

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037115**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.08

(51) Int. Cl. **A61K 31/713** (2006.01)

(21) Номер заявки
201790789

(22) Дата подачи заявки
2015.10.09

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА HAO1 (ОКСИДАЗЫ 1 ГИДРОКСИКИСЛОТ (ГЛИКОЛАТ-ОКСИДАЗЫ))**

(31) **62/062,751; 62/147,976; 62/214,602**

(56) **US-A1-20140288158**

(32) **2014.10.10; 2015.04.15; 2015.09.04**

US-A1-20110287974

(33) **US**

US-A1-20140221465

(43) **2017.08.31**

WO-A2-2013074974

(86) **PCT/US2015/054881**

WO-A2-2012023960

(87) **WO 2016/057893 2016.04.14**

US-A1-20110301229

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

(72) Изобретатель:
**Куэрбс Уилльям, Фитцджеральд
Кевин, Беттенкорт Брайан, Лайебоу
Эбигейл, Эрбе Дэвид В. (US)**

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

(57) Изобретение относится к средствам для RNAi, например двухнитевым средствам для RNAi, целенаправленно воздействующим на ген HAO1, и к способам применения таких средств для RNAi для ингибирования экспрессии HAO1, и к способам лечения субъектов, например, с PH1. В данном документе описаны двухнитевые средства для RNAi, которые ингибируют экспрессию гена HAO1 в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например млекопитающего, как, например, человека с ассоциированным с HAO1 нарушением, и применения таких двухнитевых средств для RNAi. В определенных аспектах настоящего изобретения практически все нуклеотиды iRNA согласно настоящему изобретению являются модифицированными.

B1**037115****037115****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 62/062751, поданной 10 октября 2014 г., и предварительной заявки на патент США № 62/147976, поданной 15 апреля 2015 г., и предварительной заявки на патент США № 62/214602, поданной 4 сентября 2015 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Перечень последовательностей

Заявка на данное изобретение включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате с кодировкой ASCII и настоящим включен в данный документ при помощи ссылки в полном объеме. Указанная копия файла с кодировкой ASCII, созданная 8 октября 2015 г., имеет название 30864PCT_CRF_sequencelisting.txt, и ее размер составляет 735705 байт.

Уровень техники

Первичная гипероксалурия 1 типа (PH1) представляет собой нарушение метаболизма глиоксилата с аутосомно-рецессивным типом наследования. Детоксикация глиоксилата в печени нарушена вследствие мутации гена AGXT, который кодирует пероксисомальный фермент печени - аланин-глиоксилат-аминотрансферазу (AGT). AGT1 является конечным ферментом в метаболическом расщеплении гидроксипролина. Потеря функции AGT перерабатывать промежуточный метаболит глиоксилат в глицин вызывает накопление и превращение глиоксилата в гликолат, который окисляется до оксалата при помощи фермента гликолат-оксидазы (GO), также известной как оксидаза гидроксикислот (HAO1).

Регуляция уровня глиоксилата, главного предшественника оксалата, происходит в нескольких участках клетки, в том числе митохондриях, пероксисоме и цитозоле. Избыточный оксалат у пациентов с PH1 не может быть полностью выведен почками, что приводит к образованию и отложению кристаллов оксалата кальция в почках и мочевыводящих путях. Повреждение почек вызвано сочетанием тубулярной токсичности от оксалата, нефрокальциноза и обструкции почек из-за камней. Более 30% пациентов достигают терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD).

Ген HAO1 кодирует фермент оксидазу 1 гидроксикислот, также известную как гликолат-оксидаза ("GO"). Белок HAO1 экспрессируется преимущественно в печени и представляет собой оксидазу 2-гидроксикислот, наиболее активную в отношении гликолата.

В мышинной модели PH1, в которой удален ген AGT1, уровни оксалатов в моче снижаются при удалении гена HAO1.

PH1, AGXT и HAO1 описаны в следующих источниках: Angel L. Pey, Armando Albert, и Eduardo Salido, "Protein Homeostasis Defects of Alanine-Glyoxylate Aminotransferase: New Therapeutic Strategies in Primary Hyperoxaluria Type I", BioMed Research International, vol. 2013, Article ID 687658, 15 pages, 2013. doi:10.1155/2013/687658; Cochat и Rumsby (2013), NEJM 369:7; Salido et al. (2006), PNAS 103:18249; Baker et al. (2004), American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, опубликовано 1 октября 2004 г, Vol. 287 No. 4, H1771-H1779 DOI: 10.1152/ajpheart.00234.2004.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие средства для RNAi, например средства на основе двухнитевой iRNA, целенаправленно воздействующие на HAO1. Настоящее изобретение также предусматривает способы, в которых применяют композиции согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии HAO1 и для лечения ассоциированных с HAO1 нарушений, например PH1.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана нуклеотидная последовательность мРНК HAO1 Homo sapiens (SEQ ID NO:1).

На фиг. 2 показана нуклеотидная последовательность мРНК HAO1 Mus musculus (SEQ ID NO: 2).

Фиг. 3А представляет собой график, на котором показаны результаты отбора in vitro конъюгатов GalNac-siRNA для GO (HAO) в первичных гепатоцитах макака-крабоеда.

Фиг. 3В представляет собой график, на котором показана кривая зависимости доза-эффект конъюгата GalNac-siRNA для GO (HAO) в первичных гепатоцитах макака-крабоеда.

Фиг. 4А представляет собой график, на котором показаны результаты оценки in vivo конъюгатов GalNac-siRNA для GO (HAO) у мышей линии C57B6 после однократной дозы.

Фиг. 4В представляет собой график, на котором показаны результаты оценки in vivo конъюгатов GalNac-siRNA для GO (HAO) у мышей линии C57B6 после повторной дозы.

Фиг. 5А представляет собой график, на котором показаны уровни оксалатов в моче у нокаутных (KO) по AGXT мышей после лечения при помощи конъюгатов GalNac-siRNA для GO (HAO).

Фиг. 5В представляет собой график, на котором показаны уровни гликолата в моче у KO по AGXT мышей после лечения при помощи конъюгатов GalNac-siRNA для GO (HAO).

Фиг. 6А представляет собой график, на котором показаны уровни мРНК AGXT в крысиной модели PH1 через 72 ч после однократной дозы siRNA AGXT.

Фиг. 6В представляет собой график, на котором показаны уровни оксалатов в моче в крысиной модели PH1 через 72 ч после лечения при помощи конъюгата GalNac-siRNA для GO (HAO).

Фиг. 6С представляет собой график, на котором показаны уровни оксалатов в моче в крысиной модели PH1, наблюдаемые в течение 49 дней с продолжающимся еженедельным введением доз на 14 и 21 дни как AF-011-63102, так и AD-62994 и сборами мочи за 24 ч, как показано.

Фиг. 6D представляет собой график, на котором показана продолжительность нокдауна HAO1 у крыс. Показаны уровни мРНК либо через одну неделю, либо через четыре недели после последней из 4 доз (что соответствует 28 и 49 дням на фиг. 6С) и приведены относительно уровней, наблюдаемых у крыс, которых лечили при помощи PBS.

На фиг. 7 показана обратная комплементарная последовательность нуклеотидной последовательности мРНК HAO1 Homo sapiens (SEQ ID NO: 3).

На фиг. 8 показана обратная комплементарная последовательность нуклеотидной последовательности мРНК HAO1 Mus musculus (SEQ ID NO: 4).

На фиг. 9 показана нуклеотидная последовательность мРНК HAO1 Macaca fascicularis (SEQ ID NO: 5).

На фиг. 10 показана нуклеотидная последовательность мРНК HAO1 Rattus norvegicus (SEQ ID NO: 6).

На фиг. 11 показана обратная комплементарная последовательность нуклеотидной последовательности мРНК HAO1 Macaca fascicularis (SEQ ID NO: 7).

На фиг. 12 показана обратная комплементарная последовательность нуклеотидной последовательности мРНК HAO1 Rattus norvegicus (SEQ ID NO: 8).

На фиг. 13 показан отбор *in vivo* конъюгатов GalNAc для GO.

Фиг. 14 представляет собой график, на котором показана оценка *in vivo* конъюгатов GO-GalNAc у мышей.

Фиг. 15 представляет собой график, на котором показана оценка эффекта дозы конъюгатов GO-GalNAc у мышей.

Фиг. 16 представляет собой график, на котором показана оценка эффекта дозы конъюгатов GO-GalNAc у мышей.

Фиг. 17 представляет собой график, на котором показана оценка эффекта дозы у мышей.

Фиг. 18 представляет собой два графика, на которых показана взаимосвязь нокдауна мРНК с уровнями гликолата в сыворотке крови у мышей.

Фиг. 19 представляет собой два графика, на которых показана взаимосвязь нокдауна мРНК с уровнями гликолата в сыворотке крови у крыс.

Фиг. 20 представляет собой график, на котором показано дозозависимое ингибирование мРНК HAO1 при помощи ALN-65585 в первичных гепатоцитах яванского макака.

Фиг. 21 представляет собой два графика, на которых показаны уровни мРНК HAO1 и гликолата в сыворотке крови после лечения при помощи однократной дозы ALN-GO1 у мышей.

Фиг. 22 представляет собой график, на котором показана продолжительность сайленсинга мРНК HAO1 после лечения при помощи однократной дозы ALN-GO1 у мышей.

Фиг. 23 представляет собой график, на котором показаны уровни мРНК HAO1 и гликолата в сыворотке крови после лечения при помощи однократной дозы ALN-GO1 у крыс.

Фиг. 24 представляет собой два графика, на которых показаны уровни оксалатов и гликолата в моче в мышинной модели первичной гипероксалурии I типа после однократной дозы ALN-GO1.

Фиг. 25A представляет собой график, на котором показаны уровни мРНК HAO1 в крысиной модели первичной гипероксалурии I типа после однократной дозы ALN-GO1.

Фиг. 25B представляет собой график, на котором показаны уровни оксалатов в моче в крысиной модели первичной гипероксалурии I типа после однократной дозы ALN-GO1.

Фиг. 26 представляет собой два графика, на которых показаны уровни мРНК HAO1 и оксалатов в моче в крысиной модели первичной гипероксалурии I типа после повторного введения дозы ALN-GO1.

Фиг. 27 представляет собой два графика, на которых показаны уровни мРНК HAO1 и гликолата в сыворотке крови после повторного введения дозы отличным от человека приматам.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение предусматривает композиции, содержащие средства для RNAi, например двухнитевые средства для RNAi, целенаправленно воздействующие на HAO1. Настоящее изобретение также предусматривает способы, в которых применяют композиции согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии HAO1 и для лечения ассоциированных с HAO1 нарушений.

I. Определения.

Для того чтобы настоящее изобретение можно было более легко понять, вначале даны определения некоторым терминам. Кроме того, следует отметить, что во всех случаях перечисления значения или диапазона значений параметра подразумевают, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

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

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

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

Используемый в данном документе "HAO1" относится к гену, кодирующему фермент оксидазу 1 гидроксикислот. Другие названия гена включают в себя GO, GOX, GOX1 и HAOX1. Белок также известен как гликолат-оксидаза и оксидаза (S)-2-гидроксикислот. Номером доступа в GenBank для мРНК HAO1 человека является NM_017545.2; мРНК HAO1 макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*) является XM_005568381.1; мРНК HAO1 мыши (*Mus musculus*) является NM_010403.2; мРНК HAO1 крысы (*Rattus norvegicus*) является XM_006235096.1.

Термин "HAO1", используемый в данном документе, также относится к встречающимся в природе вариантам последовательности ДНК гена HAO1, например единичному нуклеотидному полиморфизму (SNP) в гене HAO1. Иллюстративные SNP можно найти в dbSNP, базе данных коротких генетических вариаций, в NCBI, доступной на www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP.

Используемая в данном документе "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции гена HAO1, в том числе к мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции.

Используемый в данном документе термин "нить, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждое из "G", "C", "A" и "U", как правило, означает нуклеотид, который содержит соответственно гуанин, цитозин, аденин и урацил в качестве основания. "T" и "dT" используют в данном документе взаимозаменяемо, и они относятся к дезоксирибонуклеотиду, где нуклеиновым основанием является тимин, например дезоксириботимину, 2'-дезокситимидину или тимидину. Однако будет понятно, что термин "рибонуклеотид", или "нуклеотид", или "дезоксирибонуклеотид" также может относиться к модифицированному нуклеотиду, который подробнее описан ниже, или имитирующему нуклеотид заменяющему фрагменту. Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими фрагментами без значительного изменения свойств в отношении спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть замещены в нуклеотидных последовательностях согласно настоящему изобретению нуклеотидами, содержащими, например, инозин. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, являются вариантами осуществления настоящего изобретения.

Термины "iRNA", "средство для RNAi", "средство на основе iRNA", "средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к средству, которое содержит РНК в том значении, в котором этот термин определен в данном документе, и которое опосредует целенаправленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути с участием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). iRNA управляет специфичным в отношении последовательности разрушением мРНК посредством такого процесса, как РНК-интерференция (RNAi). iRNA модулирует, например ингибирует, экспрессию HAO1 в клетке, например в клетке в организме субъекта, как, например, субъекта-млекопитающего.

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению включает одонитевую РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК HAO1, управляя расщеплением целевой РНК. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, предполагают, что длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как Dicer (Sharp et al. (2001), Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001), Nature, 409:363). siRNA затем включаются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001), Cell, 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev. 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одонитевой РНК (siRNA), образованной внутри клетки, и которая способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т.е. гена HAO1. Соответственно, термин "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, описанной выше.

В другом варианте осуществления средство для RNAi может быть одонитевой siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одонитевые средства для RNAi связываются с Argonaute 2 комплекса RISC, обладающим эндонуклеазной активностью, который затем расщепляет целевую мРНК. Одонитевые siRNA, как правило, содержат 15-30 нуклеотидов и являются хи-

мически модифицированными. Конструирование и тестирование одонитевых siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima et al., (2012), Cell, 150:883-894, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно использовать в качестве одонитевой siRNA, которая описана в данном документе или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima et al., (2012), Cell, 150:883-894.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает молекулы одонитевого антисмыслового олигонуклеотида, целенаправленно воздействующего на HAO1. "Молекула одонитевого антисмыслового олигонуклеотида" является комплементарной последовательности в целевой мРНК (т.е. HAO1). Молекулы одонитевого антисмыслового олигонуклеотида могут ингибировать трансляцию стехиометрическим образом путем спаривания оснований с мРНК и физического нарушения механизма трансляции, см. Dias, N. et al., (2002), Mol. Cancer. Ther. 1:347-355. В качестве альтернативы молекулы одонитевого антисмыслового олигонуклеотида ингибируют целевую мРНК путем гибридизации с мишенью и расщепления мишени посредством явления расщепления с помощью RNaseH. Молекула одонитевого антисмыслового олигонуклеотида может иметь длину от приблизительно 10 до приблизительно 30 нуклеотидов и иметь последовательность, комплементарную целевой последовательности. Например, молекула одонитевого антисмыслового олигонуклеотида может содержать последовательность, которая включает в себя по меньшей мере приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе, например последовательностей, представленных в любой из табл. 1 или 2 или связывающихся с любым из целевых сайтов, описанных в данном документе. Молекулы одонитевого антисмыслового олигонуклеотида могут предусматривать модифицированную РНК, ДНК или их комбинацию.

В другом варианте осуществления "iRNA" для применения в композициях, путях применения и способах согласно настоящему изобретению является двухнитевой РНК, и в данном документе ее называют "двухнитевым средством для RNAi", "молекулой двухнитевой РНК (dsRNA)", "средством на основе dsRNA" или "dsRNA". Термин "dsRNA" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты с дуплексной структурой, содержащему две антипараллельные и практически комплементарные нити нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т.е. гену HAO1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения двухнитевая РНК (dsRNA) запускает разрушение целевой РНК, например мРНК, через посттранскрипционный механизм сайленсинга генов, называемый в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

Как правило, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как подробно описано в данном документе, каждая нить или обе нити могут также содержать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, используемое в данном описании "средство для RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство для RNAi может включать значительные модификации множества нуклеотидов. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в уровне техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле типа siRNA, охвачены термином "средство для RNAi" в контексте данного описания и формулы изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной большей молекулы РНК или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, если две нити являются частью одной большей молекулы и, следовательно, соединены непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити к 5'-концу соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительную цепь РНК называют "петлей шпилькой". В тех случаях, если две нити соединены ковалентно иным образом, нежели непрерывающейся цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити к 5'-концу соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединительную структуру называют "линкером". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований является количеством нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом любых выступов, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры средство для RNAi может предусматривать один или несколько нуклеотидных выступов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например с целевой последовательностью мРНК HAO1, управляя расщеплением целевой РНК. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, длинная двухнитевая РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как Dicer (Sharp et al. (2001), Genes Dev. 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, обеспечивает процессинг dsRNA до коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-выступами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001), Nature, 409:363). siRNA затем включаются в РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной ан-

тисмысловой нити управлять распознаванием мишени (Nykanen, et al., (2001), Cell, 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al., (2001), Genes Dev. 15:188).

Используемый в данном документе "нуклеотидный выступ" относится к неспаренным нуклеотиду или нуклеотидам, которые выпячиваются из дуплексной структуры средства для RNAi, когда 3'-конец одной нити средства для RNAi выходит за пределы 5'-конца другой нити или *vice versa*. "Затупленный конец" или "тупой конец" означает, что на конце двухнитевого средства для RNAi нет неспаренных нуклеотидов, т.е. нет нуклеотидного выступа. Средство для RNAi "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухнитевой по всей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступа на любом конце молекулы. Средства для RNAi согласно настоящему изобретению включают в себя средства для RNAi с нуклеотидным выступом на одном конце (т.е. средства с одним выступом и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступами на обоих концах.

Термин "антисмысловая нить" относится к нити двухнитевого средства для RNAi, включающего участок, который, по сути, комплементарен целевой последовательности (например, мРНК HAO1 человека). Используемый в данном документе термин "участок, комплементарный части мРНК, кодирующей HAO1" относится к участку антисмысловой нити, который, по сути, комплементарен части последовательности мРНК HAO1. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, тогда ошибочные спаривания наиболее допустимы в концевых участках и, если присутствуют, как правило, встречаются в концевом участке или концевых участках, например в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'-конца и/или 3'-конца.

Термин "смысловая нить", используемый в данном документе, относится к нити dsRNA, которая включает участок, который, по сути, комплементарен участку антисмысловой нити.

Используемый в данном документе термин "участок расщепления" относится к участку, который непосредственно прилегает к сайту расщепления. Сайт расщепления является сайтом мишени, по которому происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит три основания на любом из концов сайта расщепления, который непосредственно прилегает к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит два основания на любом из концов сайта расщепления, который непосредственно прилегает к нему. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления, в частности, находится в сайте, граничащем с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, и участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Используемый в данном документе термин "комплементарный", если не указано иное, при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут представлять собой жесткие условия, где жесткие условия могут включать 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 ч с последующим отмыванием. Можно применять другие условия, такие как физиологически соответствующие условия, характерные для организма. Например, комплементарная последовательность является удовлетворительной для обеспечения выполнения соответствующей функции нуклеиновой кислоты, например RNAi. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Последовательности могут быть "полностью комплементарными" по отношению к любой, когда присутствует спаривание оснований нуклеотидов первой нуклеотидной последовательности с нуклеотидами второй нуклеотидной последовательности по всей длине первой и второй нуклеотидных последовательностей. Однако когда первую последовательность в данном документе обозначают как "по сути, комплементарную" по отношению ко второй последовательности, тогда две последовательности могут быть полностью комплементарными или в них может иметь место ошибочное спаривание одной или нескольких, но, как правило, не более 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации, с сохранением при этом способности гибридизоваться при условиях, наиболее соответствующих их конечному применению. Однако если два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько однонитевых выступов, то такие выступления не будут считаться ошибочными спариваниями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид из 21 нуклеотида в длину и другой олигонуклеотид из 23 нуклеотидов в длину, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может быть указана как "полностью комплементарная" для целей, описанных в данном документе.

"Комплементарные" последовательности, используемые в данном документе, могут также включать или могут быть образованы полностью из пар оснований, образованных не по модели Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из не встречающихся в природе и модифицированных нуклеотидов, в такой степени, при которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности

гибридизоваться. Такие пары оснований, образованные не по модели Уотсона-Крика, включают без ограничения неоднозначное или хугстиновское спаривание оснований G:U.

Термины "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по сути, комплементарный" в данном документе можно использовать по отношению к совпадению оснований между смысловой нитью и антисмысловой нитью dsRNA или между антисмысловой нитью dsRNA и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их использования.

Используемый в данном документе полинуклеотид, который "по сути, комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который, по сути, комплементарен непрерывной части мРНК, представляющей интерес, (например, мРНК, кодирующей HAO1), в том числе 5'-UTR, открытой рамке считывания (ORF) или 3'-UTR. Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК HAO1, если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей HAO1.

Термин "ингибирование", используемый в данном документе, используют взаимозаменяемо со "снижением", "сайленсингом", "подавлением", "супрессией" и другими подобными терминами, и он включает любой уровень ингибирования.

Фраза "ингибирование экспрессии HAO1", используемая в данном документе, включает ингибирование экспрессии любого гена HAO1 (такого как, например, ген HAO1 мыши, ген HAO1 крысы, ген HAO1 обезьяны или ген HAO1 человека), а также вариантов (например, встречающихся в природе вариантов) или мутантов гена HAO1. Таким образом, ген HAO1 может быть геном HAO1 дикого типа, мутантным геном HAO1 или трансгенным геном HAO1 в контексте клетки, группы клеток или организма, подвергнутого генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена HAO1" предусматривает любой уровень ингибирования гена HAO1, например по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена HAO1, такую как ингибирование по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере приблизительно на 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%.

Экспрессию гена HAO1 можно оценивать, исходя из уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена HAO1, например уровня мРНК HAO1 или уровня белка HAO1, например, в тканях и/или уровнях оксалатов в моче. Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в данной области, например исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный у сходных субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

Фраза "приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi", используемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi предусматривает приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vitro* или приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, средство для RNAi можно приводить в физический контакт с клеткой путем отдельного осуществления способа или, в качестве альтернативы, средство для RNAi можно поместить в обстановку, которая позволит средству прийти в контакт с клеткой или послужит причиной этому.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно выполнять, например, путем инкубирования клетки со средством для RNAi. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно выполнять, например, путем введения инъекцией средства для RNAi в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней или путем введения инъекцией средства для RNAi в другую область, кровотока или подкожное пространство так, что средство будет впоследствии достигать ткани, в которой находится клетка, которую необходимо привести в контакт со средством. Например, средство для RNAi может содержать лиганд, например лиганд, представляющий собой GalNAc3, который направляет средство для RNAi к месту, представляющему интерес, например к печени, и/или может быть связано с ним. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. По отношению к способам согласно настоящему изобретению клетку также

можно приводить в контакт со средством для RNAi *in vitro* и в дальнейшем пересаживать субъекту.

Используемый в данном документе термин "субъект" включает человека или отличного от человека животного, предпочтительно позвоночного и более предпочтительно млекопитающего. Субъект может включать трансгенный организм. Наиболее предпочтительно субъектом является человек, как, например, человек, страдающий ассоциированным с HAO1 нарушением или предрасположенный к его развитию.

Термин "пациент" или "субъект", используемый в данном документе, подразумевает как включающее либо человека, либо отличного от человека животного, предпочтительно млекопитающего, например человека или обезьяну. Наиболее предпочтительно субъектом или пациентом является человек.

Термин "ассоциированное с HAO1 нарушение", используемый в данном документе, предназначен включать любое нарушение, которое можно лечить или предупреждать, или симптомы которого можно облегчать, при помощи ингибирования экспрессии HAO1. Примеры включают в себя без ограничения первичную гипероксалурию 1 (PH1).

"Терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого, при введении пациенту для лечения ассоциированного с HAO1 заболевания, достаточно для эффективного лечения заболевания (например, путем уменьшения, ослабления или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его тяжести и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией HAO1, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого, при введении субъекту, у которого еще не возникли или не проявились симптомы HAO1-ассоциированного заболевания, но у которого может иметься предрасположенность к заболеванию, достаточно для предупреждения или ослабления заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Ослабление заболевания включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позже. "Профилактически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество средства для RNAi, которое вызывает некоторый желательный локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства для RNAi, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для получения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

Термин "образец", используемый в данном документе, предусматривает совокупность сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т. п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы можно получить из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления "образец, полученный из организма субъекта" относится к крови или плазме крови, взятым из организма субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный из организма субъекта" относится к ткани печени (или ее составляющим), полученным из организма субъекта.

II. Средства на основе iRNA, представляющие собой dsRNA, согласно настоящему изобретению.

В данном документе описаны двухнитевые средства для RNAi, которые ингибируют экспрессию гена HAO1 в клетке, такой как клетка в организме субъекта, например млекопитающего, как, например, человека с ассоциированным с HAO1 нарушением, и применения таких двухнитевых средств для RNAi.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает двухнитевые средства для RNAi с химическими модификациями, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т.е. гена HAO1) *in vivo*.

Как описано более подробно ниже, в определенных аспектах настоящего изобретения практически все нуклеотиды iRNA согласно настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды в iRNA согласно настоящему изобретению являются модифицированными. iRNA согласно настоящему изобретению, в которых "практически все нуклеотиды являются модифицированными", являются в значительной степени, но не полностью модифицированными и могут содержать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Каждая нить средства для RNAi в длину может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, каждая нить может составлять 14-30 нуклеотидов в длину, 17-30 нуклеотидов в длину, 19-30 нуклеотидов в длину, 25-30 нуклеотидов в длину, 27-30 нуклеотидов в длину, 17-23 нуклеотида в длину, 17-21 нуклеотид в длину, 17-19 нуклеотидов в длину, 19-25 нуклеотидов в длину, 19-23 нуклеотида в длину, 19-21 нуклеотид в длину, 21-25 нуклеотидов в длину или 21-23 нуклеотида в длину.

Каждая нить может составлять 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в длину. Каждая нить средства для RNAi может иметь такую же длину или может иметь другую длину.

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или блокирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих нитей. Выступ может составлять 1-6 нуклеотидов в длину, например 2-6 нуклеотидов в длину, 1-5 нуклеотидов в длину, 2-5 нуклеотидов в длину, 1-4 нуклеотида в длину, 2-4 нуклеотида в длину, 1-3 нуклеотида в длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. Выступы могут быть обусловлены тем, что одна нить длиннее другой, или могут быть обусловлены тем, что две нити одинаковой длины расположены со сдвигом. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других не содержащих основания линкеров.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке средства для RNAi независимо может быть модифицированным или немодифицированным нуклеотидом, в том числе без ограничения с сахаром с 2'-модификацией, такой как 2'-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2"-О-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-О-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Сео) и любые их комбинации. Например, последовательность выступа на обоих концах каждой нити может быть ТТ. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с целевой мРНК или он может быть комплементарным целевым последовательностям генов или может иметь другую последовательность.

