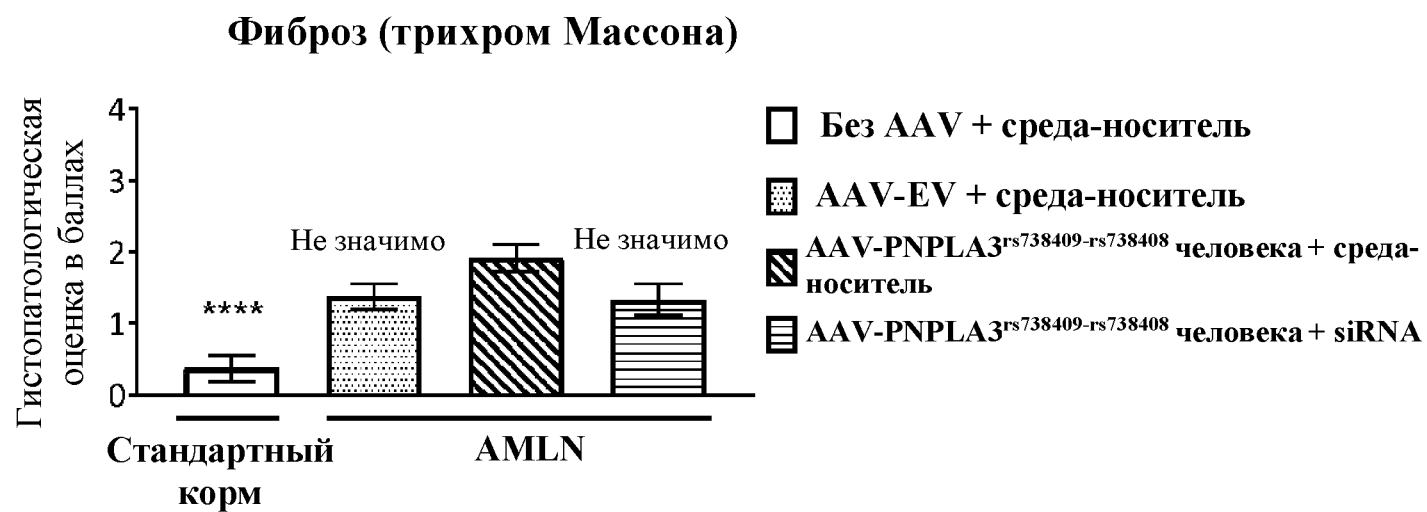
Гиперплазия овальных клеток печени/жёлчных протоков (гематоксилин и эозин)