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

Средство для RNAi может предусматривать только один выступ, который может повышать интерферирующую активность RNAi без воздействия на его общую стабильность. Например, одонитевой выступ может быть расположен на 3'-конце смысловой нити или в качестве альтернативы на 3'-конце антисмысловой нити. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или vice versa. Как правило, антисмысловая нить RNAi имеет нуклеотидный выступ на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и 3'-концевой выступ антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в процесс с участием RISC.

Синтез и модификации.

Любая из нуклеиновых кислот, например RNAi, описанных в настоящем изобретении, может быть синтезирована и/или модифицирована способами, хорошо известными из уровня техники, такими как описанные в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который настоящим включен в данный документ при помощи ссылки. Модификации включают в себя, например, концевые модификации, например модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгирование, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгирование, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.д.); модификации оснований, например замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пару оснований с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (лишенные азотистого основания нуклеотиды) или конъюгирование оснований; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара и/или модификации остова, в том числе модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений iRNA, применимых в описанных в данном до-

кументе вариантах осуществления, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или неприродные межнуклеозидные связи. РНК с модифицированными остовами включают, среди прочего, такие, которые не содержат атом фосфора в остове. В контексте данного описания и как иногда упоминается в данной области, модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в их межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная iRNA будет содержать атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоксилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, в том числе 3'-алкиленфосфонаты, и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, в том числе 3'-аминофосфорамидат и аминоксилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, их аналоги с 2'-5'-связями, а также таковые с инвертированной полярностью, где соседние пары нуклеозидных звеньев соединены 3'-5' к 5'-3' или 2'-5' к 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают без ограничения патенты США № 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6 239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029 и патент США № RE39464, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора в своем составе, включают остовы, образованные короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы с морфолиновыми связями (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленаформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкеносодержащие остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленигидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смесь составляющих частей N, O, S и CH₂.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения вышеуказанных олигонуклеозидов, включают без ограничения патенты США № 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

В других вариантах осуществления рассматриваются подходящие миметики РНК для применения в iRNA, в которых как сахар, так и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных звеньев, заменены новыми группами. Единицы оснований сохраняются для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, который, как было показано, обладает превосходными свойствами гибридизации, называется пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменен амидсодержащим остовом, в частности аминоэтилглициновым остовом. Нуклеотидные основания сохраняются и соединяются непосредственно или опосредованно с атомами азота азатрупа амидной части остова.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения соединений PNA, включают без ограничения патенты США № 5539082; 5714331 и 5719262, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в iRNA согласно настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, представленные в настоящем изобретении, предусматривают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами и, в частности, -CH₂-NH-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [известный как метилен (метиляминовый) или MMI остов], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- и -N(CH₃)-CH₂-CH₂-, [где нативный фосфодифирный остов представлен как -O-P-O-CH₂-] согласно вышеупомянутому патенту США № 5489677 и амидные остовы согласно вышеупомянутому патенту США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, представленные в данном документе, имеют морфолиновые структуры остова согласно вышеупомянутому патенту США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных сахарных фрагментов. iRNA, например dsRNA, представленные в данном документе, могут содержать одно из следующего в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкила; O-, S- или N-алкенила; O-, S- или N-алкинила или O-алкил-O-алкила, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными

C₁-C₁₀-алкилом или C₂-C₁₀-алкенилом и алкинилом. Иллюстративные пригодные модификации включают O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m равняются от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA содержат одно из следующего в 2'-положении: низшего C₁-C₁₀-алкила, замещенного низшего алкила, алкарила, аралкила, О-алкарила или О-аралкила, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкила, гетероциклоалкарила, аминокламино, полиалкиламино, замещенного силила, расщепляющей РНК группы, репортерной группы, интеркалятора, группы для улучшения фармакокинетических свойств iRNA или группы для улучшения фармакодинамических свойств iRNA и других заместителей с аналогичными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) т.е. алкокси-алкоксигруппу. Другой иллюстративной модификацией является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная в уровне техники как 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации также могут быть осуществлены в других положениях в РНК iRNA, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в dsRNA с 2'-5'-связями и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. iRNA также могут содержать миметики сахаров, такие как циклобутиловые фрагменты, вместо пентофуранозильного сахара. Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения таких модифицированных сахарных структур, включают без ограничения патенты США № 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633 и 5700920, некоторые из которых имеют общего заявителя с настоящей заявкой. Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

iRNA также может содержать модификации или замещения нуклеотидного основания (часто называемого в данной области просто как "основание"). Используемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" нуклеотидные основания включают пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U). Модифицированные нуклеотидные основания включают в себя другие синтетические и природные нуклеотидные основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкил-производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, цитозин и тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин, а также 3-деазагуанин и 3-деазааденин.

Дополнительные нуклеотидные основания включают раскрытые в патенте США № 3687808, таковые, раскрытые в *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; таковые, раскрытые в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, pages 858-859, Kroschwitz, J.L., ed. John Wiley & Sons, 1990, таковые, раскрытые в Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, и таковые, раскрытые в Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S.T. и Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих нуклеотидных оснований особенно пригодны для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, представленных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и -О6 замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что 5-метилцитозиновые замещения повышают стабильность дуплекса нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. и Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, p. 276-278) и представляют собой иллюстративные замещения оснований, еще более конкретно в сочетании с 2'-О-метоксиэтиловыми модификациями сахаров.

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения некоторых из вышеуказанных модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают без ограничения вышеуказанные патенты США № 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121; 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672 и 7495088, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

РНК iRNA также может быть модифицирована таким образом, что включает одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запертая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированный рибозный фрагмент, где рибозный фрагмент содержит дополнительный

мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Эта структура эффективно "запирает" рибозу в структурной конформации 3'-эндо. Было показано, что добавление запертых нуклеиновых кислот в siRNA повышает стабильность siRNA в сыворотке крови и снижает нецелевые эффекты (Elmen, J. et al., (2005), *Nucleic Acids Research*, 33(1):439-447; Mook, O.R. et al., (2007), *Mol. Canc. Ther.* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003), *Nucleic Acids Research*, 31(12):3185-3193).

Иллюстративные патенты США, в которых изложена идея получения нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот, включают в себя без ограничения следующие патенты США № 6268490; 6670461; 6794499; 6998484; 7053207; 7084125 и 7399845, полное содержание каждого из которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

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

Модифицированные iRNA, содержащие мотивы согласно настоящему изобретению.

В определенных аспектах настоящего изобретения двухнитевые средства для RNAi согласно настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, которые раскрыты, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., или в РСТ/US2012/065691, поданной 16 ноября 2012 г. и опубликованной как WO 2013/075035 A1, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

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

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевого средства для RNAi модифицированы так, что содержат один или несколько мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления по меньшей мере одной нити средства для RNAi или рядом с ним, тогда активность средства для RNAi в отношении сайленсинга генов была наилучшим образом повышена.

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

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

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

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

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

ные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, является модифицированным нуклеотидом. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 3'-фтором, например в чередующемся мотиве. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно, GalNAc₃).

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

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi содержит по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить средства для RNAi может также содержать по меньшей мере один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити или рядом с ним.

Для средства для RNAi с дуплексным участком, составляющим 17-23 нуклеотида в длину, сайт расщепления антисмысловой нити находится обычно около положений 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы с тремя одинаковыми модификациями могут находиться в положениях 9, 10, 11; положениях 10, 11, 12; положениях 11, 12, 13; положениях 12, 13, 14 или положениях 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити, или отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка RNAi от 5'-конца.

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

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут представлять собой фланкирующую модификацию. Термин "фланкирующая модификация" в данном документе относится к мотиву, находящемуся в другой части нити, который отделен от мотива в сайте расщепления той же нити или рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, тогда химическая структура мотивов отличается друг от друга, а когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, тогда химические структуры могут быть одинаковыми или разными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, если присутствуют две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может встречаться на одном конце относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления или рядом с ним, или с обеих сторон основного мотива.

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

В одном варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi обычно не включает первый один или первые два концевых нуклеотида на

3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

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

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

В тех случаях, если каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, то смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выравнены так, что две модификации, каждая от одной нити, попадают на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, попадают на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной нити попадают по обе стороны от ведущего мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицированным одинаковыми или разными модификациями, которые могут включать одно или несколько изменений одного или обоих несвязанных с фосфатом атомов кислорода и/или одного или нескольких связанных с фосфатом атомов кислорода; изменение компонента рибозного сахара, например 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полную замену фосфатного фрагмента "дефосфоризованными" линкерами; модификацию или замену встречающегося в природе основания и замену или модификацию рибозофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие модификации встречаются в положении, которое повторяется в пределах нуклеиновой кислоты, например модификация основания, или фосфатного фрагмента, или не образующего связь атома О фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера модификация может встречаться только в 3'- или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевом участке, например в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может встречаться в двухнитевом участке, в одонитевом участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухнитевом участке РНК или может встречаться только в одонитевом участке РНК. Например, фосфотиоатная модификация в положении не образующего связь атома О может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевом участке, например в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити или может встречаться в двухнитевом и одонитевом участках, в частности на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Это создает возможность, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступы, или для включения модифицированных нуклеотидов или имитаторов нуклеотидов, в одонитевые выступы, например в 5'- или 3'-выступ или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступе могут быть модифицированы, например, с помощью модификации, описанной в данном документе. Модификации могут предусматривать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара с помощью модификаций, известных из уровня техники, например применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор-(2'-F)- или 2'-О-метил-модификаций вместо рибозного сахара нуклеинового основания, а также модификаций фосфатной группы, например фосфотиоатных модификаций. Выступы необязательно должны быть гомологичными целевой последовательности.

В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксид, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Нити могут содержать более одной модификации. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован с помощью 2'-О-метила или 2'-фтора.

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

В одном варианте осуществления N_a и/или N_b имеет модификации чередующегося паттерна. Термин "чередующийся мотив", используемый в данном документе, относится к мотиву с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Чередующийся нуклеотид может относиться к каждому второму нуклеотиду или к каждому третьему нуклеотиду или аналогичному паттерну. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "АВАВАВАВАВ...", "АВВАВВАВВ...", "ААВААВААВ...", "ААВААВАААВ...", "ААВВВААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВ..." и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или разным. Например, если каждый из A, B, C, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловой нити или антисмысловой нити может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как, например, "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." или "CDCDCD..." и т.д.

В одном варианте осуществления средство для RNAi по настоящему изобретению содержит паттерн модификаций для чередующегося мотива смысловой нити, сдвинутый относительно паттерна модификации для чередующегося мотива антисмысловой нити. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой нити соответствует модифицированной другим способом группе нуклеотидов антисмысловой нити и *vice versa*. Например, при спаривании смысловой нити с антисмысловой нитью в дуплексе dsRNA чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "ABABAB" от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "BABABA" от 5'- к 3'-концу нити в дуплексном участке. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловой нити может начинаться с "AABBAABB" в направлении от 5'- к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловой нити может начинаться с "BBAABBA" в направлении от 5'- к 3'-концу нити в пределах дуплексного участка, так что между смысловой нитью и антисмысловой нитью имеется полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

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

Введение одного или нескольких мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить нарушает первоначальный паттерн модификаций, присутствующий в смысловой нити и/или антисмысловой нити. Такое нарушение паттерна модификаций смысловой и/или антисмысловой нити путем введения одного или нескольких мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов в смысловую и/или антисмысловую нить неожиданно повышает активность сайленсинга генов в отношении целевого гена.

В одном варианте осуществления в тех случаях, если мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N_aYYYN_b...", где "Y" представляет собой модификацию мотива с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, а "N_a" и "N_b" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего за мотивом "YYY", которая отличается от модификации Y, и где N_a и N_b могут быть одинаковыми или разными модификациями. В качестве альтернативы N_a и/или N_b могут присутствовать или отсутствовать в случае, если присутствует фланкирующая модификация.

Средство для RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловой нити или антисмысловой нити или обеих нитей в любом положении нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида смысловой нити и/или антисмысловой нити; при этом каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в чередующемся паттерне в смысловой нити и/или антисмысловой нити; или смысловая нить или антисмысловая нить могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может быть таким же, как у антисмысловой нити, или отличным от него, и чередующийся паттерн модификаций межнуклеотидной связи в смысловой нити может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификаций межнуклеотидной связи в антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления RNAi содержит модификацию фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексном участке. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за выступающим нуклеотидом. Например, между тремя концевыми нуклеотидами могут присутствовать по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов представляют собой выступающие нуклеотиды, а третий явля-

ется спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. Эти три концевые нуклеотида могут быть на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити и/или 5'-конце антисмысловой нити.

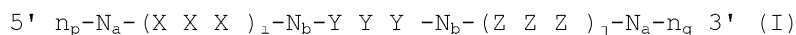
В одном варианте осуществления выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити и между тремя концевыми нуклеотидами присутствуют две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. Необязательно, средство для RNAi может дополнительно иметь две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит ошибочное(ые) спаривание(ия) с мишенью, в дуплексе или их комбинации. Ошибочное спаривание может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать на основании их способности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, при этом наиболее простым подходом является изучение пар по отдельности для каждой пары оснований, однако также можно применять анализ ближайшего соседа или подобный). С точки зрения содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I = инозин). Ошибочные спаривания, например неканонические или отличные от канонических типы спаривания (описанные в других местах данного документа), предпочтительнее канонических типов спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических типов спаривания.

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

В одном варианте осуществления нуклеотид в положении 1 в пределах дуплексного участка, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в пределах дуплексного участка, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в пределах дуплексного участка, в направлении от 5'-конца антисмысловой нити, представляет собой пару оснований AU.

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



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

каждый из p и q независимо равняется 0-6;

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

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где N_b и Y имеют неодинаковую модификацию;

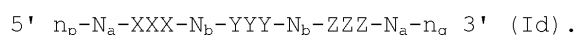
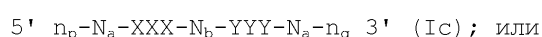
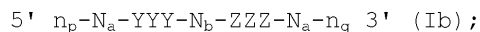
каждый из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов.

Предпочтительно в YYY все нуклеотиды 2'-F-модифицированы.

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

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок из 17-23 нуклеотидов в длину, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или около него (например, может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) в смысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца.

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



В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ib), тогда N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нук-

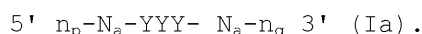
леотидов. Каждый N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

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

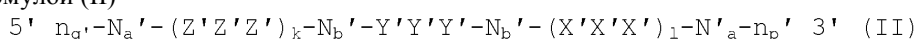
Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

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



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

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



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

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

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

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

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

где N_b' и Y' имеют неодинаковую модификацию;

каждый из $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов.

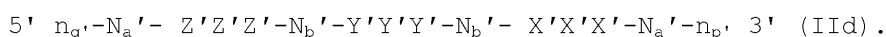
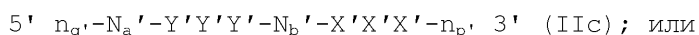
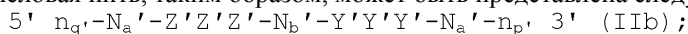
В одном варианте осуществления N_a' и/или N_b' содержит модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

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

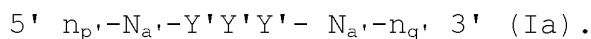


В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb), тогда N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую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

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

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

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



В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIa), тогда каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

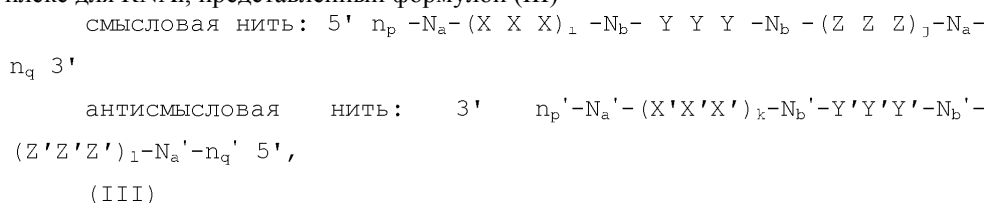
Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо может быть модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Каждый X , Y , Z , X' , Y' и Z' , в частности, может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

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

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

Смысловая нить, представленная любой из вышеприведенных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой нитью, представленной любой из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId) соответственно.

Соответственно, средства для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению могут содержать смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит 14-30 нуклеотидов, дуплекс для RNAi, представленный формулой (III)



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

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

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

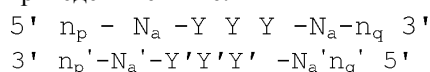
каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

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

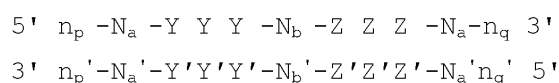
каждый из XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой один мотив с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов.

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

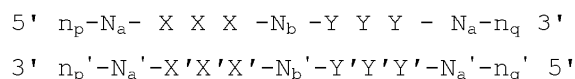
Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс RNAi, включают формулы, приведенные ниже:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), тогда каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb), тогда каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIc), тогда каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIId), тогда каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулами (III), (III_a), (III_b), (III_c) и (III_d), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

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

В различных публикациях описаны мультимерные средства для RNAi, которые можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, патент США № 7858769, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, полное содержание которых настоящим включено в данный документ при помощи ссылки.

Средство для RNAi, содержащее один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со средством для RNAi, может улучшать одно или несколько свойств средства для RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет присоединен к модифицированной субъединице средства для RNAi. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства на основе dsRNA можно заменять другими фрагментами, например отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был заменен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией путем замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может быть карбоциклической кольцевой системой, т.е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т.е. один или несколько атомов в кольце могут быть гетероатомами, например азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой системой или может содержать два или более колец, например конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную кольцевую систему, или он может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду посредством носителя. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову", и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". "Точка присоединения к остову", используемая в данном документе, относится к функциональной группе, например гидроксильной группе, или, как правило, связи, доступной для введения носителя в остов, например фосфатный или модифицированный фосфатный, например серосодержащий, остов, и которая подходит для этого, рибонуклеиновой кислоты. "Связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в кольцо атому циклического носителя, например атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть, например, углеводом, например моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно, выбранный фрагмент присоединен посредством промежуточного связывающего фрагмента к циклическому носителю. Таким образом, циклический носитель будет часто включать функциональную группу, например

аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, подходящую для введения или связывания другого химического структурного элемента, например лиганда, в состав кольца.

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

В определенных конкретных вариантах осуществления средство для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, приведенных в любой из табл. 1 и 2. В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство представляет собой средство, приведенное в табл. 1, тогда у средства может отсутствовать концевой dT.

Настоящее изобретение дополнительно включает двухнитевые средства для RNAi, содержащие любую из последовательностей, приведенных в любой из табл. 1 или 2, которые содержат 5'-фосфат или миметик фосфата в антисмысловой нити (см., например, публикацию согласно PCT № WO 2011005860). Дополнительно, настоящее изобретение включает двухнитевые средства для RNAi, содержащие любую из последовательностей, приведенных в одной из табл. 1 или 2, которые включают 2'-фтор-группу вместо 2'-ОМе-группы на 5'-конце смысловой нити.

Дополнительные мотивы.

В определенных аспектах двухнитевые средства для RNAi, описанные в данном документе, содержат смысловую нить и антисмысловую нить, при этом указанные смысловая нить и антисмысловая нить содержат меньше одиннадцати, десяти, девяти, восьми, семи, шести или пяти 2'-дезоксифтор-модификаций.

В определенных аспектах двухнитевые средства для RNAi, описанные в данном документе, содержат смысловую нить и антисмысловую нить, при этом указанные смысловая нить и антисмысловая нить содержат меньше десяти, девяти, восьми, семи, шести, пяти, четырех фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

В определенных аспектах двухнитевые средства для RNAi, описанные в данном документе, содержат смысловую нить и антисмысловую нить, при этом указанные смысловая нить и антисмысловая нить содержат меньше десяти 2'-дезоксифтор-модификаций и меньше шести фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

В определенных аспектах двухнитевые средства для RNAi, описанные в данном документе, содержат смысловую нить и антисмысловую нить, при этом указанные смысловая нить и антисмысловая нить содержат меньше восьми 2'-дезоксифтор-модификаций и меньше шести фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

В определенных аспектах двухнитевые средства для RNAi, описанные в данном документе, содержат смысловую нить и антисмысловую нить, при этом указанные смысловая нить и антисмысловая нить содержат меньше девяти 2'-дезоксифтор-модификаций и меньше шести фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

Лиганды.

Двухнитевые средства для RNAi согласно настоящему изобретению необязательно могут быть конъюгированы с одним или несколькими лигандами. Лиганд может быть присоединен к смысловой нити, антисмысловой нити или к обоим нитям на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах. К примеру, лиганд может быть конъюгирован со смысловой нитью. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити. В одном варианте осуществления лигандом является лиганд GalNAc. Особенно в некоторых вариантах осуществления лигандом является GalNAc₃. Лиганды соединены, предпочтительно ковалентно, либо непосредственно, либо опосредованно через промежуточный связывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления лиганд меняет распределение, нацеливание или время жизни молекулы, в которую он введен. В некоторых вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, рецептора, например компартмента клетки или органа, ткани, органа или участка тела, например, по сравнению с молекулой, у которой отсутствует такой лиганд. Лиганды, обеспечивающие повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, также называют нацеливающими лигандами.

Некоторые лиганды могут обладать эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой полианионный пептид или пептидомиметик, который проявляет pH-зависимую мембранную активность и фузогенность. В одном варианте осуществления эндосомолитический лиганд принимает свою активную конформацию при значении pH эндосомы. "Активной" конформацией является такая конфор-

мация, при которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26:2964-2972), пептид EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118:1581-1586) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559:56-68). В одном варианте осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая будет претерпевать изменения в заряде или протонировании в ответ на изменения pH. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

Лиганды могут улучшать транспортировку, гибридизацию и свойства специфичности и могут также улучшать устойчивость к нуклеазам у полученного естественного или модифицированного олигорибонуклеотида или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию мономеров, описанных в данном документе, и/или естественных или модифицированных рибонуклеотидов.

Лиганды, как правило, могут включать терапевтические модификаторы, например, для повышения поглощения; диагностические соединения или "репортерные" группы, например, для отслеживания распределения; перекрестно сшивающие средства и придающие устойчивость к нуклеазам фрагменты. Общие примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и миметики пептидов.

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

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например нацеливающее на клетку или ткань средство, например лектин, гликопротеин, липид или белок, например антитело, которое связывается с определенным типом клеток, например клеткой почки. Нацеливающей группой могут быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный белок А, углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, биотин, RGD-пептид, миметик RGD-пептида или аптамер.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафрин, сапфрин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелатор (например, EDTA), липофильные молекулы, например холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О-(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецил-глицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)лихолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холевую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминок, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), помощники транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс Eu³⁺ тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лигандами могут быть белки, например гликопротеины, или пептиды, например молекулы со специфической аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать отличные от пептидов виды молекул, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу или аптамеры. Например, лигандом может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лигандом может быть вещество, например лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение средства на основе iRNA клеткой, например, путем разрушения цитоскелета клетки, например путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством, например, может быть таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокадазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

Лиганд может увеличивать поглощение олигонуклеотида клеткой, например, путем активации воспалительной реакции. Иллюстративные лиганды, которые будут обладать таким эффектом, включают фактор некроза опухолей альфа (TNF-альфа), интерлейкин-1-бета или гамма интерферон.

В одном аспекте лиганд представляет собой липидную молекулу или молекулу на основе липида. Такая липидная молекула или молекула на основе липида предпочтительно связываются с сывороточным белком, например сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд обеспечивает распределение конъюгата в целевой ткани, например отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связывать HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липидный лиганд или лиганд на основе липида может (a) повышать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) повышать нацеливающую способность или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (c) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком, например HSA.

Лиганд на основе липида можно применять для модулирования, например регулирования связывания конъюгата с целевой тканью. Например, липидный лиганд или лиганд на основе липида, который связывается с HSA более сильно, с меньшей вероятностью будет нацеливаться на почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липидный лиганд или лиганд на основе липида, который связывается с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

В одном варианте осуществления лиганд на основе липида связывает HSA. Предпочтительно он связывает HSA с аффинностью, достаточной для того, чтобы конъюгат предпочтительно распределялся в ткань, отличную от ткани почек. В одном варианте осуществления аффинность является такой, что связывание HSA-лиганд может быть обратимым. В другом варианте осуществления лиганд на основе липида слабо связывает HSA или не связывает вообще, так что конъюгат будет предпочтительно распределяться в почку. Другие фрагменты, которые нацеливаются на клетки почки, также можно использовать вместо или в дополнение к лиганду на основе липида.

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

В другом аспекте лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно спиральное средство, обеспечивающее проникновение в клетку. Предпочтительно средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennopodia. Если средство представляет собой пептид, то он может быть модифицированным, в том числе пептидил-миметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи, и также в нем могут использоваться D-аминокислоты. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно характеризуется липофильной и липофобной фазами.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик.

Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной сворачиваться в определенную трехмерную структуру, аналогичную естественному пептиду. Длина пептидного фрагмента или фрагмента-пептидомиметика может составлять приблизительно 5-50 аминокислот, например приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий преимущественно из Туг, Трр или Phe). Пептидным фрагментом может быть пептид-дендример, конформационно затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидный фрагмент может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 9). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 10)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Пептидный фрагмент может представлять собой доставляющий пептид, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, как было обнаружено, последователь-

ности Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ) (SEQ ID NO: 11) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK) (SEQ ID NO: 12) способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик может кодироваться случайной последовательностью ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Предпочтительно пептид или пептидомиметик, связанный со средством на основе iRNA, посредством введенной мономерной единицы, представляет собой нацеливающий на клетку пептид, такой как содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Пептидный фрагмент может варьироваться по длине от приблизительно 5 до приблизительно 40 аминокислот. Пептидные фрагменты могут иметь структурную модификацию, как, например, для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже. Фрагмент, представляющий собой RGD-пептид, можно применять для нацеливания на опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или опухолевая клетка рака молочной железы (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002). RGD-пептид может способствовать нацеливанию средства на основе iRNA на опухоли ряда других тканей, в том числе легкого, почки, селезенки или печени (Aoki et al., Cancer Gene Therapy, 8:783-787, 2001). Предпочтительно RGD-пептид будет способствовать нацеливанию средства на основе iRNA на почку. RGD-пептид может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например гликозилированным или метилированным, для способствования нацеливанию на конкретные ткани. Например, гликозилированный RGD-пептид может доставлять средство на основе iRNA к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001). Можно использовать пептиды, которые нацеливаются на маркеры, которыми обогащены пролиферирующие клетки. Например, содержащие RGD пептиды и пептидомиметики могут быть нацелены на раковые клетки, в частности клетки, на поверхности которых присутствует интегрин. Таким образом, можно применять RGD-пептиды, циклические пептиды, содержащие RGD, RGD-пептиды, которые включают D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацеливаются на лиганд интегрин. Как правило, такие лиганды можно использовать для контроля пролиферации клеток и ангиогенеза. Некоторые конъюгаты с таким типом лиганда нацелены на PECAM-1, VEGF или другой раковый ген, например раковый ген, описанный в данном документе.

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

В одном варианте осуществления нацеливающим пептидом может быть амфипатический α -спиральный пептид. Иллюстративные амфипатические α -спиральные пептиды включают без ограничений цекропины, ликотоксины, парадоксины, буфорин, CPF, бомбинин-подобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S. clava*, кишечные антимикробные пептиды миксины (HFAP), магаинины, бревинины-2, дермасапептины, меллитины, плевротоксины, пептиды H_2A , пептиды Хепорус, эскулентины-1 и церины. Предпочтительно целый ряд факторов будет рассматриваться в связи с поддержанием целостности и стабильности спирали. Например, будут использовать максимальное количество стабилизирующих спираль остатков (например, leu, ala или lys) и будут использовать минимальное количество дестабилизирующих спираль остатков (например, пролин или циклические мономерные единицы). Будет рассматриваться кэпирующий остаток (например, Gly, представляет собой иллюстративный N-кэпирующий остаток) и/или может использоваться C-концевое амидирование для обеспечения дополнительной Н-связи для стабилизации спирали. Стабильность может обеспечивать образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенными ± 3 или ± 4 положениями. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомоаргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками, глутаматом или аспаратом.

Лиганды, представляющие собой пептиды и пептидомиметики, включают те пептиды, которые имеют природное происхождение, или модифицированные пептиды, например D- или L- пептиды; α -, β - или γ -пептиды; пептиды с N-метилом; азапептиды; пептиды с одним или несколькими амидами, т.е. пептиды со связями, замененными одной или несколькими мочевиными, тиомочевинными, карбаматными или сульфонилмочевинными связями; или циклические пептиды.

Нацеливающим лигандом может быть любой лиганд, который способен нацеливаться на конкретный рецептор. Примерами являются: фолат, GalNAc, галактоза, манноза, манноза-6P, кластеры сахаров,

такие как кластер GalNAc, маннозный кластер, галактозный кластер, или аптамер. Кластер представляет собой комбинацию двух или более единиц сахара. Нацеливающие лиганды также включают лиганды рецептора-интегрина, лиганды хемокинового рецептора, трансферрин, биотин, лиганды серотонинового рецептора, PSMA, эндотелин, GCPII, соматостатин, лиганды LDL и HDL. Основу лигандов также может составлять нуклеиновая кислота, например в случае аптамера. Аптамер может быть немодифицированным или может иметь любую комбинацию модификаций, раскрытых в данном документе.

Эндосомальные высвобождающие средства включают имидазолы, поли- или олигоимидазолы, PEI, пептиды, фузогенные пептиды, поликарбоксилаты, полиакатионы, скрытые олиго- или поликатионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэфир, полимеры со скрытыми или не скрытыми катионными или анионными зарядами, дендримеры со скрытыми или не скрытыми катионными или анионными зарядами.

РК-модулятор означает модулятор фармакокинетических параметров. РК-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотиоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, таким образом короткие олигонуклеотиды, например олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотиоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов).

Кроме того, аптамеры, которые связывают сывороточные компоненты (например, сывороточные белки) также пригодны в настоящем изобретении в качестве РК-модулирующих лигандов.

Другие конъюгаты, представляющие собой лиганды, пригодные в настоящем изобретении, описаны в заявках на выдачу патентов США USSN: 10/916185, поданной 10 августа 2004 г.; USSN: 10/946873, поданной 21 сентября 2004 г.; USSN: 10/833934, поданной 3 августа 2007 г.; USSN: 11/115989, поданной 27 апреля 2005 г., и USSN: 11/944227, поданной 21 ноября 2007 г., которые включены посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

В тех случаях, когда присутствуют два или более лиганда, тогда все лиганды могут обладать одинаковыми свойствами, могут обладать различными свойствами или некоторые лиганды обладают одинаковыми свойствами, в то время как другие обладают различными свойствами. Например, лиганд может обладать нацеливающими свойствами, обладать эндосомолитической активностью или обладать РК-модулирующими свойствами. В одном варианте осуществления все лиганды обладают различными свойствами.

Лиганды могут быть присоединены к олигонуклеотидам в разных местах, например на 3'-конце, 5'-конце и/или во внутреннем положении. В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к олигонуклеотидам через промежуточный связывающий фрагмент, например, носитель, описанный в данном документе. Лиганд или связанный лиганд могут присутствовать на мономере в тех случаях, когда мономер введен в растущую нить. В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть введен посредством связывания с мономером-"предшественником" после того, как мономер-"предшественник" был введен в растущую нить. Например, мономер, содержащий, например, связывающий фрагмент с аминокислотной группой на конце (т.е. без ассоциированного лиганда), например TAP-(CH₂)_nNH₂, может быть введен в растущую нить олигонуклеотидов. На следующей стадии, т.е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с электрофильной группой, например группой сложного пентафторфенилэфира или альдегидной группой, затем можно присоединить к мономеру-предшественнику путем связывания электрофильной группы лиганда с концевой нуклеофильной группой связывающего фрагмента мономера-предшественника.

В другом примере может быть введен мономер с химической группой, пригодной для участия в реакциях клик-химии, например связывающий фрагмент/линкер с азидом или алкином на конце. На последующей стадии, т.е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с комплементарной химической группой, например алкин или азид, может быть присоединен к мономеру-предшественнику путем связывания алкина и азидов вместе.

В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеиновыми основаниями, сахарными фрагментами или межнуклеозидными связями в молекулах нуклеиновой кислоты. Конъюгация с пуриновыми нуклеиновыми основаниями или их производными может происходить в любом положении, в том числе по атомам внутри кольца и вне кольца. В некоторых вариантах осуществления к 2-, 6-, 7- или 8-положениям пуринового нуклеинового основания присоединен конъюгатный фрагмент. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания могут быть замещены конъюгатным фрагментом. Конъюгация с сахарными фрагментами нуклеозидов может происходить при любом атоме углерода. Примеры атомов углерода в сахарном фрагменте, к которым может быть присоединен конъюгатный фрагмент, включают

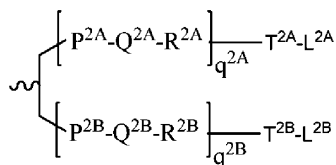
2', 3' и 5' атомы углерода. К положению 1' также может быть присоединен конъюгатный фрагмент, как, например, в остатке, с удаленным азотистым основанием. Межнуклеозидные связи также могут нести конъюгатные фрагменты. Что касается фосфорсодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфотиоатной, фосфодитиоатной, фосфорамидатной и т.п.), то конъюгатный фрагмент может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. Что касается амин- или амид-содержащих межнуклеозидных связей (например, PNA), то конъюгатный фрагмент может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

Лиганды GalNAc и линкеры.

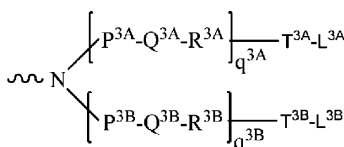
В некотором варианте осуществления siRNA, целенаправленно воздействующая на ген HAO1, конъюгирована с углеводом, например, моносахаридом (таким как GalNAc), дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления siRNA конъюгирована с лигандом N-ацетилгалактозамином (GalNAc). Повышения эффективности доставки в гепатоциты после подкожного введения. Способы конъюгирования углеводов, например N-ацетилгалактозамина, например, с siRNA хорошо известны специалисту в данной области. Примеры могут быть найдены в US 8106022 и WO 2014/025805.

В некоторых вариантах осуществления siRNA, целенаправленно воздействующая на ген HAO1, конъюгирована с лигандом, например с GalNAc, посредством линкера. Например, лигандом может быть одно или несколько производных GalNAc (N-ацетилглюкозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

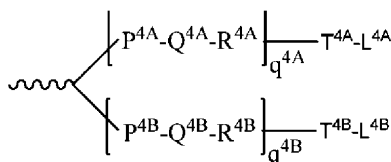
В одном варианте осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентными и трехвалентными разветвленными линкерами, включающими структуры, показанные в любой из формул (IV)-(VII):



Формула (IV)

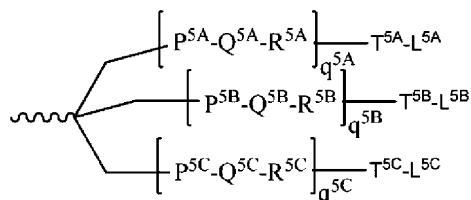


Формула (V)



Формула (VI)

Или



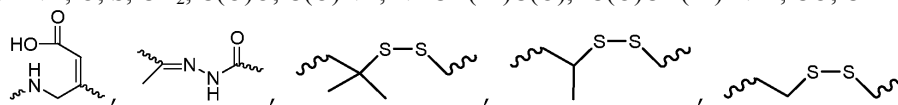
Формула (VII)

где q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} равняются независимо в каждом случае 0-20 и где повторяющиеся единицы могут быть одинаковыми или различными;

каждый из P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{5A} , T^{5B} , T^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} независимо в каждом случае отсутствуют, представляют собой алкилен, замещенный алкилен, где одна или несколько метиленовых групп могут прерываться или

оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);
каждый из R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} независимо в каждом случае отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,

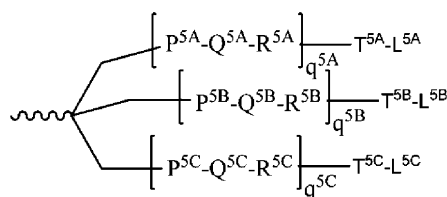


или гетероцикл; или

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд, т.е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и

R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты.

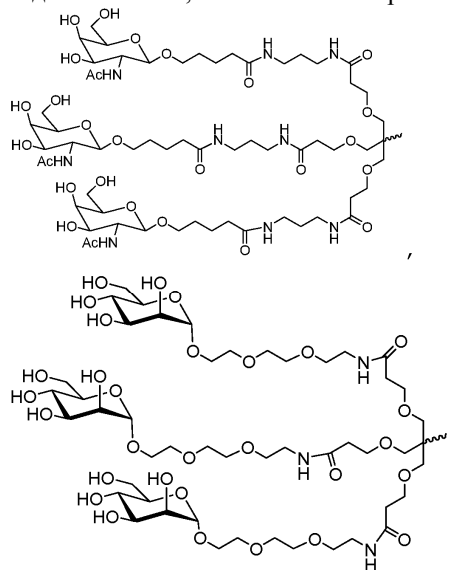
В случае средств для RNAi, служащих для ингибирования экспрессии целевого гена, особенно применимы трехвалентные линкеры, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, такие как линкеры формулы (VII)

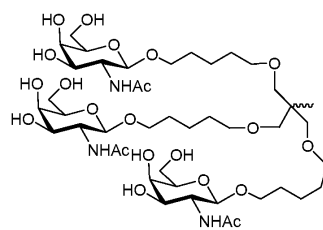
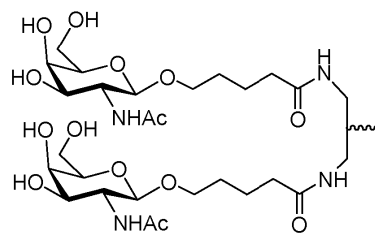
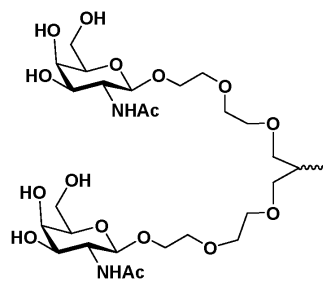
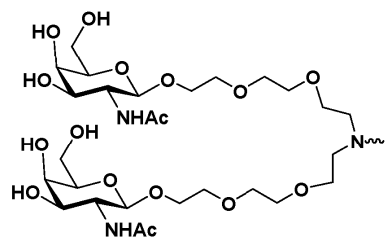
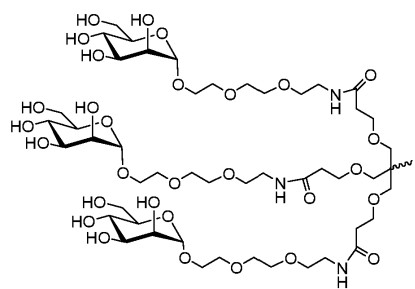


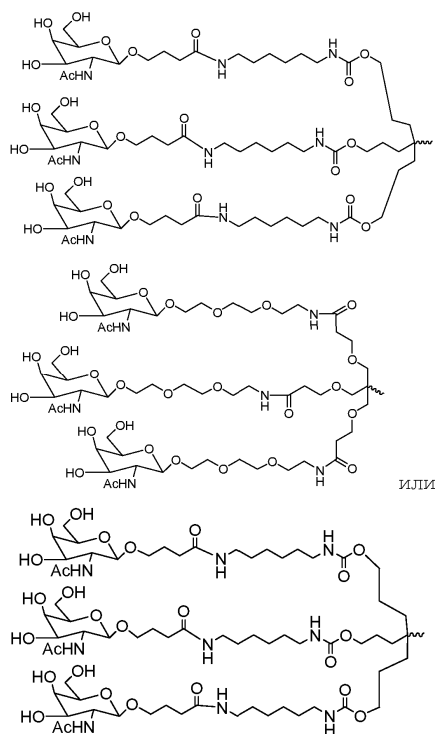
Формула (VII)

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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, включают без ограничения следующие соединения:

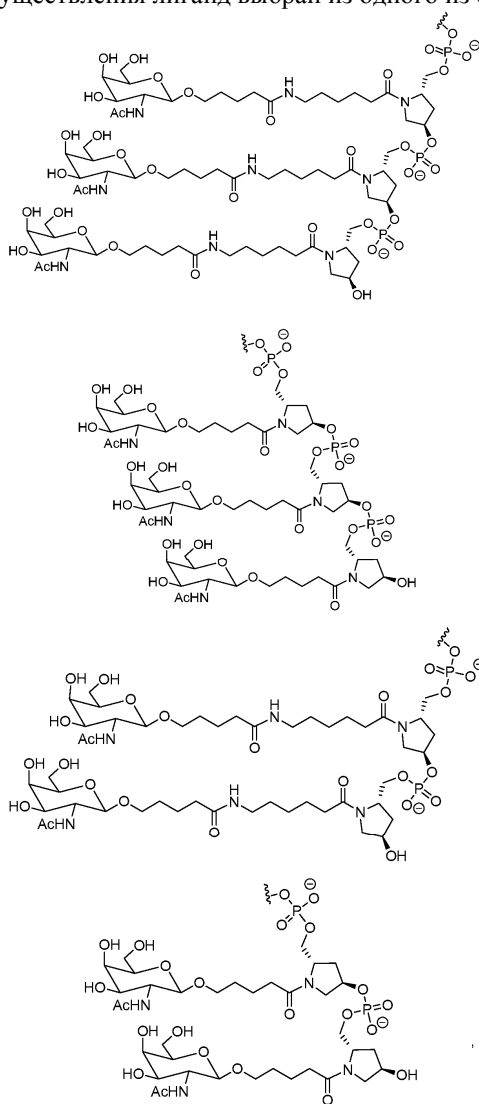


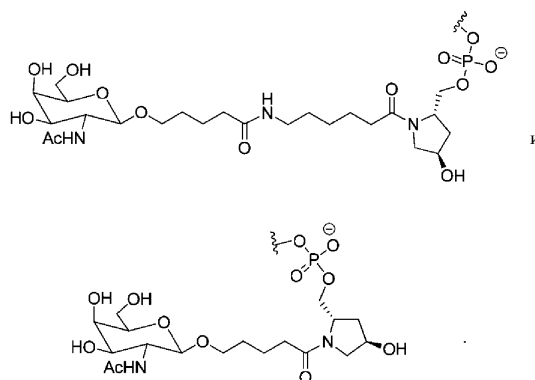




Дополнительные лиганды.

В некоторых вариантах осуществления лиганд выбран из одного из следующих:





III. Доставка iRNA согласно настоящему изобретению.

Доставку средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению к клетке, например клетке в организме субъекта, таком как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с ассоциированным с HAO1 нарушением), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с iRNA согласно настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения субъекту композиции, содержащей iRNA, например dsRNA. В качестве альтернативы доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют iRNA и управляют ее экспрессией. Такие альтернативные случаи дополнительно описаны ниже.

Как правило, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с iRNA согласно настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian R.L. (1992), Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 и WO 94/02595, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном их объеме). Что касается доставки *in vivo*, факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы iRNA, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предупреждение неспецифических эффектов и накопление доставляемой молекулы в целевой ткани.

Неспецифические эффекты iRNA могут быть сведены к минимуму путем локального введения, например путем прямой инъекции или вживления в ткань, или местного введения препарата. Локальное введение в место обработки максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы iRNA. Из результатов нескольких исследований виден эффективный нокдаун генных продуктов при введении iRNA локально. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF как путем инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino, M.J., et al. (2004), Retina 24:132-138), так и субретинальных инъекций мышам (Reich, S.J., et al. (2003), Mol. Vis. 9:210-216) предупреждает неоваскуляризацию в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам уменьшает размер опухоли (Pille, J., et al. (2005), Mol. Ther. 11:267-274) и может продлевать время жизни мышей с опухолями (Kim, W.J., et al. (2006), Mol. Ther. 14:343-350; Li, S., et al. (2007), Mol. Ther. 15:515-523). Было показано, что РНК-интерференция также успешна при локальной доставке к CNS путем непосредственной инъекции (Dorn, G., et al. (2004), Nucleic Acids, 32:e49; Tan, P.H., et al. (2005), Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H., et al. (2002), BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, G.T., et al. (2004), Neuroscience 129:521-528; Thakker, E.R., et al. (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y., et al. (2005), J. Neurophysiol. 93:594-602) и к легким путем интраназального введения (Howard, K.A., et al. (2006), Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X., et al. (2004), J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V., et al. (2005), Nat. Med. 11:50-55). Что касается системного введения iRNA для лечения заболевания, то РНК может быть модифицирована или, альтернативно, доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа служат для предупреждения быстрого разрушения dsRNA эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут делать возможным нацеливание композиции с iRNA на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы iRNA можно модифицировать при помощи химического конъюгирования с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, направленную против AroB iRNA, конъюгированную с липофильным фрагментом, представляющим собой холестерин, системно вводили мышам, что приводило к нокдауну мРНК aroB как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek, J., et al. (2004), Nature, 432:173-178). Как было показано, конъюгация iRNA с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышинных моделях рака предстательной железы (McNamara, J.O., et al. (2006), Nat. Biotechnol. 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления iRNA можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер,

липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы iRNA (отрицательно заряженной), а также увеличивают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения iRNA клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут быть либо связанными с iRNA, либо на них воздействуют для образования пузырька или мицеллы (см., например, Kim S.H., et al. (2008), *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себя iRNA. Образование везикул или мицелл также предупреждает разрушение iRNA при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов с iRNA находятся в пределах квалификации специалистов в данной области (см., например, Sorensen, D.R., et al. (2003), *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, U.N., et al. (2003), *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, A.S. et al. (2007), *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном их объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки iRNA, включают DOTAP (Sorensen, D.R., et al. (2003), выше; Verma, U.N., et al. (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann, T.S., et al. (2006), *Nature*, 441:111-114), кардиолипид (Chien, P.Y., et al. (2005), *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al. (2005), *Int. J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленмин (Bonnet M.E., et al. (2008), *Pharm. Res.* электронная публикация перед печатью 16 августа; Aigner, A. (2006), *J. Biomed. Biotechnol.* 7:1659), содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu, S. (2006), *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидоамины (Tomalia, D.A., et al. (2007), *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al. (1999), *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления iRNA образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции с iRNA и циклодекстринами можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ при помощи ссылки в полном его объеме. Кодированные вектором iRNA согласно настоящему изобретению iRNA, целенаправленно воздействующая на ген HAO1, может экспрессироваться из транскрипционных единиц, вставленных в ДНК-или РНК-векторы (см., например, Couture, A., et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную публикацию согласно PCT № WO 00/22113, Conrad, международную публикацию согласно PCT № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (приблизительно от часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых ткани или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансгены также могут быть сконструированы с возможностью наследования их в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995), 92:1292).

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

Векторы экспрессии iRNA, как правило, являются ДНК-плазмидами или вирусными векторами. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии iRNA, которая описана в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в уровне техники и доступны из ряда коммерческих источников. Как правило, предусмотрено, что такие векторы содержат удобные сайты рестрикции для вставки необходимого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих iRNA, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные от пациента, с последующим обратным введением пациенту или путем любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в необходимую целевую клетку.

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

Системы вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают без ограничения (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные

векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т.д.; (с) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (е) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе поксвируса, такого как ортопокс, например векторы на основе вируса осповакцины, или авипокс, например канарипокс или оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы с нарушенной репликацией. Различные векторы будут встраиваться в геном клеток или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости, конструкции могут включать последовательности вирусов для трансфекции. В качестве альтернативы конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомальной репликации, например векторы на основе EPV и EBV. В конструкциях для рекомбинантной экспрессии iRNA, как правило, будут необходимы регуляторные элементы, например промоторы, энхансеры и т. д., для обеспечения экспрессии iRNA в целевых клетках. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, дополнительно описаны ниже.

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

Экспрессия iRNA может быть точно регулируемой, например, путем использования индуцибельной регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например уровням глюкозы в крови или гормонам (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Такие индуцибельные экспрессирующие системы, подходящие для управления экспрессией dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регулирование при помощи экдизона, при помощи эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-D1-тиогалактопиранозида (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена iRNA.

Можно использовать вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA.

Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Данные ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие iRNA, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты пациенту. Более подробное описание ретровирусных векторов можно найти, например, в Boesen et al., Biotherapy, 6:291-302 (1994), в котором описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* к гемопоэтическим стволовым клеткам для придания стволовым клеткам лучшей устойчивости к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); и Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для применения, включают, например, векторы на основе HIV, описанные в патентах США № 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ при помощи ссылки.

Также для применения в доставке iRNA согласно настоящему изобретению предусматриваются аденовирусы. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные "проводники", например, для доставки генов в респираторный эпителий. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышца. Аденовирусы обладают преимуществом в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) представлена обзорная статья о генной терапии на основе аденовирусов. В Bout et al., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) было показано применение аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий макака-резус. Другие примеры применения аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., Science, 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell, 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J. Clin. Invest. 91:225-234 (1993); публикации согласно PCT WO 94/12649; и Wang, et al., Gene Therapy, 2:775-783 (1995). Подходящий AV-вектор для экспрессии iRNA, описанной в настоящем изобретении, способ конструирования рекомбинантного AV-вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны в Xia H. et al. (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) также можно использовать для доставки iRNA согласно настоящему изобретению (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В одном варианте осуществления iRNA может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных односторонних молекул РНК при помощи рекомбинантного AAV-вектора, например, либо с РНК-промоторами, U6 или H1, либо с промотором цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии dsRNA, описанной в настоящем изобретении, способы конструирования рекомбинантного AAV-вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны в

Samulski R. et al. (1987), J. Virol. 61:3096-3101; Fisher K.J. et al. (1996), J. Virol. 70:520-532; Samulski R. et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патенте США № 5139941; международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ при помощи ссылки.

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

В случае необходимости тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов или путем замещения различных вирусных капсидных белков. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию поверхностными белками из вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Мокола и т.п. AAV-векторы можно получать для нацеливания на различные клетки путем построения векторов так, чтобы они экспрессировали различные серотипы капсидных белков; см., например, Rabinowitz J.E. et al. (2002), J. Virol. 76:791-801, полное раскрытие которого включено в данный документ при помощи ссылки.

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

IV. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают iRNA согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие iRNA, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, являются применимыми для лечения ассоциированного с HAO1 заболевания или нарушения. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки.

Фармацевтические композиции, содержащие средства для RNAi согласно настоящему изобретению, могут быть, например, растворами с буфером или без него или композициями, содержащими фармацевтически приемлемые носители. Такие композиции включают, например, водные или кристаллические композиции, липосомные составы, мицеллярные составы, эмульсии и векторы для генной терапии.

В способах согласно настоящему изобретению средство для RNAi можно вводить в растворе. Свободное средство для RNAi можно вводить в небуферном растворе, например в солевом растворе или в воде. В качестве альтернативы свободную siRNA также можно вводить в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может предусматривать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом солевой раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего средство для RNAi, можно корректировать, с тем чтобы он подходил для введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления буферный раствор дополнительно содержит средство для регулирования осмолярности раствора, так что осмолярность поддерживается при необходимом значении, например при физиологических значениях плазмы крови человека. Растворенные вещества, которые можно добавлять к буферному раствору для регулирования осмолярности, включают без ограничения белки, пептиды, аминокислоты, не поддающиеся метаболизму полимеры, витамины, ионы, сахара, метаболиты, органические кислоты, липиды или соли. В некоторых вариантах осуществления средство для регулирования осмолярности раствора представляет собой соль. В определенных вариантах осуществления средство для регулирования осмолярности раствора представляет собой хлорид натрия или хлорид калия.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена HAO1.

Дозы.

Как правило, приемлемая доза iRNA согласно настоящему изобретению будет находиться в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 мг/кг веса тела реципиента в сутки, как правило, в диапазоне от приблизительно 0,1 до 10 или от 1 до 50 мг/кг веса тела в сутки. Например, dsRNA можно вводить в количестве приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг за однократную дозу.

В другом варианте осуществления средство для RNAi, например dsRNA, вводят в дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 50 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 50 мг/кг,

[illegible]

К примеру, средство для RNAi, например dsRNA, можно вводить в дозе приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или приблизительно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, например, если двухнитевое средство для RNAi предусматривает модификации (например, один или несколько мотивов с тремя одинаковыми модификациями трех последовательных нуклеотидов, в том числе один такой мотив в сайте расщепления средства или рядом с ним), шесть фосфотиоатных связей и лиганд, то такое средство вводят в дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,08 мг/кг или от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,07 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеупомянутым значениям, также являются частью настоящего изобретения, например средство для RNAi можно вводить субъекту в дозе, составляющей от приблизительно 0,015 до приблизительно 0,45 мг/кг.