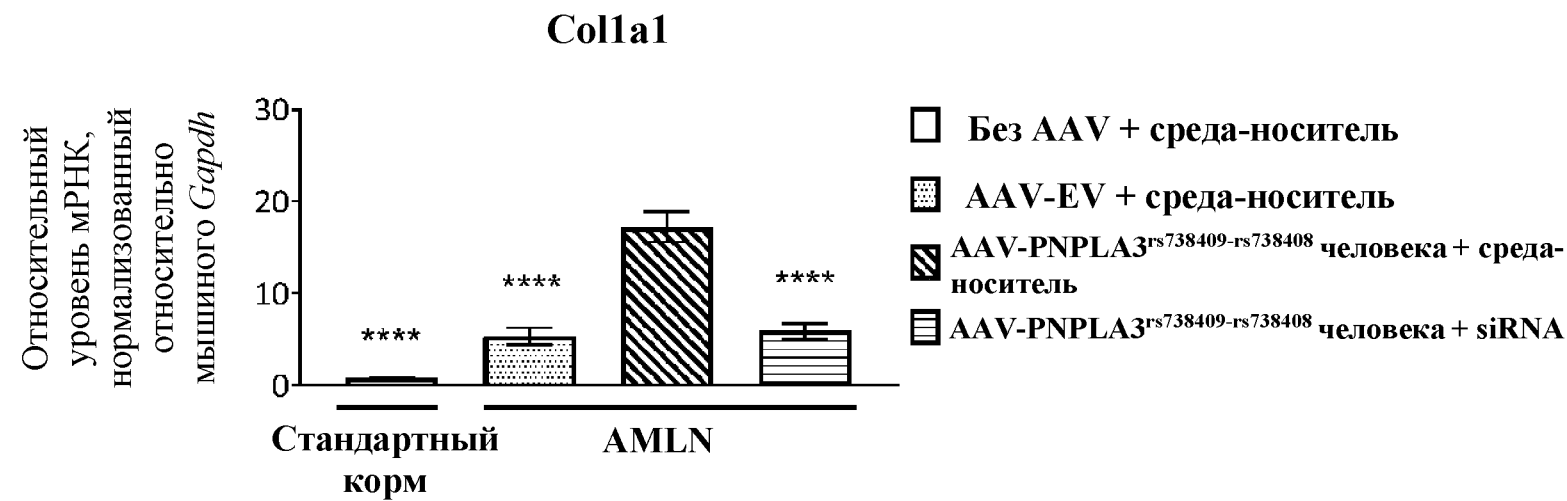
ФИГУРА 5Н



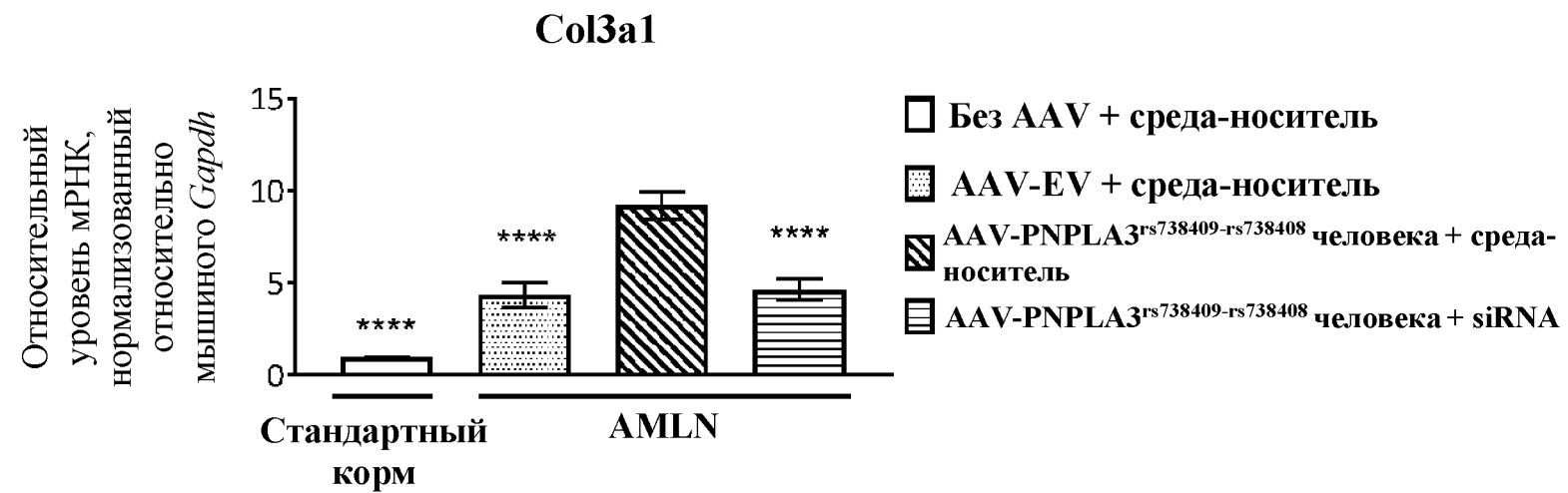
ФИГУРА 5I



ФИГУРА 5J



ФИГУРА 5К



ФИГУРА 5L