К примеру, средство для RNAi, например средство для RNAi в фармацевтической композиции, можно вводить в дозе, составляющей приблизительно 0,01, 0,0125, 0,015, 0,0175, 0,02, 0,0225, 0,025, 0,0275, 0,03, 0,0325, 0,035, 0,0375, 0,04, 0,0425, 0,045, 0,0475, 0,05, 0,0525, 0,055, 0,0575, 0,06, 0,0625, 0,065, 0,0675, 0,07, 0,0725, 0,075, 0,0775, 0,08, 0,0825, 0,085, 0,0875, 0,09, 0,0925, 0,095, 0,0975, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475 или приблизительно 0,5 мг/кг. Значения, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также являются частью настоящего изобретения.

Схемы лечения.

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или iRNA можно вводить в виде двух, трех или более частей дозы через определенные интервалы на протяжении дня или даже при помощи непрерывной инфузии или доставки посредством состава с контролируемым высвобождением. В таком случае количество iRNA, содержащееся в каждой части дозы, должно быть соответственно меньше, чтобы обеспечить общую суточную дозу. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, при помощи традиционного состава с замедленным высвобождением, который предусматривает замедленное высвобождение iRNA в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны из уровня техники и особенно пригодны для доставки средств в определенный участок, например, их можно применять со средствами согласно настоящему изобретению. В данном варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее количество суточной дозы.

В других вариантах осуществления однократная доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней или с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 недель. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления настоящего изобретения однократную дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят каждые две недели.

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе без ограничения тяжесть заболевания или нарушения, типы предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать один период лечения или серию периодов лече-

ния. Расчеты эффективных доз и времени полужизни *in vivo* для отдельных iRNA, охваченных настоящим изобретением, можно проводить с применением традиционных методик.

Расчеты эффективных доз и времени полужизни *in vivo* для отдельных iRNA, охваченных настоящим изобретением, также можно проводить на основании тестирования *in vivo* с применением соответствующей животной модели. К примеру, достижения в области генетики мышей обеспечили ряд мышинных моделей для изучения различных заболеваний человека, как, например, нарушения, ассоциированного с экспрессией HAO1. Такие модели можно использовать для проведения тестирования iRNA *in vivo*, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны в данной области и включают, например, животные модели, описанные в данном документе.

Способы введения.

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

iRNA можно доставлять таким образом, чтобы происходило нацеливание на конкретную ткань, такую как печень.

Составы.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают без ограничения растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции могут быть получены из ряда компонентов, который включает без ограничения предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества.

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

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены в любой из многих возможных лекарственных форм, как, например, без ограничения таблеток, капсул, желатиновых капсул, жидких сиропов, пластичных гелей, суппозиториях и клизм. Композиции согласно настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены для перорального введения; парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), подоболочечного, интравентрикулярного или внутривентрикулярного введения и/или местного введения.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводных средах, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики с порошком для приготовления раствора, таблетки или мини-таблетки. Необходимыми могут быть загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения являются такими, в которых dsRNA, описанные в настоящем изобретении, вводят в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксиходезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюкохолевую кислоту, гликохолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидро-фузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопентан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например жирные

кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают полиоксипропилен-9-лауриловый эфир, полиоксипропилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе частиц, высушенных распылением, или в комплексе с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтан, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные виды желатина, альбумины, виды крахмала, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и виды крахмала; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, виды целлюлозы и виды крахмала. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, полидиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминоспирол (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метаакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислот (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Составы для перорального введения для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, публикации США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), подоболочечного, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие соответствующие добавки, такие как без ограничения вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, распыляемые растворы, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. Также могут быть пригодными презервативы, перчатки с покрытием и т.п. Подходящие составы для местного введения включают составы, в которых iRNA, описанные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC), дистеарилфосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеилфосфатидилэтаноламин (DOTMA)). iRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности с катионными липосомами. В качестве альтернативы iRNA могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают без ограничения арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложные C₁₋₂₀алкиловые эфиры (например, изопропилмиристат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ при помощи ссылки.

Составы с iRNA, содержащие мембранные молекулярные ансамбли.

iRNA для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению могут быть составлены для доставки в мембранном молекулярном ансамбле, например липосоме или мицелле. Используемый в данном документе термин "липосома" относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю среду. Водная часть содержит композицию с iRNA. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию с iRNA, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к участку их действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, в случае введения липосом в ткань бислои липосомы сливаются с бислоем клеточных мембран. По мере того как идет слияние липосомы и клетки внутреннее водное содержимое, которое включает iRNA, доставляется в клетку, где iRNA может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления iRNA в конкретные типы клеток.

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

При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять во время реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может быть полимером, отличным от нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). Также можно корректировать pH для содействия конденсации.

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

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

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

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

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

Также исследовали неионогенные липосомные системы для определения их пригодности в доставке лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-A в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионные липосомные системы были эффективны в обеспечении депонирования циклоспорина A в различных слоях кожи (Hu et al. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4(6):466).

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

Различные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, известны в уровне техники. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозид G_{M1} , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen et al., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{M1} или сложные эфиры сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn- димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al).

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

Дополнительные преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из натуральных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразрушаемыми; липосомы могут включать широкий диапазон водо- и липидорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные средства для RNAi во своих внутренних отделениях от метаболизма и разрушения (Rosoff, в "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами, которые необходимо учитывать при получении липосомных составов, являются поверхностный заряд липида, размер везикулы и водный объем липосом.

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

Аналог DOTMA, 1,2-бис-(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно применять в комбинации с фосфолипидом с образованием везикул, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки сильно анионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Суммарный заряд полученных комплексов является также положительным в тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно присоединяются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис-(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

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

Другой конъюгат с катионным липидом предусматривает получение производных липида с помощью холестерина ("DC-Chol"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см.,

Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Сообщалось, что липополизин, полученный путем конъюгирования полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки крови (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1065:8, 1991). Сообщается, что в случае определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA-содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты с катионными липидами включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

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

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

Липосомы, которые включают iRNA, могут быть получены с высокой способностью к деформации. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше среднего радиуса липосомы. К примеру, типом деформируемых липосом являются трансферосомы. Трансферосомы можно получать путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, к стандартной липосомной композиции. Трансферосомы, которые включают средство для RNAi, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки средства для RNAi к кератиноцитам в коже. Для того, чтобы пройти через неповрежденную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны проникнуть через ряд мелких пор, каждая с диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферосомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и, зачастую, могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

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

Трансферосомы представляют собой еще один тип липосом и представляют собой липидные агрегаты с высокой способностью к деформации, они являются перспективными кандидатами в качестве средств доставки лекарственных средств. Трансферосомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью к деформации, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капельки. Трансферосомы являются приспособляющимися к окружающей среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор кожи), самовосстанавливающимися, зачастую достигают мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферосом можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомной композиции. Трансферосомы использовали для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферосомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (в том числе микроэмульсии) и липосомы. Наиболее распространенным способом классифицирования и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как естественных, так и синтетических, является применение гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как "головка") предоставляет наиболее эффективное средство для распре-

деления по категориям различных поверхностно-активных веществ, применяемых в составах (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, то ее классифицируют как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и они применимы при широком диапазоне значений pH. Обычно их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до приблизительно 18, в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные глицероловые эфиры, сложные полиглицероловые эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионогенные алканоамиды и простые эфиры, как, например, этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-сополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, как, например, омыляющие вещества, ацил-лактаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты, и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

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

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

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

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

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции с siRNA, C₈-C₂₂-алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, вытяжку из ромашки, вытяжку из огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксикхолат, дезоксикхолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут формироваться практически при любом типе смешивания ингредиентов, но для получения мицелл с меньшим размером требуется интенсивное перемешивание.

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

Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами.

Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде распыляемого раствора состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который пребывает под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся единым целым, т.е. присутствует одна фаза. Если присутствуют две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением порции содержимого, например, через дозирующий клапан. Распыляемая доза фармацевтического средства вытесняется из дозирующего клапана в виде мелкодисперсного распыляемого раствора.

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

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

Липидные частицы.

iRNA, например dsRNA, согласно настоящему изобретению могут быть полностью инкапсулированы в липидном составе, например LNP или другой частице нуклеиновая кислота-липид.

Используемый в данном документе термин "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновой кислоты-липида. LNP содержат катионный липид, некаатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP весьма пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который изложен в PCT публикации № WO 00/03683. Частицы согласно настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр от приблизительно 50 до приблизительно 150 нм, чаще от приблизительно 60 до приблизительно 130 нм, чаще от приблизительно 70 до приблизительно 110 нм, наиболее часто от приблизительно 70 до приблизительно 90 нм, и они являются практически нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновой кислоты-липида согласно настоящему изобретению, тогда устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и публикации согласно PCT № WO 96/40964.

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

Катионный липид может представлять собой, например:

хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC),
бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB),
хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP),
хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA),
N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA),
1,2-диолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA),
1,2-диолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA),
1,2-диолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP),
1,2-диолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC),
1,2-диолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA),
1,2-диолеилоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP),
1,2-диолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA),
1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMA),
хлористую соль 1,2-диолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA-Cl),
хлористую соль 1,2-диолеилоил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP-Cl),
1,2-диолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или
3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP),
3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP),

1,2-дилинолеилоксо-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA),
 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA),
 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги,
 (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]-диоксол-5-амин (ALN100),
 (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3),
 1,1'-(2-(4-(2-((2-бис-(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1)
 или их смесь.

Катионный липид может содержать от приблизительно 20 до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц на основе липида-siRNA. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в международной заявке № PCT/US2009/061897, опубликованной как WO 2010/048536, которая включена в данный документ при помощи ссылки.

В одном варианте осуществления частица на основе липида-siRNA включает 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана: 10% DSPC: 40% холестерина: 10% PEG-C-DOMG (молярный процент) с размером частиц, составляющим $63,0 \pm 20$ нм, и соотношением siRNA/липид, составляющим 0,027.

Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе без ограничения дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоиллеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоиллеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоил-фосфатидилэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от приблизительно 5 до приблизительно 90, приблизительно 10 или приблизительно 58 мол.%, если холестерин включен, от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

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

В некоторых вариантах осуществления частица на основе нуклеиновой кислоты-липиды дополнительно включает холестерин в количестве, например, от приблизительно 10 до приблизительно 60 или приблизительно 48 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В одном варианте осуществления липидоид ND98-4HCl (MW 1487) (см. заявку на выдачу патента США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно использовать для получения наночастиц на основе липида-dsRNA (т.е. частиц LNP01). Маточные растворы каждого в этаноле могут быть получены следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Маточные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно затем объединять, например, в молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водным раствором dsRNA (например, в ацетате натрия, pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла приблизительно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла приблизительно 100-300 мМ. Наночастицы на основе липида-dsRNA обычно образуются самопроизвольно при смешивании. В зависимости от необходимого распределения частиц по размеру, полученную смесь наночастиц можно продавливать через поликарбонатную мембрану (например, с отсеком по размеру в 100 нм) с использованием, например, экструдера с термоцилиндром, как, например, Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть осуществлены, например, при помощи диализа или тангенциальной точечной фильтрации. Буфер можно заменить, например, забуференным фосфатом солевым раствором (PBS) с pH, составляющим приблизительно 7, например pH, составляющим приблизительно 6,9, pH, составляющим приблизительно 7,0, pH, составляющим приблизительно 7,1, pH, составляющим приблизительно 7,2, pH, составляющим приблизительно 7,3, или pH, составляющим приблизительно 7,4. Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, которая настоящей включена при помощи ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы на основе липида-dsRNA описаны в табл. А.
Таблица А

Иллюстративные составы на основе липида-dsRNA

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
LNP_DL inDMA	1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPFC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:siRNA ~ 7:1
2-ХТС	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DPFC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5 липид:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5 липид:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-(2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанаедиил дидодекан-2-ол (C12-200)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5

		липид:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 7:1
LNP22	ХТС	ХТС/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1

Сокращения в табл. А включают следующее: DSPC: дистеароилфосфатидилхолин; DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин; PEG-DMG: PEG-дидимиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средней молекулярной массой 2000); PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средней молекулярной массой 2000); PEG-cDMA: PEG-карбамоил-1,2-димиристоилоксипропиламин (PEG со средней молекулярной массой 2000).

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

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

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 г., полное содержание которой настоящим включено при помощи ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны, например, в международной заявке на выдачу патента с номером PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 г., которая настоящим включена при помощи ссылки.

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

Дополнительные составы.

(i) Эмульсии.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, являются гетерогенными системами одной жидкости, диспергированной в другой в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две

несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является мелкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы, в тех случаях, когда масляная фаза является мелкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты вдобавок к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе либо как таковое в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят более чем из двух фаз, такие как, например, в случае эмульсий по типу "масло в воде в масле" (o/w/o) и "вода в масле в воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии по типу o/w включают маленькие водные капельки, составляют эмульсию по типу w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию по типу o/w/o.

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

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составе эмульсий, и их рассматривали в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., и Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную части. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидрофильно-липофильным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом в распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионная, анионная, катионная и амфотерная (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., и Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

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

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в составы эмульсий, и они содействуют свойствам эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, карра-

генан, гуаровую камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования крепких межфазных пленок вокруг капелек диспергированной фазы и путем повышения вязкости дисперсионной фазы.

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

Применение составов эмульсий посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., и Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Составы эмульсий для пероральной доставки очень широко применяют из-за удобства составления, а также с точки зрения эффективности при абсорбции и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., и Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира находятся в числе материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий по типу o/w.

(ii) Микроэмульсии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции iRNA и нуклеиновых кислот составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного вещества, которая является отдельным оптически изотропным и термодинамически стабильным жидким раствором (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., и Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии представляют собой системы, которые получают путем сперва диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи, с получением прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные, изотропически чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung и Shah, в Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Является ли микроэмульсия микроэмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или "масло в воде" (o/w), зависит от свойств используемых масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Активно изучается феноменологический подход с использованием фазовых диаграмм, и с его помощью специалистами в данной области были получены обширные данные о том, как составлять микроэмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., и Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger и Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с традиционными эмульсиями микроэмульсии имеют преимущество солюбилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически стабильных капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглице-

рина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся спиртом с короткой цепью, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без использования вторичных поверхностно-активных веществ, и в области техники известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, без ограничения может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может предусматривать без ограничения материалы, такие как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C_8 - C_{12}) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерила, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные C_8 - C_{10} -глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения растворимости лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (по типу как o/w, так и w/o) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патенты США № 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной растворимости лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного увеличения абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести мембран и проницаемости, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердой лекарственной формой, улучшенной клинической действенности и пониженной токсичности (см., например, патенты США № 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающей среды. Это может быть в особенности преимущественным, когда составляют термолабильные лекарственные средства, пептиды или iRNA. Микроэмульсии также были эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как при косметических, так и при фармацевтических применениях. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий согласно настоящему изобретению будут способствовать повышенной системной абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальное клеточное поглощение iRNA и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии согласно настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции iRNA и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, используемые в микроэмульсиях согласно настоящему изобретению, могут быть классифицированы, как принадлежащие к одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие вещества, отличные от поверхностно-активных веществ (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из этих классов рассмотрен выше.

(iii) Микрочастицы.

Средство для RNAi согласно настоящему изобретению может быть включено в частицу, например микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи сушки распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдооживленном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

(iv). Вещества, способствующие проникновению.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении применяют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для воздействия на эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности iRNA, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной форме. Однако, как правило, только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. Вдобавок к способствованию диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Вещества, способствующие проникновению, могут быть классифицированы, как принадлежащие к одной из пяти основных категорий, т.е. поверхностно-активным веществам, жирным кислотам, солям желчных кислот, хелатирующим средствам и нехелатирующим веществам, отличным от поверхностно-

активных веществ (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из вышеуказанных классов веществ, способствующих проникновению, описан ниже более подробно.

Поверхностно-активные вещества (или "сурфактанты") являются химическими структурными единицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую. Помимо солей желчных кислот и жирных кислот, эти вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92) и перфорированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклопентан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C₁₋₂₀алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, мириститат, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.) (см., например, Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает содействие в распределении и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 в Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, p. 934-935). Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как вещества, способствующие проникновению. Таким образом, термин "соли желчных кислот" включает любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любые из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюкохолевую кислоту (глюкохолат натрия), гликохолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см., например, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 в: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие средства, используемые применительно к настоящему изобретению, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего повышается абсорбция iRNA через слизистую. В отношении их применения в качестве веществ, способствующих проникновению, в настоящем изобретении хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом, также выступая в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и, таким образом, ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают без ограничения двунатриевый этилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные бета-дикетонов (енамины) (см., например, Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Используемые в данном документе нехелатирующие соединения, отличные от поверхностно-активных веществ, способствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию iRNA через слизистую пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7,

1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацикло-алканона (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые повышают поглощение iRNA на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям согласно настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al, патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка согласно PCT WO 97/30731), также, как известно, повышают степень клеточного захвата dsRNA. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Freestyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции BaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TrojanPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Для повышения проникновения введенных нуклеиновых кислот можно использовать другие средства, в том числе гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

(v) Носители.

Определенные композиции согласно настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Используемый в данном документе термин "соединение-носитель" или "носитель" может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которые являются инертными (т.е. не обладают биологической активностью *per se*), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты с биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, перерабатываемой печенью, почками или другими внесосудистыми депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, переработка частично фосфотиоатной dsRNA тканью печени может быть сокращена при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоциано-стильбен-2,2'-дисульфокислотой (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

(vi) Наполнители.

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертное средство для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым веществом, и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения с тем, чтобы обеспечить необходимый объем, консистенцию и т.д., при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (например, желатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин и т.д.).

тин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или вторичный кислый фосфат кальция и т.д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); разрыхлители (например, крахмал, натрия крахмалгликолат и т.д.) и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

Также для составления композиций согласно настоящему изобретению можно применять фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, растворы солей, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители включают без ограничения воду, растворы солей, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

(vii) Другие компоненты.

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно встречающиеся в фармацевтических композициях, при уровнях применения, установленных в уровне техники. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, пригодные для физического составления композиций согласно настоящему изобретению в различных лекарственных формах, такие как красители, ароматизирующие вещества, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно вступать в конфликт с биологическими активностями компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы могут быть стерильными, и, при необходимости, их можно смешивать со вспомогательными средствами, например смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для оказания влияния на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или отдушками и т.п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой(ыми) кислотой(ами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, гидроксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают (а) одно или несколько соединений, представляющих собой iRNA, и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от RNAi, и которые пригодны в лечении, например, РН1.

Тестирование композиций.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, летальной для 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсичным и терапевтическим эффектами является терапевтическим индексом, и его можно выражать как соотношение LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные при анализах с клеточными культурами и исследованиях на животных, можно использовать при составлении ряда доз для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, описанных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включают ED50 с малой токсичностью или без таковой. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов с клеточными культурами. Доза может быть составлена для животных моделей для получения диапазона концентрации циркулирующего в плазме соединения или, при необходимости, полипептидного продукта целевой исследования (например, достижения уменьшенной концентрации полипептида), что включает IC₅₀ (т.е. концентрацию тестового соединения, при помощи которой достигают полумаксимальное ингибирование симптомов), которую устанавливают в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для

более точного определения пригодной дозы у людей. Уровни в плазме можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, рассматриваемому выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, которые опосредованы перегрузкой железом и которые можно лечить путем ингибирования экспрессии HAO1. В любом случае, курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения iRNA, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных в уровне техники или описанных в данном документе.

V. Способы ингибирования экспрессии HAO1.

Настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии HAO1 (оксидазы 1 гидроксикислот) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например двухнитевым средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии HAO1 в клетке, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии HAO1 в клетке.

Приведение клетки в контакт с двухнитевым средством для RNAi можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. *In vivo* приведение клетки в контакт со средством для RNAi включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например субъекта-человека, в контакт со средством для RNAi. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. Приведение в контакт может быть непосредственным или опосредованным, как рассматривалось выше. Более того, приведение в контакт клетки можно выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например лиганд, представляющий собой GalNAc₃, или любой другой лиганд, который направляет средство для RNAi к месту, представляющему интерес, например, печени субъекта.

Термин "ингибирование", используемый в данном документе, используют взаимозаменяемо с "сокращением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией" и другими подобными терминами, и он включает любой уровень ингибирования.

Подразумевают, что фраза "ингибирование экспрессии HAO1" относится к ингибированию экспрессии любого гена HAO1 (такого как, например, ген HAO1 мыши, ген HAO1 крысы, ген HAO1 обезьяны или ген HAO1 человека), а также вариантов или мутантов гена HAO1. Таким образом, ген HAO1 может быть геном HAO1 дикого типа, мутантным геном HAO1 или трансгенным геном HAO1 в контексте клетки, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена HAO1" включает любой уровень ингибирования гена HAO1, например по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена HAO1. Экспрессию гена HAO1 можно оценивать исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена HAO1, например уровня мРНК HAO1, уровня белка HAO1. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, образце, полученном из организма субъекта.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые связаны с экспрессией HAO1, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в данной области, например исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению экспрессия гена HAO1 ингибируется по меньшей мере приблизительно на 5%, по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно на 15%, по меньшей мере приблизительно на 20%, по меньшей мере приблизительно на 25%, по меньшей мере приблизительно на 30%, по меньшей мере приблизительно на 35%, по меньшей мере приблизительно на 40%, по меньшей мере приблизительно на 45%, по меньшей мере приблизительно на 50%, по меньшей мере приблизительно на 55%, по меньшей мере приблизительно на 60%, по меньшей мере приблизительно на 65%, по меньшей мере приблизительно на 70%, по меньшей мере приблизительно на 75%, по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 85%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 91%, по меньшей мере приблизительно на 92%, по меньшей мере приблизительно на 93%, по меньшей мере приблизительно на 94%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98% или по меньшей мере приблизительно на 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена HAO1 может служить снижение количества мРНК, экспрессируемого первой клеткой или первой группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном из организма субъекта), в которых транскрибируется ген HAO1 и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством для RNAi согласно настоящему изобретению или посредством введения средства для RNAi

согласно настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились), так что экспрессия гена HAO1 ингибируется по сравнению со второй клеткой или второй группой клеток, по сути, идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не обрабатывали (контрольная(ые) клетка(и)). В некоторых вариантах осуществления ингибирование оценивают посредством выражения уровня мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

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

В качестве альтернативы ингибирование экспрессии гена HAO1 можно оценивать по снижению параметра, который функционально связан с экспрессией гена HAO1, например экспрессией белка HAO1. Сайленсинг гена HAO1 можно выявить в любой клетке, экспрессирующей HAO1 либо конститутивно, либо при помощи генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного в уровне техники. Печень является основным местом экспрессии HAO1. Другие важные места экспрессии включают почки и матку.

Доказательством ингибирования экспрессии белка HAO1 может служить снижение уровня белка HAO1, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном из организма субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки супрессии мРНК, ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или обработанной группе клеток можно аналогично выражать как процент от уровня белка в контрольной клетке или группе контрольных клеток.

Контрольная клетка или контрольная группа клеток, которую можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена HAO1, включают клетку или группу клеток, которая еще не была в контакте со средством для RNAi согласно настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или контрольная группа клеток может быть получена от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта средством для RNAi.

Уровень мРНК HAO1, который экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять при помощи любого способа, известного в уровне техники, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии HAO1 в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например мРНК гена HAO1. РНК можно извлекать из клеток при помощи методики извлечения РНК, включая, например, извлечение с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen) или RAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используют гибридизацию рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы защиты от РНКаз (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию in situ и микроматричные анализы.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии HAO1 определяют при помощи зонда для нуклеиновой кислоты. Термин "зонд", используемый в данном документе, относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретным HAO1. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Могут быть специально сконструированы зонды, содержащие метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенные мРНК можно использовать при анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения анализы, представляющие собой саузерн- или нозерн-блоттинг, анализы, представляющие собой полимеразную цепную реакцию (PCR), и матрицы с зондами. Один способ определения уровней мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК HAO1. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем пропускания выделенной мРНК через агарозный гель и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например на генном микрочипе Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для применения в определении уровня мРНК HAO1.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии HAO1 в образце включает способ амплификации нуклеиновой кислоты и/или обратной транскрипции (с получением кДНК), например, мРНК в образце, например при помощи RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен в Mullis, 1987, патенте США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193), самоподдерживающейся репликации 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), репликазы Q-бета (Lizardi et al. (1988), Bio/Technology 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033) или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты, за которым следует обнаружение амплифицированных молекул при помо-

щи методик, хорошо известных специалисту в данной области. Такие схемы обнаружения особенно пригодны для обнаружения молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах согласно настоящему изобретению уровни экспрессии HAO1 определяют при помощи количественной флуорогенной RT-PCR (т.е. системы TaqMan™).

Уровни экспрессии мРНК HAO1 можно контролировать при помощи мембранного блота (как, например, используемого при анализе гибридизации, такого как нозерн, саузерн, дот и т.п.) или микролунок, опытных пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанную нуклеиновую кислоту). См. патенты США № 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ при помощи ссылки. Определение уровня экспрессии HAO1 также может включать использование зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с использованием анализов с разветвленной ДНК (bDNA) или PCR в режиме реального времени (qPCR). Применение таких способов описано и проиллюстрировано в разделе "Примеры", представленном в данном документе.

Уровень экспрессии белка HAO1 можно определить, используя любой способ, известный в уровне техники для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлюоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т.п.

Термин "образец", используемый в данном документе, относится к отбору схожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку крови и серозные жидкости, плазму крови, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, слюну, внутриглазные жидкости и т.п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы можно получить из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления "образец, полученный из организма субъекта" относится к крови или плазме крови, взятым из организма субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный из организма субъекта" относится к ткани печени, полученной из организма субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту так, что средство для RNAi доставляется к конкретному месту в организме субъекта. Ингибирование экспрессии HAO1 можно оценивать при помощи измерений уровня или изменения уровня мРНК HAO1 или белка HAO1 в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного места в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления местом является печень. Местом также может быть подразделение или подгруппа клеток из любого из указанных выше мест. Место также может включать клетки, которые экспрессируют конкретный тип рецептора.

VI. Способы лечения или предупреждения ассоциированного с HAO1 нарушения.

Настоящее изобретение также предусматривает способы лечения или предупреждения заболеваний и состояний, на которые можно воздействовать при помощи экспрессии гена HAO1. Например, композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения любого нарушения, ассоциированного с RH1.

Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценивать, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, соответствующего данному заболеванию, лечение которого осуществляют или предупреждение которого предусматривают. Контролирование эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров находится в компетенции специалиста в данной области.

Лечебный или предупредительный эффект является очевидным, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров болезненного состояния, или по отсутствию усугубления или развития симптомов в тех случаях, когда их, при иных обстоятельствах, прогнозировали. В качестве примера благоприятное изменение измеряемого параметра заболевания по меньшей мере на 10% и предпочтительно по меньшей мере на 20, на 30, на 40, на 50% или более может служить показателем эффективного лечения. Об эффективности данного лекарственного средства на основе iRNA или состава с таким лекарственным средством можно также судить при помощи экспериментальной животной модели данного заболевания, которая известна в уровне техники. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения доказана, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

В качестве альтернативы эффективность можно измерять по уменьшению тяжести заболевания, которое определено специалистом в области техники, связанной с диагностикой, исходя из принятой в клинической практике шкалы оценивания тяжести заболевания.

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению, экспрессия HAO1 снижается в течение длительного отрезка времени, например по меньшей мере одной недели, двух недель, трех недель или четырех недель, или дольше. Например, в некоторых случаях экспрессия гена HAO1 подавляется по меньшей мере приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 100% путем введения средства на основе iRNA, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ген HAO1 подавляется по меньшей мере приблизительно на 60, 70 или 80% путем введения средства на основе iRNA. В некоторых вариантах осуществления ген HAO1 подавляется по меньшей мере приблизительно на 85, 90 или 95% путем введения двухнитевого олигонуклеотида. В другом варианте осуществления ген HAO1 остается подавленным в течение 7 дней, 10 дней, 20 дней, 30 дней или дольше после введения.

Введение.

Средства для RNAi согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту при помощи любого способа введения, известного в уровне техники, в том числе без ограничения подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, внутрибронхиального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, спинномозгового и любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления средства вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции депо-препарата. Инъекция депо-препарата может высвобождать средство для RNAi устойчивым образом в течение длительного периода времени. Таким образом, инъекция депо-препарата может снижать частоту введения доз, необходимых для получения необходимого эффекта, например необходимого ингибирования HAO1 или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также предусматривать более устойчивые концентрации в сыворотке крови. Инъекции депо-препарата могут предусматривать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В некоторых вариантах осуществления инъекция депо-препарата является подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или имплантированным хирургическим путем насосом. В определенных вариантах осуществления насос является подкожно имплантированным осмотическим насосом. В других вариантах осуществления насос является инфузионным насосом. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В некоторых вариантах осуществления инфузионный насос является подкожным инфузионным насосом. В других вариантах осуществления насос является имплантированным хирургическим путем насосом, который доставляет средство для RNAi в печень.

Другие способы введения включают эпидуральное, внутричерепное, интрацеребровентрикулярное, назальное введение, внутриартериальное, внутрисердечное, внутрикостную инфузию, подоболочечное, и интравитреальное, и легочное. Способ введения можно выбрать, исходя из того, необходимо местное или системное лечение, и исходя из области, которая подлежит лечению. Путь и место введения можно выбрать для усиления целенаправленного воздействия.

Способ включает введение средства на основе iRNA, например дозы, достаточной для понижения уровней мРНК HAO1 в течение по меньшей мере 5, более предпочтительно 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней; и необязательно введение второй однократной дозы dsRNA, где вторую однократную дозу вводят по меньшей мере через 5, более предпочтительно через 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней после введения первой однократной дозы, за счет чего осуществляется ингибирование экспрессии гена HAO1 у субъекта.

В одном варианте осуществления дозы средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению вводят не более одного раза каждые четыре недели, не более одного раза каждые три недели, не более одного раза каждые две недели или не более одного раза каждую неделю. В другом варианте осуществления введения могут продолжаться в течение одного, двух, трех или шести месяцев, или одного года, или дольше. В другом варианте осуществления дозы средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению вводят один раз в неделю в течение трех недель.

Как правило, средство на основе iRNA не активизирует иммунную систему, например оно не повышает уровни цитокинов, как, например, уровни TNF-альфа или IFN-альфа. Например, при измерении при помощи анализов, таких как анализ PBMC in vitro, как, например, описано в данном документе, повышение уровней TNF-альфа или IFN-альфа составляет менее 30, 20 или 10% от уровня в контрольных клетках, обработанных контрольной dsRNA, такой как dsRNA, которая не оказывает целенаправленного воздействия на HAO1.

Например, субъекту можно вводить терапевтическое количество средства на основе iRNA, как, например, 0,3, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 или 3 мг/кг dsRNA. Средство на основе iRNA можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, как, например, в течение периода, составляющего 5, 10, 15, 20 или 25 мин. Введение повторяют, например, регулярно, как, например, раз в

две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного, двух, трех, четырех месяцев или дольше. После осуществления режима первичного лечения лекарственные препараты можно вводить менее часто. Например, после введения раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев или года или дольше. Введение средства на основе iRNA может снижать уровни HAO1, например, в клетке, ткани, крови, моче или другой части организма пациента по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% или более.

Перед введением полной дозы средства на основе iRNA пациентам можно вводить меньшую дозу, как, например, дозу, приводящую к менее чем 5% инфузионной реакции, и наблюдать их в отношении нежелательных явлений, как, например, аллергических реакций, или в отношении повышенных уровней липидов или кровяного давления. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательных иммуностимулирующих эффектов, как, например, повышенных уровней цитокина (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Пациенты, нуждающиеся в средстве для RNAi к HAO1, могут быть идентифицированы путем сбора семейного анамнеза. Медицинский работник, такой как врач, медицинская сестра, или член семьи могут принять во внимание семейный анамнез перед назначением или введением dsRNA для HAO1. Также можно выполнять ДНК-тест в отношении пациента для идентификации мутации в гене AGT1 перед введением пациенту средства для RNAi к HAO1. Диагноз PH1 может быть подтвержден при помощи любого теста, хорошо известного специалисту в данной области.

Лечебный или предупредительный эффект является очевидным, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров болезненного состояния, или по отсутствию усугубления или развития симптомов в тех случаях, когда их, при иных обстоятельствах, прогнозировали. В качестве примера благоприятное изменение измеряемого параметра заболевания по меньшей мере на 10% и предпочтительно по меньшей мере на 20, на 30, на 40, на 50% или более может служить показателем эффективного лечения. Об эффективности для данного средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению или состава такого средства на основе iRNA можно также судить при помощи экспериментальной животной модели для данного заболевания, которая известна в уровне техники. При использовании экспериментальной животной модели, эффективность лечения доказана, когда наблюдают статистически значимое снижение маркера или ослабление симптома.

Доза средства для RNAi, которую вводят субъекту, может быть подобрана с уравниванием риска и пользы определенной дозы, например, для достижения необходимого уровня супрессии гена HAO1 (который определяют, например, исходя из супрессии мРНК HAO1, экспрессии белка HAO1 или снижения уровней оксалатов) или необходимого терапевтического или профилактического эффекта, вместе с тем одновременно избегая нежелательного побочного действия.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят при помощи двух или более доз. При необходимости облегчить проведение повторяющихся или частых инфузий может быть целесообразной имплантация устройства для доставки, например насоса, полупостоянного стента (например, внутривенного, внутривнутрибрюшинного, интракостального или внутрисуставного) или емкости. В некоторых вариантах осуществления число или количество последовательных доз зависит от достижения необходимого эффекта, например супрессии гена HAO1, или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например уменьшения перегрузки железом. В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в соответствии со схемой. Например, средство для RNAi можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления схема предусматривает введения с равными интервалами, например ежедневно, каждые 4, каждые 6, каждые 8, каждые 12 ч, ежедневно, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, еженедельно, раз в две недели или раз в месяц. В других вариантах осуществления схема предусматривает введения с небольшим интервалом с последующим более длительным периодом времени, в течение которого средство не вводят. Например, схема может включать первичный набор доз, которые вводят в течение относительно короткого периода времени (например, приблизительно каждые 6 ч, приблизительно каждые 12 ч, приблизительно каждые 24 ч, приблизительно каждые 48 ч или приблизительно каждые 72 ч) с последующим более длительным периодом времени (например, приблизительно 1 неделя, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель или приблизительно 8 недель), в течение которого средство для RNAi не вводят. В одном варианте осуществления средство для RNAi первоначально вводят каждый час, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, раз в день, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц). В другом варианте осуществления средство для RNAi первоначально вводят ежедневно, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц). В определенных вариантах осуществления более длительный интервал увеличивается со временем, или его определяют на основе достижения необходимого эффекта. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят один раз в день в течение первой недели с последующим введением доз раз в неделю, начиная с восьмого дня введения. В

другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят через день в течение первой недели с последующим введением доз раз в неделю, начиная с восьмого дня введения.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят при режиме дозирования, который включает "фазу насыщения" из введений с небольшими интервалами, за которой может следовать "фаза поддержания", в которой средство для RNAi вводят с более длительными интервалами. В одном варианте осуществления фаза насыщения включает пять ежедневных введений средства для RNAi в течение первой недели. В другом варианте осуществления фаза поддержания включает введения средства для RNAi один или два раза в неделю. В дополнительном варианте осуществления фаза поддержания длится 5 недель.

Любую из этих схем необязательно можно повторять с обеспечением одного или нескольких повторов. Число повторов может зависеть от достижения необходимого эффекта, например супрессии гена HAO1, и/или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например снижения уровня оксалатов или уменьшения симптома PH1.

В другом аспекте в настоящем изобретении описан способ инструктирования конечного пользователя, например лица, осуществляющего уход или лечение, или субъекта, в отношении того, как вводить средство на основе iRNA, описанное в данном документе. Способ включает, необязательно, предоставление конечному пользователю одной или нескольких доз средства на основе iRNA и инструктирование конечного пользователя по введению средства на основе iRNA в режиме, описанном в данном документе, таким образом, инструктируя конечного пользователя.

VII. Наборы.

Настоящее изобретение также предусматривает наборы для применения любого из средств на основе iRNA и/или осуществления любого из способов согласно настоящему изобретению. Такие наборы включают одно или несколько средств для RNAi и инструкции по применению, например инструкции для ингибирования экспрессии HAO1 в клетке путем приведения клетки в контакт со средством(ами) для RNAi в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии HAO1. Наборы могут необязательно дополнительно содержать средства для приведения клетки в контакт со средством для RNAi (например, устройство для инъекции) или средства для определения степени ингибирования HAO1 (например, средства для определения степени ингибирования мРНК или белка HAO1). Такие средства для определения степени ингибирования HAO1 могут предусматривать средства для получения образца из организма субъекта, например образец плазмы крови. Наборы согласно настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для введения средства(средств) для RNAi субъекту или средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

VIII. Диагностические маркеры для PH1 и родственных состояний/

Также в данном документе описаны маркеры и способы для диагностики болезненных состояний, вызванных сверхсинтезом оксалатов, в частности PH1 и родственных состояний, а также средства для лечения указанных состояний.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения PH1-состояния у субъекта (заболеваний с образованием камней, в особенности PH1). Диагностический способ включает стадии (a) осуществления нокдауна экспрессии HAO1 у субъекта, (b) получения биологической сыворотки крови из организма указанного субъекта и (b) определения уровня гликолата в указанной сыворотке крови. Следует принимать во внимание, что повышенный уровень гликолата в сыворотке крови по сравнению с отрицательным контролем указывает на ингибирование способности фермента гликолат-оксидазы предотвращать образование оксалатов, что является причиной PH1-состояний.

В одном варианте осуществления в данном документе описан набор для диагностики PH1-состояния, причем указанный набор включает следующее: (a) средство для определения присутствия представляющего интерес аналита в сыворотке крови, где указанным представляющим интерес аналитом является один из гликолатов; и (b) средства градуирования. Например, указанным представляющим интерес аналитом является гликолат, при этом указанным средством является siRNA, целенаправленно воздействующая на HAO1.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, можно применять в практическом осуществлении или тестировании iRNA и способов, описанных в настоящем изобретении, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на выдачу патентов, патенты и другие литературные источники, которые упоминаются в данном документе, включены при помощи ссылки в полном объеме. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

Примеры

Материалы и способы.

Следующие материалы и способы использовали в примерах. Используемые в данном документе "HAO" и "GO" используют взаимозаменяемо.

Синтез siRNA.

Однонитевые РНК получали при помощи твердофазного синтеза в масштабе, составляющем 1 мкмоль, с использованием синтезирующего устройства Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Дармштадт, Германия) и стекла с контролируемым размером пор (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Гамбург, Германия) в качестве твердой подложки. РНК и содержащую 2'-О-метил-нуклеотиды РНК получали при помощи твердофазного синтеза с использованием соответствующих фосфорамидатов и 2'-О-метил-фосфорамидатов соответственно (Proligo Biochemie GmbH, Гамбург, Германия). Эти структурные блоки встраивали в выбранные места в пределах последовательности олигорибонуклеотидной цепи при помощи общепринятой фосфорамидитной химии нуклеозидов, как, например, описанной в Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. Фосфотиоатные связи вводили путем замены окисляющего йодного раствора раствором реагента Beaucage (Chruachem Ltd, Глазго, Великобритания) в ацетонитриле (1%). Далее вспомогательные реагенты получали от Mallinckrodt Baker (Грисхайм, Германия).

Снятие защиты и очистку неочищенных олигорибонуклеотидов выполняли при помощи анионообменной HPLC согласно установленным процедурам. Выходы и концентрации определяли по УФ-поглощению раствора соответствующей РНК при длине волны, составляющей 260 нм, при помощи спектрального фотометра (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Унтершлайсхайм, Германия).

Двухнитевую РНК получали при помощи смешивания эквимольного раствора комплементарных нитей в буфере для гибридизации (20 мМ фосфата натрия, pH 6,8; 100 мМ хлорида натрия), затем нагревали на водяной бане при 85-90°C в течение 3 мин и охлаждали до комнатной температуры в течение периода, составляющего 3-4 ч. Раствор с гибридизированной РНК хранили при -20°C до момента использования.

В некоторых случаях дуплекс (dsRNA) синтезировали неоднократно. Разные партии помечали разными добавочными номерами. К примеру, AD-62933.1 и AD-62933.2 представляют собой разные партии одного и того же дуплекса.

Культура клеток и трансфекции.

Использовали первичные гепатоциты макака-крабоеда (PCN) и первичные гепатоциты мыши (PMN). PCN (Celsis, № M003055, серия CBT) или PMN (выделенные непосредственно перед процедурой) трансфицировали путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM с 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл дуплексов siRNA на лунку в 96-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси siRNA добавляли 80 мкл сред для клеток крыс in vitro GRO CP (in vitro Technologies), содержащих $\sim 2 \times 10^4$ клеток PCN или PMN. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты с использованием однократной дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса, составляющей 10 или 20 нМ и 0,1 или 0,2 нМ, и эксперименты для определения эффекта дозы проводили в диапазоне доз с конечной концентрацией дуплекса, составляющей от 10 нМ до 36 фМ, с использованием 86-кратных разведений.

Выделение общей РНК.

Общую РНК выделяли при помощи набора DYNABEADS mRNA Isolation Kit (Invitrogen, № по кат. 610-12). Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем перемешивали в течение 5 мин при 850 об/мин с помощью Eppendorf Thermomixer (скорость перемешивания была одинаковой на всем протяжении процесса). 10 мкл магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и перемешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы удерживали при помощи магнитной установки и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и перемешивали в течение 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и перемешивали в течение 1 мин. Гранулы вновь удерживали и супернатант удаляли. Затем гранулы промывали 150 мкл промывочного буфера В, удерживали и супернатант удаляли. На следующей стадии гранулы промывали 150 мкл элюирующего буфера, удерживали и супернатант удаляли. Гранулы оставляли высохнуть в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и перемешивали в течение 5 мин при 70°C. Гранулы удерживали с помощью магнита в течение 5 мин. Удаляли 40 мкл супернатанта и вносили в другой 96-луночный планшет.

Синтез кДНК.

Синтез кДНК осуществляли с использованием набора ABI High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813) Мастер-микс из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию добавляли в 10 мкл общей РНК. кДНК получали с использованием термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C

10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 с, хранение при 4°C.

ПЦР в режиме реального времени.

2 мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зондов TaqMan для GAPDH мыши (№ по кат. 4352339E, Life Technologies) или специально разработанных зондов TaqMan для GAPDH макака-крабоеда: F - GCATCCTGGGCTACACTGA (SEQ ID NO: 13), R - TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC (SEQ ID NO: 14), зонд - CCAGGTGGTCTCCTCC (SEQ ID NO: 15)), 0,5 мкл HAO1 человека или мыши (HS00213909_M1, который является перекрестнореагирующим с HOA1 макака-крабоеда, Mm 00439249_m1 для анализов с мышинным, life technologies) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 50 384-луночных планшетах (Roche, № по кат. 04887301001). ПЦР в режиме реального времени выполняли в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche) с применением $\Delta\Delta Ct$ (RQ)-анализа. Каждый дуплекс тестировали при двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию оценивали в двух повторностях, если не указано иное в итоговых таблицах.

Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием способа $\Delta\Delta Ct$ и нормализовали относительно анализов, выполненных с клетками, трансфицированными с помощью 10 нМ AD-1955, или ложно-трансфицированными клетками. Значения IC_{50} рассчитывали с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с данными для клеток, трансфицированных AD-1955, или интактных клеток.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой:

СМЫСЛОВАЯ: 5'-cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT-3' (SEQ ID NO: 16) и

АНТИСМЫСЛОВАЯ: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (SEQ ID NO: 17).

Таблица В

Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые
в представлении последовательности нуклеиновой кислоты

Сокращение	Нуклеотид (ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	Бета-L-аденозин-3'-фосфат
Af	2'-Фторадеинозин-3'-фосфат
Afs	2'-Фторадеинозин-3'-фосфотиоат
As	Аденозин-3'-фосфотиоат
C	Цитидин-3'-фосфат
Cb	Бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-Фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-Фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	Цитидин-3'-фосфотиоат
G	Гуанозин-3'-фосфат
Gb	Бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	Бета-L-гуанозин-3'-фосфотиоат
Gf	2'-Фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-Фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	Гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-Метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-Фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-Метилуридин-3'-фосфотиоат
U	Уридин-3'-фосфат
Uf	2'-Фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-Фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	Уридин-3'-фосфотиоат
N	Любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-O-Метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-O-Метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-O-Метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-O-Метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-O-Метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-O-Метилгуанозин-3'-фосфотиоат

t	2'-О-Метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-Метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-Метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-Метилуридин-3'-фосфотиоат
dT	2'-Дезокситимидин
dTs	2'-Дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-Дезоксиуридин
s	Фосфотиоатная связь
L96	N-[Трис (GalNAc-алкил) амидодеканойл]-4- гидроксипролинол-Нур- (GalNAc-алкил) 3
(Aeo)	2'-О-Метоксиэтиладенозин-3'-фосфат
(Aeos)	2'-О-Метоксиэтиладенозин-3'-фосфотиоат
(Geo)	2'-О-Метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-О-Метоксиэтилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Teo)	2'-О-Метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-О-Метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
(m5Ceo)	2'-О-Метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-О-Метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(A3m)	3'-О-Метиладенозин-2'-фосфат
(A3mx)	3'-О-Метилксилофуранозиладенозин-2'-фосфат
(G3m)	3'-О-Метилгуанозин-2'-фосфат
(G3mx)	3'-О-Метилксилофуранозилгуанозин-2'-фосфат
(C3m)	3'-О-Метилцитидин-2'-фосфат
(C3mx)	3'-О-Метилксилофуранозилцитидин-2'-фосфат
(U3m)	3'-О-Метилуридин-2'-фосфат
(U3mx)	3'-О-Метилксилуридин-2'-фосфат
(Chd)	2'-О-Гексадецилцитидин-3'-фосфат
(pshe)	Гидроксиэтилфосфоротиоат
(Uhd)	2'-О-Гексадецилуридин-3'-фосфат
(Tgn)	Тимидин-глицероль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер
(Cgn)	Цитидин-глицероль-нуклеиновая кислота (GNA)
(Chd)	2'-О-Гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Ggn)	2'-О-Гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Agn)	Аденозин-глицероль-нуклеиновая кислота (GNA)
P	5'-фосфат
(m5Cam)	2'-О- (N-Метилацетамид) -5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Cams)	2'-О- (N-Метилацетамид) -5-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
(Tam)	2'-О- (N-Метилацетамид) тимидин-3'-фосфат
(Tams)	2'-О- (N-Метилацетамид) тимидин-3'-фосфоротиоат
(Aam)	2'-О- (N-Метилацетамид) аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-О- (N-Метилацетамид) аденозин-3'-фосфоротиоат
(Gam)	2'-О- (N-Метилацетамид) гуанозин-3'-фосфат
(Gams)	2'-О- (N-Метилацетамид) гуанозин-3'-фосфоротиоат
Y34	Лишенный азотистого основания 2'-О-метил
Y44	2-Гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат

Пример 1. Конструирование, специфичность и прогнозирование эффективности siRNA.

Конструирование siRNA выполняли для идентификации siRNA, целенаправленно воздействующих на транскрипты HAO1 человека, макака-крабоведа, мыши и крысы, аннотированные в базе данных генов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

При конструировании использовали следующие транскрипты из коллекции эталонных последовательностей NCBI: мРНК HAO1 человека (*Homo sapiens*) представляет собой NM_017545.2; мРНК HAO1 макака-крабоведа (*Macaca fascicularis*) представляет собой XM_005568381.1; мРНК HAO1 мыши (*Mus musculus*) представляет собой NM_010403.2; мРНК HAO1 крысы (*Rattus norvegicus*) представляет собой XM_006235096.1.

Вследствие высокого расхождения последовательностей примат/грызун дуплексы siRNA конструировали в нескольких отдельных партиях, в том числе без ограничения партиях, содержащих дуплексы, соответствующие только транскриптам человека и яванского макака; только транскриптам человека, яванского макака, мыши и крысы и только транскриптам мыши и крысы. Все дуплексы siRNA конструировали так, чтобы они имели 100% идентичность с приведенными транскриптом человека и транскриптами других видов, рассмотренными в каждой партии конструирования (выше).

Специфичность всех возможных олигонуклеотидов из 19 нуклеотидов прогнозировали исходя из каждой последовательности. Затем отбирали кандидатные олигомеры из 19 нуклеотидов, у которых отсутствовали повторения длиннее 7 нуклеотидов. Эти siRNA, 1069 кандидатных человека/яванского макака, 184 человека/яванского макака/мыши/крысы и 579 мыши/крысы, использовали при обширных поисках в отношении соответствующих транскриптом (определенные как набор из записей NM и XM в пределах наборов эталонных последовательностей человека, яванского макака, мыши или крысы в NCBI) с применением исчерпывающего алгоритма "грубой силы", включенного в скрипт на питоне "BruteForce.py". Далее скрипт разбирал выравнивания транскрипт-олигонуклеотид с получением балла, основанного на положении и количестве ошибочных спариваний между siRNA и любым потенциальным "нецелевым" транскриптом. 'Нецелевой' балл взвешивали для выделения различий в "затравочном" участке siRNA в положениях 2-9 от 5'-конца молекулы. Каждой паре олигонуклеотид-транскрипт из поиска "грубой силы" присваивали балл для ошибочного спаривания путем суммирования отдельных баллов для ошибочного спаривания; ошибочные спаривания в положениях 2-9 определяли как 2,8, ошибочные спаривания в положениях сайта расщепления 10-11 определяли как 1,2 и ошибочные спаривания в участке 12-19 определяли как 1,0. Дополнительное нецелевое прогнозирование выполняли путем сравнения встречаемости гептамеров и октамеров, полученных из трех отличных полученных из затравки гексамеров каждого олигонуклеотида. Гексамеры из положений 2-7 по отношению к 5'-началу использовали для создания 2 гептамеров и одного октамера. Гептамер1 создавали путем добавления А на 3'-конец гексамера; гептамер2 создавали путем добавления А на 5'-конец гексамера; октамер создавали путем добавления А как на 5'-конец, так и на 3'-конец гексамера. Предварительно рассчитывали встречаемость октамеров и гептамеров в 3'UTRome человека, яванского макака, мыши или крысы (определенные как подпоследовательности транскриптом из базы данных эталонных последовательностей в NCBI, где конец кодирующего участка, "CDS", является четко определенным). Встречаемость октамеров нормализовали по отношению к встречаемости гептамеров с использованием медианного значения из диапазона встречаемостей октамеров. Затем рассчитывали "mirSeedScore" путем вычисления суммы $((3 \times \text{нормализованное подсчитанное число для октамеров}) + (2 \times \text{подсчитанное число для гептамера 2}) + (1 \times \text{подсчитанное число для гептамера 1}))$.

Обоим нитям siRNA присваивали категорию специфичности согласно рассчитанным баллам: балл выше 3 квалифицировали как высокоспецифичная, равный 3 как специфичная и от 2,2 до 2,8 квалифицировали как умеренно специфичная. siRNA упорядочивали по специфичности антисмысловой нити. Затем отбирали дуплексы из наборов вариантов человека/яванского макака и мыши/крысы, у антисмысловых олигонуклеотидов которых отсутствовала GC в первом положении, отсутствовал G в обоих положениях 13 и 14, и присутствовали 3 или более U или A в затравочном участке (характеристики дуплексов с высокой прогнозированной эффективностью). Подобным образом отбирали дуплексы из наборов вариантов человека/яванского макака/мыши и человека/яванского макака/мыши/крысы, в которых присутствовали 3 или более U или A в затравочном участке.

Кандидатные конъюгированные с GalNAc дуплексы, 21 и 23 нуклеотида в длину для смысловой и антисмысловой нитей соответственно, конструировали путем удлинения антисмысловых олигонуклеотидов из 19 нуклеотидов 4 дополнительными нуклеотидами в 3'-направлении (сохраняя полную комплементарность с целевым транскриптом). Смысловую нить описывали как обратную комплементарную последовательность первых 21 нуклеотида антисмыслового олигомера из 23 нуклеотидов. Выбирали такие дуплексы, которые сохраняли полные соответствия ко всем выбранным транскриптам видов на протяжении всех 23 нуклеотидов.

Антисмысловые нити, которые содержали C или G в первом положении с 5'-конца, модифицировали так, чтобы они имели U в первом положении с 5'-конца, если только осуществление этого не приводило к ряду из 4 или более смежных U (5'→3'), в таком случае их модифицировали так, чтобы они имели A в первом положении с 5'-конца. Смысловые нити, подлежащие спариванию в дуплексы с этими антисмысловыми нитями "с UA заменой", соответственно модифицировали для сохранения комплементарности. Примеры, описанные ниже, включают в себя AD-62989 и AD-62993.

Синтезировали олигонуклеотиды из 21/23 нуклеотидов, являющиеся в общей сложности 31 смысловой и 31 антисмысловой нитями, полученными из транскрипта человека/яванского макака, 19 смысловыми и 19 антисмысловыми нитями, полученными из транскрипта человека/яванского макака/мыши/крысы, и 48 смысловыми и 48 антисмысловыми нитями, полученными из транскрипта мыши/крысы, и составляли в конъюгированные с GalNAc дуплексы.

Последовательности смысловой и антисмысловой нитей модифицированных дуплексов показаны в табл. 1, а последовательности смысловой и антисмысловой нитей немодифицированных дуплексов показаны в табл. 2.

Таблица 1а

Модифицированные последовательности НАО1

Название дуплекса	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO:	Вид
AD-62933	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	18	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	89	Hs/Mm
AD-62939	UfsusUfuCfaAfuGfGfGfuGfuCfcUfaGfgAfL96	19	usCfscUfaGfgAfcAfcccAfuUfgAfaAfasgsu	90	Hs/Mm
AD-62944	GfsasAfaGfuCfaUfCfGfaCfaAfgAfcAfuUfL96	20	asAfsuGfuCfuUfgUfcgaUfgAfcUfuUfcsasc	91	Hs/Mm
AD-62949	UfscsAfuCfGfAfcAfAfGfaCfaUfuGfgUfgAfL96	21	usCfscAfcAfaUfgUfcuuGfuCfGfAfuGfascsu	92	Hs/Mm
AD-62954	UfsusUfcAfaUfgGfGfUfgUfcCfuAfgGfaAfL96	22	usUfscCfuAfgGfaCfaccCfaUfuGfaAfasasg	93	Hs/Mm
AD-62959	AfsasUfgGfgUfgUfCfCfuAfgGfaAfcCfuUfL96	23	asAfsuGfuUfcCfuAfggaCfaCfcCfaUfusgsa	94	Hs/Mm
AD-62964	GfsasCfaGfuGfCfAfcAfaUfuUfuCfcAfL96	24	usGfsgAfaAfaUfaUfuguGfcAfcUfgUfcsasg	95	Hs/Mm
AD-62969	AfscsUfuUfuCfaAfUfGfgGfuGfuCfcUfaAfL96	25	usUfscAfgAfcAfcCfcauUfgAfaAfaGfuscsa	96	Hs/Mm
AD-62934	AfsasGfuCfaUfcGfAfcAfaUfgAfcAfuUfgAfL96	26	usCfscAfuGfuCfuUfgucGfaUfgAfcUfususc	97	Hs/Mm
AD-62940	AfsusCfGfAfcAfaGfAfcAfuUfgGfgUfgAfgAfL96	27	usCfscCfaCfcAfaUfgucUfuGfuCfGfAfggsa	98	Hs/Mm
AD-62945	GfsgsGfaGfaAfaGfGfUfgUfuCfaAfgAfuAfL96	28	usAfsuCfuUfgAfaCfaccUfuUfcUfcCfcsasc	99	Hs/Mm
AD-62950	CfsusUfuUfcAfaUfGfGfgUfgUfcCfuAfgAfL96	29	usCfscAfgGfaCfaCfccaUfuGfaAfaAfgsusc	100	Hs/Mm
AD-62955	UfscsAfaUfgGfgUfGfUfcCfuAfgGfaAfcAfL96	30	usGfsuUfcCfuAfgGfacaCfcCfaUfuGfasasa	101	Hs/Mm

AD-62960	UfsusGfaCfuUfuUfCfAfaU fgGfgUfgUfcAfL96	31	usGfsaCfaCfcCfaUfugaAfa AfgUfcAfasasa	102	Hs/Mm
AD-62965	AfsasAfgUfcAfuCfGfAfaA faGfaCfaUfuAfL96	32	usAfsaUfgUfcUfuGfucgAfu GfaCfuUfuscsa	103	Hs/Mm
AD-62970	CfsasGfgGfgGfaGfAfAfaG fgUfgUfuCfaAfL96	33	usUfsgAfaCfaCfcUfuucUfc CfcCfcUfgsgsa	104	Hs/Mm
AD-62935	CfsasUfuGfgUfgAfGfGfaA faAfaUfcCfuUfL96	34	asAfsGfaUfuUfuUfccuCfa CfcAfaUfgsusc	105	Hs/Mm
AD-62941	AfscsAfuUfgGfuGfAfGfgA faAfaAfuCfcUfL96	35	asGfsgAfuUfuUfuCfcucAfc CfaAfuGfuscsu	106	Hs/Mm
AD-62946	AfsgsGfgGfgAfgAfAfAfgG fuGfuUfcAfaAfL96	36	usUfsuGfaAfcAfcCfuuuCfu CfcCfcCfusgsg	107	Hs/Mm
AD-62951	AfsusGfgUfgGfuAfAfUfuU fgUfgAfuUfuUfL96	37	asAfsaAfuCfaCfaAfauuAfc CfaCfcAfuscsc	108	Hs
AD-62956	GfsasCfuUfgCfaUfCfCfuG fgAfaAfuAfuAfL96	38	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfg CfaAfgUfcscsa	109	Hs
AD-62961	GfsgsAfaGfgGfaAfGfGfuA fgAfaGfuCfuUfL96	39	asAfsGafcUfuCfuAfccuUfc CfcUfuCfcsasc	110	Hs
AD-62966	UfsgsUfcUfuCfuGfUfUfuA fgAfuUfuCfcUfL96	40	asGfsgAfaAfuCfuAfaacAfg AfaGfaCfasgsg	111	Hs
AD-62971	CfsusUfuGfgCfuGfUfUfuC fcAfaGfaUfcUfL96	41	asGfsaUfcUfuGfgAfaacAfg CfcAfaAfgsgsa	112	Hs
AD-62936	AfsasUfgUfgUfuUfGfGfgC faAfcGfuCfaUfL96	42	asUfsgAfcGfuUfgCfccaAfa CfaCfaUfususu	113	Hs
AD-62942	UfsgsUfgAfcUfgUfGfGfaC faCfcCfcUfuAfL96	43	usAfsaGfgGfgUfgUfccuAfa GfuCfaCfasasa	114	Hs
AD-62947	GfsasUfgGfgGfuGfCfCfaG fcUfaCfuAfuUfL96	44	asAfsuAfgUfaGfcUfggcAfc CfcCfaUfcscsa	115	Hs
AD-62952	GfsasAfaAfuGfuGfUfUfuG fgGfcAfaCfGfUfL96	45	asCfsgUfuGfcCfcAfaacAfc AfuUfuUfcsasa	116	Hs
AD-62957	GfsgsCfuGfuUfuCfCfAfaG faUfcUfgAfcAfL96	46	usGfsuCfaGfaUfcUfuggAfa AfcAfgCfcsasa	117	Hs
AD-62962	UfscsCfaAfcAfaAfAfUfaG fcCfaCfcCfcUfL96	47	asGfsgGfgUfgGfcUfauuUfu GfuUfgGfasasa	118	Hs
AD-62967	GfsusCfuUfcUfgUfUfUfaG faUfuUfcCfuUfL96	48	asAfsGfaAfaUfcUfaaaCfa GfaAfgAfcasg	119	Hs
AD-62972	UfsgsGfaAfgGfgAfAfGfgU faGfaAfgUfcUfL96	49	asGfsaCfuUfcUfaCfcuuCfc CfuUfcCfascsa	120	Hs
AD-62937	UfscsCfuUfuGfgCfUfGfuU fuCfcAfaGfaUfL96	50	asUfscUfuGfgAfaAfcagCfc AfaAfgGfasusu	121	Hs
AD-62943	CfsasUfcUfcUfcAfGfCfuG fgGfaUfgAfuAfL96	51	usAfsuCfaUfcCfcAfgcuGfa GfaGfaUfgsgsg	122	Hs

AD-62948	GfsgsGfgUfgCfcAfGfCfuA fcUfaUfuGfaUfL96	52	asUfscAfaUfaGfuAfgcuGfg CfaCfcCfcsasu	123	Hs
AD-62953	AfsusGfuGfuUfuGfGfGfCfA faCfGfUfcAfuAfL96	53	usAfsuGfaCfGfUfuGfcccAfa AfcAfcAfususu	124	Hs
AD-62958	CfsusGfuUfuAfgAfUfUfuC fcUfuAfaGfaAfL96	54	usUfscUfuAfaGfgAfaauCfu AfaAfcAfgsasa	125	Hs
AD-62963	AfsgsAfaAfgAfaAfUfGfgA fcUfuGfcAfuAfL96	55	usAfsuGfcAfaGfuCfcuUfu CfuUfuCfusasg	126	Hs
AD-62968	GfscsAfuCfcUfgGfAfAfaU faUfaUfuAfaAfL96	56	usUfsuAfaUfaUfaUfuucCfa GfgAfuGfcsasa	127	Hs
AD-62973	CfscsUfgUfcAfgAfCfCfaU fgGfgAfaCfuAfL96	57	usAfsuGfuCfcCfaUfgguCfu GfaCfaGfgscsu	128	Hs
AD-62938	AfsasAfcAfuGfgUfGfUfgG faUfgGfgAfuAfL96	58	usAfsuCfcCfaUfcCfacaCfc AfuGfuUfusasa	129	Hs
AD-62974	CfsusCfaGfgAfuGfAfAfaA faUfuUfuGfaAfL96	59	usUfscAfaAfaUfuUfuucAfu CfcUfgAfgsusu	130	Hs
AD-62978	CfsasGfcAfuGfuAfUfUfaC fuUfgAfcAfaAfL96	60	usUfsuGfuCfaAfgUfaauAfc AfuGfcUfgsasa	131	Hs
AD-62982	UfsasUfgAfaCfaAfCfAfuG fcUfaAfaUfcAfL96	61	usGfsaUfuUfaGfcAfuguUfg UfuCfaUfasasu	132	Hs
AD-62986	AfsusAfuAfuCfcAfAfAfuG fuUfuUfaGfgAfL96	62	usCfscUfaAfaAfcAfuuuGfg AfuAfuAfususc	133	Hs
AD-62990	CfscsAfgAfuGfgAfAfGfcU fgUfaUfcCfaAfL96	63	usUfsgGfaUfaCfaGfcuuCfc AfuCfuGfgsasa	134	Hs
AD-62994	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuG fgAfaAfuAfuAfL96	64	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfg AfaAfgUfcsasa	135	Hs
AD-62998	CfscsCfcGfgCfuAfAfUfuU fgUfaUfcAfaUfL96	65	asUfsuGfaUfaCfaAfauuAfg CfcGfgGfgsgsa	136	Hs
AD-63002	UfsusAfaAfcAfuGfGfCfuU fgAfaUfgGfgAfL96	66	usCfscCfaUfuCfaAfgccAfu GfuUfuAfascsa	137	Hs
AD-62975	AfsasUfgUfgUfuUfAfGfaC faAfcGfuCfaUfL96	67	asUfsgAfcGfuUfgUfcuaAfa CfaCfaUfususu	138	Mm
AD-62979	AfscsUfaAfaGfgAfAfGfaA fuUfcCfGfGfuUfL96	68	asAfsuGfuCfaAfuUfcuuCfc UfuUfaGfusasu	139	Mm
AD-62983	UfsasUfaUfcCfaAfAfUfgU fuUfuAfgGfaUfL96	69	asUfscCfuAfaAfaCfaauUfg GfaUfaUfasusu	140	Mm
AD-62987	GfsusGfcGfgAfaAfGfGfCfA fcUfgAfuGfuUfL96	70	asAfsuGfuCfaGfuGfcccUfu CfcGfcAfcscsc	141	Mm
AD-62991	UfsasAfaAfcAfgUfGfGfuU fcUfuAfaAfuUfL96	71	asAfsuUfuAfaGfaAfccaCfu GfuUfuUfasasa	142	Mm
AD-62995	AfsusGfaAfaAfaUfUfUfuG faAfaCfcAfgUfL96	72	asCfsuGfgUfuUfcAfaaaUfu UfuUfcAfuscsc	143	Mm

AD-62999	AfsasCfaAfaAfuAfGfCfaA fuCfcCfuUfuUfL96	73	asAfsaAfgGfgAfuUfgcuAfu UfuUfgUfugsgsg	144	Mm
AD-63003	CfsusGfaAfaCfaGfAfUfcU fgUfcGfaCfuUfL96	74	asAfsGfGfaCfaGfaucUfg UfuUfcAfgscsa	145	Mm
AD-62976	UfsusGfuUfgCfaAfAfGfgG fcAfuUfuUfgAfL96	75	usCfsaAfaAfuGfcCfcuuUfg CfaAfcAfasusu	146	Mm
AD-62980	CfsusCfaUfuGfuUfUfAfuU faAfcCfuGfuAfL96	76	usAfsCfGfgUfaAfuAaAfc AfaUfgAfgsas	147	Mm
AD-62984	CfsasAfcAfaAfaUfAfGfcA faUfcCfcUfuUfL96	77	asAfsaGfgGfaUfuGfcuaUfu UfuGfuUfgsgsa	148	Mm
AD-62992	CfsasUfuGfuUfuUfUfAfa fcCfuGfuAfuUfL96	78	asAfsuAfcAfgGfuUfaaAfa AfcAfaUfgsasg	149	Mm
AD-62996	UfsasUfcAfgCfuGfGfGfaA fgAfuAfuCfaAfL96	79	usUfsgAfuAfuCfuUfcccAfg CfuGfaUfasgsa	150	Mm
AD-63000	UfsgsUfcCfuAfgGfAfAfcC fuUfuUfaGfaAfL96	80	usUfscUfaAfaAfgGfuucCfu AfgGfaCfascsc	151	Mm
AD-63004	UfscsCfaAfcAfaAfAfUfaG fcAfaUfcCfcUfL96	81	asGfsgGfaUfuGfcUfaaUfu GfuUfgGfasasa	152	Mm
AD-62977	GfsgsUfgUfgCfGfAfAfaG fgCfaCfuGfaUfL96	82	asUfscAfgUfgCfcUfuucCfg CfaCfaCfcscsc	153	Mm
AD-62981	UfsusGfaAfaCfcAfGfUfaC fuUfuAfuCfaUfL96	83	asUfsgAfuAfaAfgUfacuGfg UfuUfcAfasasa	154	Mm
AD-62985	UfsasCfuUfcCfaAfAfGfuC fuAfuAfuAfuAfL96	84	usAfsuAfuAfuAfgAfcuuUfg GfaAfgUfascsu	155	Mm
AD-62989	UfscsCfuAfgGfaAfCfCfuU fuUfaGfaAfaUfL96	85	asUfsuUfcUfaAfaAfgguUfc CfuAfgGfascsa	156	Mm
AD-62993	CfsusCfcUfgAfgGfAfAfaA fuUfuUfgGfaAfL96	86	usUfscCfaAfaAfuUfuucCfu CfaGfgAfgsasa	157	Mm
AD-62997	GfscsUfcCfGfAfaUfGfuU fgCfuGfaAfaUfL96	87	asUfsuUfcAfgCfaAfcuUfc CfGfAfgfcsasu	158	Mm
AD-63001	GfsusGfuUfuGfuGfGfGfgA fgAfcCfaAfuAfL96	88	usAfsuUfgGfuCfuCfcccAfc AfaAfcAfcasg	159	Mm

Таблица 1b

Дополнительные модифицированные последовательности НАО1

Название дуплекса	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO:	Вид
AD- 62933.2	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	18	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	89	Hs/M m
AD- 62939.2	UfsusUfuCfaAfuGfGfGfuGf uCfcUfaGfgAfL96	19	usCfscUfaGfgAfcAfcccA fuUfgAfaAfasgsu	90	Hs/M m

AD- 62944.2	GfsasAfaGfuCfaUfCfGfaCf aAfgAfcAfuUfL96	20	asAfsuGfuCfuUfgUfcgaU fgAfcUfuUfcsasc	91	Hs/M m
AD- 62949.2	UfscsAfuCfGfAfcAfAfGfaCf aUfuGfgUfgAfL96	21	usCfsaCfcAfaUfgUfcuG fuCfGfAfuGfascsu	92	Hs/M m
AD- 62954.2	UfsusUfcAfaUfgGfGfUfgUf cCfuAfgGfaAfL96	22	usUfscCfuAfgGfaCfaccC faUfuGfaAfasasg	93	Hs/M m
AD- 62959.2	AfsasUfgGfgUfgUfCfCfuAf gGfaAfcCfuUfL96	23	asAfsGfGfuUfcCfuAfggaC faCfcCfaUfusgsa	94	Hs/M m
AD- 62964.2	GfsasCfaGfuGfcAfCfAfaUf aUfuUfuCfcAfL96	24	usGfsgAfaAfaUfaUfuguG fcAfcUfgUfcsasg	95	Hs/M m
AD- 62969.2	AfscsUfuUfuCfaAfUfGfgGf uGfuCfcUfaAfL96	25	usUfsaGfgAfcAfcCfcuU fgAfaAfaGfuscsa	96	Hs/M m
AD- 62934.2	AfsasGfuCfaUfcGfAfcAfaAf gAfcAfuUfgAfL96	26	usCfsaAfuGfuCfuUfgucG faUfgAfcUfususc	97	Hs/M m
AD- 62940.2	AfsusCfGfAfcAfaGfAfcAfuUf uGfgUfgAfgAfL96	27	usCfsuCfaCfcAfaUfgucU fuGfuCfGfAfggsa	98	Hs/M m
AD- 62945.2	GfsgsGfaGfaAfaGfGfUfgUf uCfaAfgAfuAfL96	28	usAfsuCfuUfgAfaCfaccU fuUfcUfcCfcscsc	99	Hs/M m
AD- 62950.2	CfsusUfuUfcAfaUfGfGfgUf gUfcCfuAfgAfL96	29	usCfsuAfgGfaCfaCfccaU fuGfaAfaAfgsusc	100	Hs/M m
AD- 62955.2	UfscsAfaUfgGfgUfGfUfcCf uAfgGfaAfcAfL96	30	usGfsuUfcCfuAfgGfacaC fcCfaUfuGfasasa	101	Hs/M m
AD- 62960.2	UfsusGfaCfuUfuUfcAfaUf gGfgUfgUfcAfL96	31	usGfsaCfaCfcCfaUfugaA faAfgUfcAfasasa	102	Hs/M m
AD- 62965.2	AfsasAfgUfcAfuCfGfAfcAf aGfaCfaUfuAfL96	32	usAfsaUfgUfcUfuGfucgA fuGfaCfuUfuscsa	103	Hs/M m
AD- 62970.2	CfsasGfgGfgGfaGfAfAfaGf gUfgUfuCfaAfL96	33	usUfsgAfaCfaCfcUfuucU fcCfcCfcUfgsgsa	104	Hs/M m
AD- 62935.2	CfsasUfuGfgUfgAfGfGfaAf aAfaUfcCfuUfL96	34	asAfsGfGfaUfuUfuUfcuU faCfcAfaUfgsusc	105	Hs/M m
AD- 62941.2	AfscsAfuUfgGfuGfAfGfgAf aAfaAfuCfcUfL96	35	asGfsgAfuUfuUfuCfcucA fcCfaAfuGfuscsu	106	Hs/M m
AD- 62946.2	AfsgsGfgGfgAfgAfAfAfgGf uGfuUfcAfaAfL96	36	usUfsuGfaAfcAfcCfuucU fuCfcCfcCfusgsg	107	Hs/M m
AD- 62951.2	AfsusGfgUfgGfuAfAfUfuUf gUfgAfuUfuUfL96	37	asAfsaAfuCfaCfaAfaucA fcCfaCfcAfuscsc	108	Hs
AD- 62956.2	GfsasCfuUfgCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	38	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgCfaAfgUfcsa	109	Hs
AD- 62961.2	GfsgsAfaGfgGfaAfGfGfuAf gAfaGfuCfuUfL96	39	asAfsGfAfcUfuCfuAfcuU fcCfcUfuCfcsasc	110	Hs
AD- 62966.2	UfsgsUfcUfuCfuGfUfUfuAf gAfuUfuCfcUfL96	40	asGfsgAfaAfuCfuAfaacA fgAfaGfaCfasgsg	111	Hs

AD- 62971.2	CfsusUfuGfgCfuGfUfUfuCf cAfaGfaUfcUfL96	41	asGfsaUfcUfuGfgAfaacA fgCfcAfaAfgsgsa	112	Hs
AD- 62936.2	AfsasUfgUfgUfuUfGfGfgCf aAfcGfuCfaUfL96	42	asUfsgAfcGfuUfgCfccaA faCfaCfaUfususu	113	Hs
AD- 62942.2	UfsgsUfgAfcUfgUfGfGfaCf aCfcCfcUfuAfL96	43	usAfsaGfgGfgUfgUfccaC faGfuCfaCfasasa	114	Hs
AD- 62947.2	GfsasUfgGfgGfuGfCfCfaGf cUfaCfuAfuUfL96	44	asAfsuAfgUfaGfcUfggcA fcCfcCfaUfscsa	115	Hs
AD- 62952.2	GfsasAfaAfuGfuGfUfUfuGf gGfcAfaCfUfL96	45	asCfsgUfuGfcCfcAfaacA fcAfuUfuUfcsasa	116	Hs
AD- 62957.2	GfsgsCfuGfuUfuCfCfaAfaGf aUfcUfgAfcAfL96	46	usGfsuCfaGfaUfcUfuggA faAfcAfgCfcsasa	117	Hs
AD- 62962.2	UfscsCfaAfcAfaAfAfUfaGf cCfaCfcCfcUfL96	47	asGfsgGfgUfgGfcUfaauU fuGfuUfgGfasasa	118	Hs
AD- 62967.2	GfsusCfuUfcUfgUfUfaGf aUfuUfcCfuUfL96	48	asAfsGfaAfaUfcUfaaaC faGfaAfgAfcasg	119	Hs
AD- 62972.2	UfsgsGfaAfgGfgAfAfGfgUf aGfaAfgUfcUfL96	49	asGfsaCfuUfcUfaCfcuuc fcCfuUfcCfascsa	120	Hs
AD- 62937.2	UfscsCfuUfuGfgCfuUfGfuUf uCfcAfaGfaUfL96	50	asUfscUfuGfgAfaAfcagC fcAfaAfgGfasusu	121	Hs
AD- 62943.2	CfsasUfcUfcUfcAfGfCfuGf gGfaUfgAfuAfL96	51	usAfsuCfaUfcCfcAfgcuG faGfaGfaUfgsgsg	122	Hs
AD- 62948.2	GfsgsGfgUfgCfcAfGfCfuAf cUfaUfuGfaUfL96	52	asUfscAfaUfaGfuAfgcuG fgCfaCfcCfcsasu	123	Hs
AD- 62953.2	AfsusGfuGfuUfuGfGfGfaAf aCfgUfcAfuAfL96	53	usAfsuGfaCfgUfuGfcccA faAfcAfcAfususu	124	Hs
AD- 62958.2	CfsusGfuUfuAfgAfUfUfuCf cUfuAfaGfaAfL96	54	usUfscUfuAfaGfgAfaauC fuAfaAfcAfgsasa	125	Hs
AD- 62963.2	AfsgsAfaAfgAfaAfUfGfgAf cUfuGfcAfuAfL96	55	usAfsuGfcAfaGfuCfcuU fuCfuUfuCfusag	126	Hs
AD- 62968.2	GfscsAfuCfcUfgGfAfAfaUf aUfaUfuAfaAfL96	56	usUfsuAfaUfaUfaUfuucC faGfgAfuGfcsasa	127	Hs
AD- 62973.2	CfscsUfgUfcAfgAfCfCfaUf gGfgAfaCfuAfL96	57	usAfsGfuCfcCfaUfgguC fuGfaCfaGfgscsu	128	Hs
AD- 62938.2	AfsasAfcAfuGfgUfGfUfgGf aUfgGfgAfuAfL96	58	usAfsuCfcCfaUfcCfacaC fcAfuGfuUfusasa	129	Hs
AD- 62974.2	CfsusCfaGfgAfuGfAfAfaAf aUfuUfuGfaAfL96	59	usUfscAfaAfaUfuUfuucA fuCfcUfgAfgsususu	130	Hs
AD- 62978.2	CfsasGfcAfuGfuAfUfUfaCf uUfgAfcAfaAfL96	60	usUfsuGfuCfaAfgUfaauA fcAfuGfcUfgsasa	131	Hs
AD- 62982.2	UfsasUfgAfaCfaAfCfaAfuGf cUfaAfaUfcAfL96	61	usGfsaUfuUfaGfcAfuguU fgUfuCfaUfasasu	132	Hs

AD- 62986.2	AfsusAfuAfuCfcAfAfAfUfGf uUfuUfaGfgAfL96	62	usCfscUfaAfaAfcAfuuuG fgAfuAfuAfususc	133	Hs
AD- 62990.2	CfscsAfgAfuGfgAfAfGfcUf gUfaUfcCfaAfL96	63	usUfsgGfaUfaCfaGfcuuC fcAfuCfuGfgsasa	134	Hs
AD- 62994.2	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	64	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	135	Hs
AD- 62998.2	CfscsCfcGfgCfuAfAfUfuUf gUfaUfcAfaUfL96	65	asUfsuGfaUfaCfaAfauuA fgCfcGfgGfgsgsa	136	Hs
AD- 63002.2	UfsusAfaAfcAfuGfGfCfuUf gAfaUfgGfgAfL96	66	usCfscCfaUfuCfaAfgccA fuGfuUfuAfascsa	137	Hs
AD- 62975.2	AfsasUfgUfgUfuUfAfGfaCf aAfcGfuCfaUfL96	67	asUfsgAfcGfuUfgUfcuaA faCfaCfaUfususu	138	Mm
AD- 62979.2	AfscsUfaAfaGfgAfAfGfaAf uUfcCfgGfuUfL96	68	asAfscCfgGfaAfuUfcuuC fcUfuUfaGfusasu	139	Mm
AD- 62983.2	UfsasUfaUfcCfaAfAfUfgUf uUfuAfgGfaUfL96	69	asUfscCfuAfaAfaCfauuU fgGfaUfaUfasusu	140	Mm
AD- 62987.2	GfsusGfcGfgAfaAfGfGfcAf cUfgAfuGfuUfL96	70	asAfscAfuCfaGfuGfccuU fuCfcGfcAfcsasc	141	Mm
AD- 62991.2	UfsasAfaAfcAfgUfGfGfuUf cUfuAfaAfuUfL96	71	asAfsuUfuAfaGfaAfccaC fuGfuUfuUfasasa	142	Mm
AD- 62995.2	AfsusGfaAfaAfaUfUfuGf aAfaCfcAfgUfL96	72	asCfsuGfgUfuUfcAfaaaU fuUfuUfcAfuscsc	143	Mm
AD- 62999.2	AfsasCfaAfaAfuAfGfCfaAf uCfcCfuUfuUfL96	73	asAfsaAfgGfgAfuUfgcuA fuUfuUfgUfusgsg	144	Mm
AD- 63003.2	CfsusGfaAfaCfaGfAfUfcUf gUfcGfaCfuUfL96	74	asAfsgUfcGfaCfaGfaucU fgUfuUfcAfgscsa	145	Mm
AD- 62976.2	UfsusGfuUfgCfaAfAfGfgGf cAfuUfuUfgAfL96	75	usCfsaAfaAfuGfcCfcuuU fgCfaAfcAfasusu	146	Mm
AD- 62980.2	CfsusCfaUfuGfuUfUfaUf aAfcCfuGfuAfL96	76	usAfscAfgGfuUfaAfuaaA fcAfaUfgAfgsasusu	147	Mm
AD- 62984.2	CfsasAfcAfaAfaUfAfGfcAf aUfcCfcUfuUfL96	77	asAfsaGfgGfaUfuGfcuaU fuUfuGfuUfgsgsa	148	Mm
AD- 62992.2	CfsasUfuGfuUfuAfUfUfaAf cCfuGfuAfuUfL96	78	asAfsuAfcAfgGfuUfaauA faAfcAfaUfgsasg	149	Mm
AD- 62996.2	UfsasUfcAfgCfuGfGfGfaAf gAfuAfuCfaAfL96	79	usUfsgAfuAfuCfuUfcccA fgCfuGfaUfasgsa	150	Mm
AD- 63000.2	UfsgsUfcCfuAfgGfAfAfCf uUfuUfaGfaAfL96	80	usUfscUfaAfaAfgGfuucC fuAfgGfaCfascsc	151	Mm
AD- 63004.2	UfscsCfaAfcAfaAfAfUfaGf cAfaUfcCfcUfL96	81	asGfsgGfaUfuGfcUfaauU fuGfuUfgGfasasa	152	Mm
AD- 62977.2	GfsgsUfgUfgCfgGfAfAfGf gCfaCfuGfaUfL96	82	asUfscAfgUfgCfcUfuucC fgCfaCfaCfcscsc	153	Mm

AD- 62981.2	UfsusGfaAfaCfcAfGfUfaCf uUfuAfuCfaUfL96	83	asUfsgAfuAfaAfgUfacuG fgUfuUfcAfasasa	154	Mm
AD- 62985.2	UfsasCfuUfcCfaAfAfGfuCf uAfuAfuAfuAfL96	84	usAfsuAfuAfuAfgAfcuuU fgGfaAfgUfascsu	155	Mm
AD- 62989.2	UfscsCfuAfgGfaAfCfCfuUf uUfaGfaAfaUfL96	85	asUfsuUfcUfaAfaAfgguU fcCfuAfgGfascsa	156	Mm
AD- 62993.2	CfsusCfcUfgAfgGfAfAfaAf uUfuUfgGfaAfL96	86	usUfscCfaAfaAfuUfuucC fuCfaGfgAfgsasa	157	Mm
AD- 62997.2	GfscsUfcCfGfaAfUfGfuUf gCfuGfaAfaUfL96	87	asUfsuUfcAfgCfaAfcuuU fcCfGfaGfcsasu	158	Mm
AD- 63001.2	GfsusGfuUfuGfuGfGfGfGfAf gAfcCfaAfuAfL96	88	usAfsuUfgGfuCfuCfcccA fcAfaAfcAfcasg	159	Mm
AD- 62933.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	160	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	277	
AD- 65630.1	Y44gsasAfuGfuGfaAfAfGfu CfaUfcGfaCfaAfL96	161	PusUfsgUfcGfaUfgAfcuu UfcAfcAfuUfcsusg	278	
AD- 65636.1	gsasauguGfaAfAfGfucauUf gacaaL96	162	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	279	
AD- 65642.1	gsasauguGfaAfAfGfucaucg acaaL96	163	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	280	
AD- 65647.1	gsasauguGfaaAfGfucaucga caaL96	164	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	281	
AD- 65652.1	gsasauguGfaaaGfucaucGfa caaL96	165	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	282	
AD- 65657.1	gsasaugugaaaGfucaucGfac aaL96	166	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	283	
AD- 65662.1	gsasauguGfaaaGfucaucgac aaL96	167	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	284	
AD- 65625.1	AfsusGfuGfaAfAfGfuCfaUf cGfaCfaAfL96	168	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfususc	285	
AD- 65631.1	asusguGfaAfAfGfucaucgac aaL96	169	usUfsgucGfaugacuuUfcA fcaususc	286	
AD- 65637.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	170	usUfsgucGfaUfgAfcuuUf cAfcuuucsusg	287	
AD- 65643.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	171	usUfsgucGfaUfgAfcuuUf cAfcuuucsusg	288	
AD- 65648.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	172	usUfsgucGfaugacuuUfcA fcuuucsusg	289	
AD- 65653.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	173	usUfsgucGfaugacuuUfca cauucsusg	290	
AD- 65658.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	174	usUfsgucgaugacuuUfcac auucsusg	291	

AD- 65663.1	gsasauguGfaAfAfGfucaucg acaaL96	175	usUfsgucGfaUfgAfcuuUf cAfcuuucsusg	292	
AD- 65626.1	gsasauguGfaAfAfGfucaucg acaaL96	176	usUfsgucGfaUfgGfacuuUf cAfcuuucsusg	293	
AD- 65638.1	gsasauguGfaaAfGfucaucga caaL96	177	usUfsgucGfaUfgAfcuuUf cAfcuuucsusg	294	
AD- 65644.1	gsasauguGfaaAfGfucaucga caaL96	178	usUfsgucGfaUfgGfacuuUf cAfcuuucsusg	295	
AD- 65649.1	gsasauguGfaaAfGfucaucga caaL96	179	usUfsgucGfaugacuuUfca fcuuucsusg	296	
AD- 65654.1	gsasaugugaaagucau (Cgn) g acaaL96	180	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	297	
AD- 65659.1	gsasaugdTgaaagucau (Cgn) gacaaL96	181	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	298	
AD- 65627.1	gsasaugdGugaaadGucau (Cgn)) gacaaL96	182	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	299	
AD- 65633.1	gsasaugdTgaaadGucau (Cgn)) gacaaL96	183	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	300	
AD- 65639.1	gsasaugudGaaadGucau (Cgn)) gacaaL96	184	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	301	
AD- 65645.1	gsasaugugaaadGucaucdGac aaL96	185	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	302	
AD- 65650.1	gsasaugugaaadGucaucdTac aaL96	186	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	303	
AD- 65655.1	gsasaugugaaadGucaucY34a caaL96	187	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	304	
AD- 65660.1	gsasaugugaaadGucadTcdTa caaL96	188	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	305	
AD- 65665.1	gsasaugugaaadGucaucdGad CaaL96	189	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	306	
AD- 65628.1	gsasaugugaaadGucaucdTad CaaL96	190	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	307	
AD- 65634.1	gsasaugugaaadGucaucY34a dCaaL96	191	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuU fcAfcAfuUfcsusg	308	
AD- 65646.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	192	usdTsgucgaugdAcuudTca cauucsusg	309	
AD- 65656.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	193	usUsgucgaugacuudTcaca uucsusg	310	
AD- 65661.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	194	usdTsgucdGaugacuudTca cauucsusg	311	
AD- 65666.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	195	usUsgucdGaugacuudTcac auucsusg	312	

AD- 65629.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	196	usdTsgucgaugacuudTcdA cauucsusg	313	
AD- 65635.1	GfsasAfuGfuGfaAfAfGfuCf aUfcGfaCfaAfL96	197	usdTsgucdGaugacuudTcd Acauucsusg	314	
AD- 65641.1	gsasaugugaaadGucau (Cgn) gacaaL96	198	usdTsgucgaugdAcuudTca cauucsusg	315	
AD- 62994.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	199	usAfsuAfuUfuCfcAfpgaU fgAfaAfgUfcscsa	316	
AD- 65595.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaAf auauaL96	200	usAfsuAfuUfuCfcAfpgaU fgAfaAfgUfcscsa	317	
AD- 65600.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaa uauaL96	201	usAfsuAfuUfuCfcAfpgaU fgAfaAfgUfcscsa	318	
AD- 65610.1	gsascuuuCfaucCfuggaAf auaL96	202	usAfsuAfuUfuCfcAfpgaU fgAfaAfgUfcscsa	319	
AD- 65615.1	gsascuuucaucCfuggaAfua uaL96	203	usAfsuAfuUfuCfcAfpgaU fgAfaAfgUfcscsa	320	
AD- 65620.1	gsascuuuCfaucCfuggaaua uaL96	204	usAfsuAfuUfuCfcAfpgaU fgAfaAfgUfcscsa	321	
AD- 65584.1	CfsusUfuCfaUfCfCfuGfgAf aAfuAfuAfL96	205	usAfsuAfuUfuCfcAfpgaU fgAfaAfgsusc	322	
AD- 65590.1	csusuuCfaUfCfCfuggaaua uaL96	206	usAfsuauUfuccaggaUfgA faagsusc	323	
AD- 65596.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	207	usAfsuauUfuCfcAfpgaUf gAfaagucscsa	324	
AD- 65601.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	208	usAfsuauUfuCfcAfpgaUf gAfaagucscsa	325	
AD- 65606.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	209	usAfsuauUfuccaggaUfgA faagucscsa	326	
AD- 65611.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	210	usAfsuauUfuccaggaUfga aagucscsa	327	
AD- 65616.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	211	usAfsuauuuccaggaUfgaa agucscsa	328	
AD- 65621.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaa uauaL96	212	usAfsuauUfuCfcAfpgaUf gAfaagucscsa	329	
AD- 65585.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaa uauaL96	213	usAfsuauUfuCfcAfpgaUf gAfaagucscsa	330	
AD- 65591.1	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaa uauaL96	214	usAfsuauUfuccaggaUfgA faagucscsa	331	
AD- 65597.1	gsascuuuCfauCfCfuggaau auaL96	215	usAfsuauUfuCfcAfpgaUf gAfaagucscsa	332	
AD- 65602.1	gsascuuuCfauCfCfuggaau auaL96	216	usAfsuauUfuCfcAfpgaUf gAfaagucscsa	333	

AD- 65607.1	gsascuuuCfauCfCfuggaaau aual96	217	usAfsuauUfuccaggaUfgA faagucscsa	334	
AD- 65612.1	gsascuuuauccuggae (Agn) uual96	218	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	335	
AD- 65622.1	gsascuuuauccuggae (Agn)) uual96	219	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	336	
AD- 65586.1	gsascudTucaucdCuggaa (Ag n) uual96	220	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	337	
AD- 65592.1	gsascuudTcaucdCuggaa (Ag n) uual96	221	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	338	
AD- 65598.1	gsascuuudCaucdCuggaa (Ag n) uual96	222	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	339	
AD- 65603.1	gsascuuuauccuggaadAua ual96	223	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	340	
AD- 65608.1	gsascuuuauccuggaadTua ual96	224	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	341	
AD- 65613.1	gsascuuuauccuggaeY34u aual96	225	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	342	
AD- 65618.1	gsascuuuauccuggaadAadTu aual96	226	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	343	
AD- 65623.1	gsascuuuauccuggaadTud Aual96	227	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	344	
AD- 65587.1	gsascuuuauccuggae (Agn)) udAual96	228	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	345	
AD- 65593.1	gsascuudTcaucdCuggaadAu dAual96	229	usAfsuAfuUfuCfcAfggaU fgAfaAfgUfcscsa	346	
AD- 65599.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	230	usdAsuauuuccdAggadTga aagucscsa	347	
AD- 65604.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	231	usdAsuauuuccaggadTgaa agucscsa	348	
AD- 65609.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	232	usAsuauuuccaggadTgaaa gucscsa	349	
AD- 65614.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	233	usdAsuauuuccaggadTga aagucscsa	350	
AD- 65619.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	234	usAsuauuuccaggadTgaa agucscsa	351	
AD- 65624.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	235	usdAsuauuuccaggadTgdA aagucscsa	352	
AD- 65588.1	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGf gAfaAfuAfuAfL96	236	usdAsuauuuccaggadTgd Aaagucscsa	353	
AD- 65594.1	gsascuuuauccuggae (Agn)) uual96	237	usdAsuauuuccdAggadTga aagucscsa	354	

AD- 68309.1	asgsaaagGfuGfUfUfcaagau gucaL96	238	usGfsacaUfcUfUfgaacAf cCfuuuucuscsc	355	
AD- 68303.1	csasuccuGfgAfAfAfuaauuu aacuL96	239	asGfsuuaAfuaUfUfauuuCf cAfggaugsasa	356	
AD- 65626.5	gsasauguGfaAfAfGfucaucg acaaL96	240	usUfsgucGfaUfGfacuuUf cAfcauucsusg	357	
AD- 68295.1	asgsugcaCfaAfUfAfuuuucc cauaL96	241	usAfsuggGfaAfAfauauUf gUfgcacusgsu	358	
AD- 68273.1	gsasaaguCfaUfCfGfacaaga cauuL96	242	asAfsuguCfuUfGfucgaUf gAfcuuucsasc	359	
AD- 68297.1	asasugugAfaAfGfUfcaucga caaaL96	243	usUfsuguCfgAfUfgacuUf uCfacauuscsu	360	
AD- 68287.1	csusggaaAfuaUfUfAfuaacu guuaL96	244	usAfsacaGfuUfAfauauAf uUfuccagsgsa	361	
AD- 68300.1	asusuuucCfcAfUfCfuguaau auuuL96	245	asAfsauaAfuaUfCfagauGf gGfaaausasu	362	
AD- 68306.1	usgsucguUfcUfUfUfuccaac aaaaL96	246	usUfsuugUfuGfGfaaaaGf aAfcgacascsc	363	
AD- 68292.1	asusccugGfaAfAfUfauauua acuaL96	247	usAfsuguAfaUfAfuaauUf cCfaggausgsa	364	
AD- 68298.1	gscsaauuUfgAfGfAfggugau gauaL96	248	usAfsucaUfcAfCfcucuCf aAfaaugcscsc	365	
AD- 68277.1	csasggggGfaGfAfAfaggugu ucaaL96	249	usUfsgaaCfaCfCfuuucUf cCfcccugsgsa	366	
AD- 68289.1	gsgsaaaAfuaUfUfUfaacugu uaaaL96	250	usUfsuaaCfaGfUfuaauAf uAfuuuccsasg	367	
AD- 68272.1	csasuuggUfgAfGfGfaaaaau ccuuL96	251	asAfsuggaUfuUfUfuccuUf aCfcaaugusc	368	
AD- 68282.1	gsgsgagaAfaGfGfUfgucaa gauaL96	252	usAfsucuUfgAfAfcaccUf uUfcuccscsc	369	
AD- 68285.1	gsgscuuUfuGfAfGfagguga ugauL96	253	asUfscauCfaCfCfucucAf aAfaugccscsu	370	
AD- 68290.1	usascaaaGfgGfUfGfucguuc uuuuL96	254	asAfsaagAfaCfGfacacCf cUfuuguasusu	371	
AD- 68296.1	usgsggauCfuUfGfGfugucga aucaL96	255	usGfsauuCfgAfCfaccaAf gAfucccasusu	372	
AD- 68288.1	csusgacaGfuGfCfAfcaauau uuuaL96	256	usAfsaaaUfaUfUfgugcAf cUfgucagsasu	373	
AD- 68299.1	csasgugCfcAfAfUfauuuuc ccauL96	257	asUfsgggAfaAfAfuaauGf uGfcacugsusc	374	
AD- 68275.1	ascsuuuCfaAfUfGfgguguc cuaaL96	258	usUfsaggAfcAfCfccauUf gAfaaaguscsc	375	

AD- 68274.1	ascsauugGfuGfAfGfgaaaaa uccuL96	259	asGfsgauUfuUfUfccucAf cCfaauguscsu	376	
AD- 68294.1	ususgcuuUfuGfAfCfuuuuca augaL96	260	usCfsauuGfaAfAfagucAf aAfagcaasusg	377	
AD- 68302.1	csasuuuGfaGfAfGfgugaug augaL96	261	usCfsaucAfuCfAfccucUf cAfaaaugscsc	378	
AD- 68279.1	ususgacuUfuUfCfAfaugggu gucaL96	262	usGfsacaCfcCfAfuugaAf aAfgucaasasa	379	
AD- 68304.1	csgsacuuCfuGfUfUfuagga cagaL96	263	usCfsuguCfcUfAfaaacAf gAfagucgsasc	380	
AD- 68286.1	csuscugaGfuGfGfGfugccag aauaL96	264	usAfsuucUfgGfCfaccAf cUfcagagscsc	381	
AD- 68291.1	gsgsgugcCfaGfAfAfugugaa aguaL96	265	usAfsuuUfcAfCfauucUf gGfcacccsasc	382	
AD- 68283.1	uscsaaugGfgUfGfUfccuagg aacaL96	266	usGfsuucCfuAfGfgacaCf cCfauugasasa	383	
AD- 68280.1	asasagucAfuCfGfAfcaagac auuaL96	267	usAfsaugUfcUfUfgucgAf uGfacuuuscsa	384	
AD- 68293.1	asusuuugAfgAfGfGfugauga ugcaL96	268	usGfscacuCfaUfCfaccuUf uCfaaaugscsc	385	
AD- 68276.1	asuscgacAfaGfAfCfauuggu gagaL96	269	usCfsucaCfcAfAfugucUf uGfucgausgsa	386	
AD- 68308.1	gsgsugccAfgAfAfUfgugaaa gucaL96	270	usGfsacuUfuCfAfcauuCf uGfgcaccscsa	387	
AD- 68278.1	gsascaguGfcAfCfAfauuuu uccaL96	271	usGfsgaaAfaUfAfuuguGf cAfcugucsasg	388	
AD- 68307.1	ascsaaagAfgAfCfAfcugugc agaaL96	272	usUfscugCfaCfAfguguCf uCfuuuuguscsa	389	
AD- 68284.1	ususucaAfuGfGfGfuguccu aggaL96	273	usCfscuaGfgAfCfaccAf uUfgaaaasgsu	390	
AD- 68301.1	cscsguuUfcAfAfGfauugca caguL96	274	asCfsuguCfaGfAfucuuGf gAfaacggscsc	391	
AD- 68281.1	asgsggggAfgAfAfAfgguguu caaaL96	275	usUfsugaAfcAfCfcuuUf uCfccccusgsg	392	
AD- 68305.1	asgsucaUfcAfCfAfagacau ugguL96	276	asCfscuaUfgUfCfuuguCf gAfugacususu	393	

Таблица 2а

Немодифицированные последовательности НАО1 (человека и человека/мыши)

Название дуплекса	SEQ ID NO:	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой нити	Положение в NM_017545.2
AD-62933	394	GAAUGUGAAAGUCAUC GACAA	443	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD-62939	395	UUUUCAAUGGGUGUCC UAGGA	444	UCCUAGGACACCCAUUGA AAAGU	1302-1324
AD-62944	396	GAAAGUCAUCGACAAG ACAUU	445	AAUGUCUUGUCGAUGACU UUCAC	1078-1100
AD-62949	397	UCAUCGACAAGACAUU GGUGA	446	UCACCAUGUCUUGUCGA UGACU	1083-1105
AD-62954	398	UUUCAUUGGGUGUCCU AGGAA	447	UCCUAGGACACCCAUUG AAAAG	1303-1325
AD-62959	399	AAUGGGUGUCCUAGGA ACCUU	448	AAGGUUCCUAGGACACCC AUUGA	1307-1329
AD-62964	400	GACAGUGCACAUAUU UUGCA	449	UGGAAAAUAUUGUGCACU GUCAG	1134- 1156_G21A
AD-62969	401	ACUUUUCAAUGGGUGU CCUAA	450	UUAGGACACCCAUUGAAA AGUCA	1300- 1322_G21A
AD-62934	402	AAGUCAUCGACAAGAC AUUGA	451	UCAUGUCUUGUCGAUGA CUUUC	1080- 1102_G21A
AD-62940	403	AUCGACAAGACAUUGG UGAGA	452	UCUCACCAUGUCUUGUC GAUGA	1085- 1107_G21A
AD-62945	404	GGGAGAAAGGUGUUA AGAUU	453	UAUCUUGAACACCUUUCU CCCCC	996- 1018_G21A
AD-62950	405	CUUUUCAUUGGGUGUC CUAGA	454	UCUAGGACACCCAUUGAA AAGUC	1301- 1323_G21A
AD-62955	406	UCAUUGGGUGUCCUAG GAACA	455	UGUUCUAGGACACCCAU UGAAA	1305- 1327_G21A
AD-62960	407	UUGACUUUUCUAAUGGG UGUCA	456	UGACACCCAUUGAAAAGU CAAAA	1297- 1319_G21A
AD-62965	408	AAAGUCAUCGACAAGA CAUUA	457	UAAUGUCUUGUCGAUGAC UUUCA	1079- 1101_G21A
AD-62970	409	CAGGGGGAGAAAGGUG UUCAA	458	UUGAACACCUUUCUCCCC CUGGA	992-1014
AD-62935	410	CAUUGGUGAGGAAAAA UCCUU	459	AAGGAUUUUUCCUCACCA AUGUC	1095-1117
AD-62941	411	ACAUUGGUGAGGAAAA AUCCU	460	AGGAUUUUUCCUCACCAA UGUCU	1094-1116
AD-62946	412	AGGGGGAGAAAGGUGU UCAAA	461	UUUGAACACCUUUCUCCC CCUGG	993- 1015_G21A
AD-62974	413	CUCAGGAUGAAAAAUU UUGAA	462	UUCAAAAUUUUCAUCCU GAGUU	563-585
AD-62978	414	CAGCAUGUAUUACUUG ACAAA	463	UUUGUCAAGUAUACAUG CUGAA	1173-1195

AD-62982	415	UAUGAACAAUGCUA AAUCA	464	UGAUUUAGCAUGUUGUUC AUAAU	53-75
AD-62986	416	AUAUAUCCAAUGUUU UAGGA	465	UCCUAAAACAUUUGGAUA UAUUC	1679-1701
AD-62990	417	CCAGAUGGAAGCUGUA UCCAA	466	UUGGAUACAGCUUCCAUC UGGAA	156-178
AD-62994	418	GACUUUCAUCCUGGAA AUAUA	467	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD-62998	419	CCCCGGCUAAUUGUA UCAAU	468	AUUGAUACAAUUGCCG GGGGA	29-51
AD-63002	420	UUAACAUGGCUUGAA UGGGA	469	UCCCAUUCAAGCCAUGUU UAACA	765-787
AD-62975	421	AAUGUGUUUAGACAAC GUCAU	470	AUGACGUUGUCUAAACAC AUUUU	1388-1410
AD-62979	422	ACUAAAGGAAGAAUUC CGGUU	471	AACCGGAUUUCUCCUUU AGUAU	1027-1049
AD-62983	423	UAUAUCCAAUGUUUU AGGAU	472	AUCCUAAAACAUUUGGAU AUAUU	1680-1702
AD-62987	424	GUGCGGAAAGGCACUG AUGUU	473	AACAUCAGUGCCUUUCCG CACAC	902-924
AD-62991	425	UAAAACAGUGGUUCUU AAAUU	474	AAUUUAAGAACCACUGUU UUAAA	1521-1543
AD-62995	426	AUGAAAAUUUUGAAA CCAGU	475	ACUGGUUUCAAAAUUUUU CAUCC	569-591
AD-62999	427	AACAAAAUAGCAAUC CUUUU	476	AAAAGGGAUUGCUAUUUU GUUGG	1264-1286
AD-63003	428	CUGAAACAGAUUCUGUC GACUU	477	AAGUCGACAGAUUCUGUU CAGCA	195-217
AD-62976	429	UUGUUGCAAAGGGCAU UUUGA	478	UCAAAAUGCCCUUUGCAA CAAUU	720-742
AD-62980	430	CUCAUUGUUUAUUAAC CUGUA	479	UACAGGUUAAUAAACAAU GAGAU	1483-1505
AD-62984	431	CAACAAAAUAGCAAUC CCUUU	480	AAAGGGAUUGCUAUUUUG UUGGA	1263-1285
AD-62992	432	CAUUGUUUAUUAACCU GUAUU	481	AAUACAGGUUAAUAAACA AUGAG	1485-1507
AD-62996	433	UAUCAGCUGGGAAGAU AUCAA	482	UUGAUUUCUCCCAGCUG AUAGA	670-692
AD-63000	434	UGUCCUAGGAACCUUU UAGAA	483	UUCUAAAAGGUCCUAGG ACACC	1313-1335
AD-63004	435	UCCAACAAAAUAGCAA UCCCU	484	AGGGAUUGCUAUUUUGUU GGAAA	1261-1283

AD-62977	436	GGUGUGCGGAAAGGCA CUGAU	485	AUCAGUGCCUUUCCGCAC ACCCC	899-921
AD-62981	437	UUGAAACCAGUACUUU AUCAU	486	AUGAUAAAGUACUGGUUU CAAAA	579-601
AD-62985	438	UACUUCCAAAGUCUAU AUAUA	487	UAUAUAUAGACUUUGGAA GUACU	75-97_G21A
AD-62989	439	UCCUAGGAACCUUUUA GAAAU	488	AUUUCUAAAAGGUUCCUA GGACA	1315- 1337_G21U
AD-62993	440	CUCUGAGGAAAAUUU UGGAA	489	UCCAAAAUUUCCUCAG GAGAA	603-625_G21A
AD-62997	441	GCUCGGAAUGUUGCU GAAAU	490	AUUUCAGCAACAUCGG AGCAU	181-203_C21U
AD-63001	442	GUGUUUGUGGGGAGAC CAAUA	491	UAUUGGUCUCCCCACAA CACAG	953-975_C21A

Таблица 2b

Немодифицированные последовательности НАО1 (мышь)

Название дуплекса	SEQ ID NO:	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой нити	Положение в NM_010403. 2
AD-62951	492	AUGGUGGUAUUUGUG AUUUU	514	AAAAUCACAAAUUACCAC CAUCC	1642-1664
AD-62956	493	GACUUGCAUCCUGGAA AUAUA	515	UAUAUUUCCAGGAUGCAA GUCCA	1338-1360
AD-62961	494	GGAAGGAAGGUAGAA GUCUU	516	AAGACUUCUACCUUCCCU UCCAC	864-886
AD-62966	495	UGUCUUCUGUUUAGAU UCCCU	517	AGGAAUUCUAAACAGAAG ACAGG	1506-1528
AD-62971	496	CUUUGGCUGUUUCCAA GAUCU	518	AGAUCUUGGAAACAGCCA AAGGA	1109-1131
AD-62936	497	AAUGUGUUUGGGCAAC GUCAU	519	AUGACGUUGCCCAAACAC AUUUU	1385-1407
AD-62942	498	UGUGACUGUGGACACC CCUUA	520	UAAGGGGUGUCCACAGUC ACAAA	486-508
AD-62947	499	GAUGGGUGCCAGCUA CUAUU	521	AAUAGUAGCUGGCACCCC AUCCA	814-836
AD-62952	500	GAAAAUGUGUUUGGGC AACGU	522	ACGUUGCCCAAACACAUU UUCAA	1382-1404
AD-62957	501	GGCUGUUUCCAAGAUC UGACA	523	UGUCAGAUCUUGGAAACA GCCAA	1113-1135
AD-62962	502	UCCAACAAAAUAGCCA	524	AGGGGUGGCUAUUUUGUU	1258-1280

		CCCCU		GGAAA	
AD-62967	503	GUCUUCUGUUUAGAUU UCCUU	525	AAGGAAAUCUAAACAGAA GACAG	1507-1529
AD-62972	504	UGGAAGGGAAGGUAGA AGUCU	526	AGACUUCUACCUUCCCUU CCACA	863-885
AD-62937	505	UCCUUUGGCUGUUUCC AAGAU	527	AUCUUGGAAACAGCCAAA GGAUU	1107-1129
AD-62943	506	CAUCUCUCAGCUGGGA UGAUA	528	UAUCAUCCAGCUGAGAG AUGGG	662-684
AD-62948	507	GGGGUCCAGCUACUA UUGAU	529	AUCAAUAGUAGCUGGCAC CCCAU	817-839
AD-62953	508	AUGUGUUUGGGCAACG UCAUA	530	UAUGACGUUGCCCAAACA CAUUU	1386- 1408_C21A
AD-62958	509	CUGUUUAGAUUCCUU AAGAA	531	UUCUUAAGGAAAUCUAAA CAGAA	1512- 1534_C21A
AD-62963	510	AGAAAGAAAUGGACUU GCAUA	532	UAUGCAAGUCCAUUUCUU UCUAG	1327- 1349_C21A
AD-62968	511	GCAUCCUGGAAAUAUA UUAAA	533	UUUAAUAUAUUUCCAGGA UGCAA	1343- 1365_C21A
AD-62973	512	CCUGUCAGACCAUGGG AACUA	534	UAGUCCCAUGGUCUGAC AGGCU	308- 330_G21A
AD-62938	513	AAACAUGGUGUGGAUG GGAUA	535	UAUCCCAUCCACACCAUG UUUAA	763- 785_C21A

Таблица 2с

Дополнительные немодифицированные последовательности НАО1

Название дуплекса	SEQ ID NO:	Последовательность смысловой нити	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой нити	Положение в NM_017545.2
AD- 62933.2	394	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	443	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 62939.2	395	UUUUCAUUGGGUGUCCUA GGA	444	UCCUAGGACACCCAUUGA AAAGU	1302-1324
AD- 62944.2	396	GAAAGUCAUCGACAAGAC AUU	445	AAUGUCUUGUCGAUGACU UUCAC	1078-1100
AD- 62949.2	397	UCAUCGACAAGACAUUGG UGA	446	UCACCAAUGUCUUGUCGA UGACU	1083-1105
AD- 62954.2	398	UUUCAUUGGGUGUCCUAG GAA	447	UUCUAGGACACCCAUUG AAAAG	1303-1325
AD- 62959.2	399	AAUGGGUGUCCUAGGAAC CUU	448	AAGGUCCUAGGACACCC AUUGA	1307-1329
AD-	400	GACAGUGCACAAUAUUUU	449	UGGAAAAUAUUGGCACU	1134-

62964.2		CCA		GUCAG	1156_C21A
AD- 62969.2	401	ACUUUUCAAUGGGUGUCC UAA	450	UUAGGACACCCAUUGAAA AGUCA	1300- 1322_G21A
AD- 62934.2	402	AAGUCAUCGACAAGACAU UGA	451	UCAAUGUCUUGUCGAUGA CUUUC	1080- 1102_G21A
AD- 62940.2	403	AUCGACAAGACAUUGGUG AGA	452	UCUCACCAUGUCUUGUC GAUGA	1085- 1107_G21A
AD- 62945.2	404	GGGAGAAAGGUGUUAAG AUA	453	UAUCUUGAACCCUUUCU CCCCC	996- 1018_G21A
AD- 62950.2	405	CUUUUCAAUGGGUGUCCU AGA	454	UCUAGGACACCCAUUGAA AAGUC	1301- 1323_G21A
AD- 62955.2	406	UCAAUGGGUGUCCUAGGA ACA	455	UGUUCUAGGACACCCAU UGAAA	1305- 1327_C21A
AD- 62960.2	407	UUGACUUUCAAUGGGUG UCA	456	UGACACCCAUUGAAAAGU CAAAA	1297- 1319_C21A
AD- 62965.2	408	AAAGUCAUCGACAAGACA UUA	457	UAAUGUCUUGUCGAUGAC UUUCA	1079- 1101_G21A
AD- 62970.2	409	CAGGGGGAGAAAGGUGUU CAA	458	UUGAACCCUUUCUCCCC CUGGA	992-1014
AD- 62935.2	410	CAUUGGUGAGGAAAAUC CUU	459	AAGGAUUUUUCCUCACCA AUGUC	1095-1117
AD- 62941.2	411	ACAUUGGUGAGGAAAAU CCU	460	AGGAUUUUUCCUCACCAA UGUCU	1094-1116
AD- 62946.2	412	AGGGGGAGAAAGGUGUUC AAA	461	UUUGAACCCUUUCUCCC CCUGG	993- 1015_G21A
AD- 62974.2	413	CUCAGGAUGAAAAUUUU GAA	462	UUCAAAAUUUUCAUCCU GAGUU	563-585
AD- 62978.2	414	CAGCAUGUAUUACUUGAC AAA	463	UUUGUCAAGUAAUACAUG CUGAA	1173-1195
AD- 62982.2	415	UAUGAACACAUGCUGAAA UCA	464	UGAUUUAGCAUGUUGUUC AUAAU	53-75
AD- 62986.2	416	AUAUAUCCAAAUGUUUUA GGA	465	UCCUAAAACAUUUGGAUA UAUUC	1679-1701
AD- 62990.2	417	CCAGAUGGAAGCUGUAUC CAA	466	UUGGAUACAGCUUCCAUC UGGAA	156-178
AD- 62994.2	418	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	467	UAUAAUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 62998.2	419	CCCCGGCUAAUUUGUAUC AAU	468	AUUGAUACAAAUAGCCG GGGGA	29-51
AD- 63002.2	420	UUAACAUGGCUUGAAUG GGA	469	UCCCAUUCAGCCAUGUU UAACA	765-787
AD- 421		AAUGUGUUUAGACAACGU	470	AUGACGUUGUCUAAACAC	1388-1410

62975.2		CAU		AUUUU	
AD- 62979.2	422	ACUAAAGGAAGAAUCCG GUU	471	AACCGGAAUUCUCCUUU AGUAU	1027-1049
AD- 62983.2	423	UAUAUCCAAUGUUUUAG GAU	472	AUCCUAAAACAUUUGGAU AUAUU	1680-1702
AD- 62987.2	424	GUGCGGAAAGGCACUGAU GUU	473	AACAUCAGUGCCUUUCCG CACAC	902-924
AD- 62991.2	425	UAAAACAGUGGUUCUAA AUU	474	AAUUUAAGAACCACUGUU UUAAA	1521-1543
AD- 62995.2	426	AUGAAAAAUUUUGAAACC AGU	475	ACUGGUUUCAAAAUUUU CAUCC	569-591
AD- 62999.2	427	AACAAAAUAGCAAUCCCU UUU	476	AAAAGGGAUUGCUAUUUU GUUGG	1264-1286
AD- 63003.2	428	CUGAAACAGAUUCUGUGA CUU	477	AAGUCGACAGAUUGUUU CAGCA	195-217
AD- 62976.2	429	UUGUUGCAAAGGGCAUUU UGA	478	UCAAAAUGCCCUUUGCAA CAAUU	720-742
AD- 62980.2	430	CUCAUUGUUUAUUAACCU GUA	479	UACAGGUUAAUAAACAAU GAGAU	1483-1505
AD- 62984.2	431	CAACAAAAUAGCAAUCCC UUU	480	AAAGGGAUUGCUAUUUUG UUGGA	1263-1285
AD- 62992.2	432	CAUUGUUUAUUAACCUGU AUU	481	AAUACAGGUUAAUAAACA AUGAG	1485-1507
AD- 62996.2	433	UAUCAGCUGGGAAGAUAU CAA	482	UUGAUUUCUCCCAGCUG AUAGA	670-692
AD- 63000.2	434	UGUCCUAGGAACCUUUUA GAA	483	UUCUAAAAGGUUCCUAGG ACACC	1313-1335
AD- 63004.2	435	UCCAACAAAUAAGCAAUC CCU	484	AGGGAUUGCUAUUUUGUU GGAAA	1261-1283
AD- 62977.2	436	GGUGUGCGGAAAGGCACU GAU	485	AUCAGUGCCUUUCCGCAC ACCCC	899-921
AD- 62981.2	437	UUGAAACCAGUACUUUAU CAU	486	AUGAUAAAGUACUGGUUU CAAAA	579-601
AD- 62985.2	438	UACUCCAAAGUCUAUAU AUA	487	UAUAUAUAGACUUUGGAA GUACU	75-97_G21A
AD- 62989.2	439	UCCUAGGAACCUUUUAGA AAU	488	AUUUCUAAAAGGUUCCUA GGACA	1315- 1337_G21U
AD- 62993.2	440	CUCCUGAGGAAAAUUUUG GAA	489	UUCCAAAAUUUCCUCAG GAGAA	603- 625_G21A
AD- 62997.2	441	GCUCCGGAUUGUUGCUGA AAU	490	AUUUCAGCAACAUUCCGG AGCAU	181- 203_C21U
AD-	442	GUGUUUGUGGGGAGACCA	491	UAUUGGUCUCCCCACAAA	953-

63001.2		AUA		CACAG	975_C21A
AD- 62951.2	492	AUGGUGGUAUUUGUGAU UUU	514	AAAAUCACAAUUACCAC CAUCC	1642-1664
AD- 62956.2	493	GACUUGCAUCCUGGAAAU AUA	515	UAUAUUUCCAGGAUGCAA GUCCA	1338-1360
AD- 62961.2	494	GGAAGGGAAGGUAGAAGU CUU	516	AAGACUUCUACCUUCCCU UCCAC	864-886
AD- 62966.2	495	UGUCUUCUGUUUAGAUUU CCU	517	AGGAAAUCAAACAGAAG ACAGG	1506-1528
AD- 62971.2	496	CUUUGGCUGUUUCCAAGA UCU	518	AGAUCUUGGAAACAGCCA AAGGA	1109-1131
AD- 62936.2	497	AAUGUGUUUGGGCAACGU CAU	519	AUGACGUUGCCCAAACAC AUUUU	1385-1407
AD- 62942.2	498	UGUGACUGUGGACACCCC UUA	520	UAAGGGGUGUCCACAGUC ACAAA	486-508
AD- 62947.2	499	GAUGGGGUGCCAGCUACU AUU	521	AAUAGUAGCUGGCACCCC AUCCA	814-836
AD- 62952.2	500	GAAAAUGUGUUUGGGCAA CGU	522	ACGUUGCCCAAACACAUU UUCAA	1382-1404
AD- 62957.2	501	GGCUGUUUCCAAGAUCUG ACA	523	UGUCAGAUCUUGGAAACA GCCAA	1113-1135
AD- 62962.2	502	UCCAACAAAAUAGCCACC CCU	524	AGGGGUGGCUAUUUUGUU GGAAA	1258-1280
AD- 62967.2	503	GUCUUCUGUUUAGAUUUC CUU	525	AAGGAAAUCUAAACAGAA GACAG	1507-1529
AD- 62972.2	504	UGGAAGGGAAGGUAGAAG UCU	526	AGACUUCUACCUUCCCUU CCACA	863-885
AD- 62937.2	505	UCCUUUGGCUGUUUCCAA GAU	527	AUCUUGGAAACAGCCAAA GGAUU	1107-1129
AD- 62943.2	506	CAUCUCUCAGCUGGGAUG AUA	528	UAUCAUCCAGCUGAGAG AUGGG	662-684
AD- 62948.2	507	GGGUGCCAGCUACUAUU GAU	529	AUCAAUAGUAGCUGGCAC CCCAU	817-839
AD- 62953.2	508	AUGUGUUUGGGCAACGUC AUA	530	UAUGACGUUGCCCAAACA CAUUU	1386- 1408_C21A
AD- 62958.2	509	CUGUUUAGAUUUCUUA GAA	531	UUCUUAAGGAAAUUAAA CAGAA	1512- 1534_C21A
AD- 62963.2	510	AGAAAGAAUUGGACUUGC AUA	532	UAUGCAAGUCCAUUUCUU UCUAG	1327- 1349_C21A
AD- 62968.2	511	GCAUCCUGGAAAUUAUU AAA	533	UUUAUAUAUUUCCAGGA UGCAA	1343- 1365_C21A
AD- 512		CCUGUCAGACCAUGGGAA	534	UAGUCCCAUGGUCUGAC	308-

62973.2		CUA		AGGCU	330_G21A
AD- 62938.2	513	AAACAUGGUGUGGAUGGG AUA	535	UAUCCCAUCCACACCAUG UUUAA	763- 785_C21A
AD- 62933.1	536	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	653	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65630.1	537	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	654	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65636.1	538	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	655	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65642.1	539	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	656	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65647.1	540	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	657	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65652.1	541	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	658	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65657.1	542	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	659	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65662.1	543	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	660	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65625.1	544	AUGUGAAAGUCAUCGACA A	661	UUGUCGAUGACUUUCACA UUC	1072-1094
AD- 65631.1	545	AUGUGAAAGUCAUCGACA A	662	UUGUCGAUGACUUUCACA UUC	1072-1094
AD- 65637.1	546	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	663	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65643.1	547	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	664	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65648.1	548	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	665	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65653.1	549	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	666	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65658.1	550	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	667	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65663.1	551	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	668	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65626.1	552	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	669	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65638.1	553	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	670	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65644.1	554	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	671	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65644.1	555	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	672	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094

65649.1		CAA		UUCUG	
AD- 65654.1	556	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	673	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65659.1	557	GAAUGTGAAAGUCAUCGA CAA	674	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65627.1	558	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	675	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65633.1	559	GAAUGTGAAAGUCAUCGA CAA	676	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65639.1	560	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	677	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65645.1	561	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	678	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65650.1	562	GAAUGUGAAAGUCAUCTA CAA	679	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65655.1	563	GAAUGUGAAAGUCAUCAC AA	680	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65660.1	564	GAAUGUGAAAGUCATCTA CAA	681	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65665.1	565	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	682	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65628.1	566	GAAUGUGAAAGUCAUCTA CAA	683	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65634.1	567	GAAUGUGAAAGUCAUCAC AA	684	UUGUCGAUGACUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65646.1	568	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	685	UTGUCGAUGACUUTCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65656.1	569	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	686	UUGUCGAUGACUUTCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65661.1	570	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	687	UTGUCGAUGACUUTCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65666.1	571	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	688	UUGUCGAUGACUUTCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65629.1	572	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	689	UTGUCGAUGACUUTCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65635.1	573	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	690	UTGUCGAUGACUUTCACA UUCUG	1072-1094
AD- 65641.1	574	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	691	UTGUCGAUGACUUTCACA UUCUG	1072-1094
AD- 62994.1	575	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	692	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD-	576	GACUUUCAUCCUGGAAAU	693	UAUAUUUCCAGGAUGAAA	1341-1363

65595.1		AUA		GUCCA	
AD- 65600.1	577	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	694	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65610.1	578	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	695	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65615.1	579	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	696	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65620.1	580	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	697	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65584.1	581	CUUUCAUCCUGGAAAU A	698	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUC	1341-1361
AD- 65590.1	582	CUUUCAUCCUGGAAAU A	699	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUC	1341-1361
AD- 65596.1	583	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	700	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65601.1	584	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	701	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65606.1	585	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	702	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65611.1	586	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	703	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65616.1	587	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	704	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65621.1	588	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	705	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65585.1	589	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	706	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65591.1	590	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	707	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65597.1	591	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	708	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65602.1	592	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	709	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65607.1	593	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	710	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65612.1	594	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	711	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65622.1	595	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	712	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65586.1	596	GACUTUCAUCCUGGAAAU AUA	713	UAUAUUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65597.1	597	GACUUTCAUCCUGGAAAU	714	UAUAUUUCCAGGAUGAAA	1341-1363

65592.1		AUA		GUCCA	
AD- 65598.1	598	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	715	UAUAAUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65603.1	599	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	716	UAUAAUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65608.1	600	GACUUUCAUCCUGGAATU AUA	717	UAUAAUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65613.1	601	GACUUUCAUCCUGGAAUA UA	718	UAUAAUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65618.1	602	GACUUUCAUCCUGGAATU AUA	719	UAUAAUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65623.1	603	GACUUUCAUCCUGGAATU AUA	720	UAUAAUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65587.1	604	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	721	UAUAAUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65593.1	605	GACUUTCAUCCUGGAAAU AUA	722	UAUAAUUCCAGGAUGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65599.1	606	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	723	UAUAAUUCCAGGATGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65604.1	607	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	724	UAUAAUUCCAGGATGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65609.1	608	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	725	UAUAAUUCCAGGATGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65614.1	609	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	726	UAUAUTUCCAGGATGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65619.1	610	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	727	UAUAUTUCCAGGATGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65624.1	611	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	728	UAUAAUUCCAGGATGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65588.1	612	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	729	UAUAUTUCCAGGATGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 65594.1	613	GACUUUCAUCCUGGAAAU AUA	730	UAUAAUUCCAGGATGAAA GUCCA	1341-1363
AD- 68309.1	614	AGAAAGGUGUUAAGAUG UCA	731	UGACAUCUUGAACACCUU UCUCC	1001- 1022_C21A
AD- 68303.1	615	CAUCCUGGAAUAUAUUA ACU	732	AGUUAUAUAUUUCCAGG AUGAA	1349-1370
AD- 65626.5	616	GAAUGUGAAAGUCAUCGA CAA	733	UUGUCGAUGACUUUCACA UUCUG	1072-1094
AD- 68295.1	617	AGUGCACAUAUUUUCCC AUA	734	UAUGGGAAAAUAUUGUGC ACUGU	1139- 1160_C21A
AD- 618	618	GAAAGUCAUCGACAAGAC	735	AAUGUCUUGUCGAUGACU	1080-1100

68273.1		AUU		UUCAC	
AD- 68297.1	619	AAUGUGAAAGUCAUCGAC AAA	736	UUUGUCGAUGACUUUCAC AUUCU	1075- 1096_G21A
AD- 68287.1	620	CUGGAAAUUAUUAACUG UUA	737	UACAGUUAUAUUAUUC CAGGA	1353-1374
AD- 68300.1	621	AUUUCCCCAUCUGUAUUA UUU	738	AAUUAUACAGAUUGGAA AAUAU	1149-1170
AD- 68306.1	622	UGUCGUUCUUUCCAACA AAA	739	UUUGUUGGAAAAGAACG ACACC	1252-1273
AD- 68292.1	623	AUCCUGGAAAUUAUUA CUA	740	UAGUUAUAUUAUUCAG GAUGA	1350- 1371_G21A
AD- 68298.1	624	GCAUUUGAGAGGUGAUG AUA	741	UAUCAUCACCUCUAAAA UGCCC	734- 755_G21A
AD- 68277.1	625	CAGGGGGAGAAAGGUGUU CAA	742	UUGAACACCUUUCUCCCC CUGGA	994-1014
AD- 68289.1	626	GGAAAUUAUUAACUGUU AAA	743	UUUAACAGUUAUAUUAU UCCAG	1355-1376
AD- 68272.1	627	CAUUGGUGAGGAAAAUC CUU	744	AAGGAUUUUUCCUCACCA AUGUC	1097-1117
AD- 68282.1	628	GGGAGAAAGGUGUUAAG AUA	745	UAUCUUGAACACCUUUCU CCCCC	998- 1018_G21A
AD- 68285.1	629	GGCAUUUGAGAGGUGAU GAU	746	AUCAUCACCUCUAAAAU GCCCU	733-754
AD- 68290.1	630	UACAAAGGGUGUCGUUCU UUU	747	AAAAGAACGACACCCUUU GUAUU	1243-1264
AD- 68296.1	631	UGGGAUCUUGGUGUCGAA UCA	748	UGAUUCGACACCAAGAUC CCAUU	783-804
AD- 68288.1	632	CUGACAGUGCACAAUAUU UUA	749	UAAAAUAUUGGCACUGU CAGAU	1134- 1155_C21A
AD- 68299.1	633	CAGUGCACAAUAUUUCC CAU	750	AUGGGAAAAUAUUGUGCA CUGUC	1138-1159
AD- 68275.1	634	ACUUUCAAUGGGUGUCC UAA	751	UUAGGACACCCAUGAAA AGUCA	1302- 1322_G21A
AD- 68274.1	635	ACAUUGGUGAGGAAAAU CCU	752	AGGAUUUUUCCUCACCAA UGUCU	1096-1116
AD- 68294.1	636	UUGCUUUUGACUUUCAA UGA	753	UCAUUGAAAAGUCAAAAG CAAUG	1293- 1314_G21A
AD- 68302.1	637	CAUUUUGAGAGGUGAUGA UGA	754	UCAUCAUCACCUCUAAA AUGCC	735- 756_C21A
AD- 68279.1	638	UUGACUUUCAAUGGGUG UCA	755	UGACACCAUUGAAAAGU CAAAA	1299- 1319_C21A
AD- 68278.1	639	CGACUUCUGUUUAGGAC UUU	756	UCUGUCCUAAAACAGAAG UUU	212-233

68304.1		AGA		UCGAC	
AD- 68286.1	640	CUCUGAGUGGGUGCCAGA AUA	757	UAUUCUGGCACCCACUCA GAGCC	1058- 1079_G21A
AD- 68291.1	641	GGGUGCCAGAAUGUGAAA GUA	758	UACUUUCACAUUCUGGCA CCCAC	1066- 1087_C21A
AD- 68283.1	642	UCAAUGGGUGUCCUAGGA ACA	759	UGUUCCUAGGACACCCAU UGAAA	1307- 1327_C21A
AD- 68280.1	643	AAAGUCAUCGACAAGACA UUA	760	UAAUGUCUUGUCGAUGAC UUUCA	1081- 1101_G21A
AD- 68293.1	644	AUUUUGAGAGGUGAUGAU GCA	761	UGCAUCAUCACCUCUCAA AAUGC	736- 757_C21A
AD- 68276.1	645	AUCGACAAGACAUUGGUG AGA	762	UCUCACCAAUGUCUUGUC GAUGA	1087- 1107_G21A
AD- 68308.1	646	GGUGCCAGAAUGUGAAAG UCA	763	UGACUUUCACAUUCUGGC ACCCA	1067-1088
AD- 68278.1	647	GACAGUGCACAUAUUUU CCA	764	UGGAAAAUAUUGGCACU GUCAG	1136- 1156_C21A
AD- 68307.1	648	ACAAAGAGACACUGUGCA GAA	765	UUCUGCACAGUGUCUCUU UGUCA	1191- 1212_G21A
AD- 68284.1	649	UUUUCAAUGGGUGUCCUA GGA	766	UCCUAGGACACCCAUUGA AAAGU	1304-1324
AD- 68301.1	650	CCGUUCCAAGAUCUGAC AGU	767	ACUGUCAGAUCUUGGAAA CGGCC	1121-1142
AD- 68281.1	651	AGGGGGAGAAAGGUGUUC AAA	768	UUUGAACACCUUUCUCCC CCUGG	995- 1015_G21A
AD- 68305.1	652	AGUCAUCGACAAGACAUU GGU	769	ACCAAUGUCUUGUCGAUG ACUUU	1083-1104

Пример 2. Скрининг в отношении однократной дозы *in vitro* с использованием первичных гепатоцитов обезьяны.

Модифицированные и конъюгированные дуплексы siRNA для HAO1 оценивали на эффективность с помощью анализов с трансфекцией с использованием первичных гепатоцитов обезьяны. siRNA для HAO1 трансфицировали в двух дозах, 10 и 0,1 нМ. Результаты этих анализов показаны в табл. 3, и данные выражены как доля оставшегося количества транскрипта в клетках, трансфицированных siRNA, целенаправленно воздействующими на HAO1, по отношению к клеткам, трансфицированным отрицательным по siRNA контролем, AD-1955, $\pm$ среднее квадратичное отклонение (SD).

Результаты показаны на фиг. 3А. На фиг. 3В показан эффект дозы с использованием одного из наиболее активных конъюгатов (№ 31) (AD-62933) по результатам скрининга первичных двух доз; значение IC_{50} составляло ~19 пМ.

Таблица 3а

Скрининг в отношении однократной дозы для НАО1
с использованием гепатоцитов обезьяны

ID дуплекса	Вид	10 нМ PCH	0,1 нМ PCH	SD 10 нМ PCH	SD 0,1 нМ PCH
AD-62974	Hs	5,3	29,8	1,87	11,11
AD-62975	Hs	7,6	31,3	0,34	1,99
AD-62976	Hs	4,7	35,5	0,34	13,90
AD-62977	Hs	29,2	66,9	8,32	43,88
AD-62978	Hs	3,8	8,9	0,15	4,29
AD-62979	Hs	27,5	80,7	1,35	19,58
AD-62980	Hs	7,4	32,2	1,26	1,42
AD-62981	Hs	18,7	49,9	3,46	12,83
AD-62982	Hs	2,2	8,5	0,10	7,71
AD-62983	Hs	19,4	41,0	11,19	6,60
AD-62984	Hs	6,7	13,3	1,05	2,60
AD-62985	Hs	2,3	8,3	0,24	2,68
AD-62986	Hs	39,0	57,2	3,82	16,31
AD-62987	Hs	11,5	17,8	14,62	15,39
AD-62989	Hs	10,6	34,2	2,23	2,68
AD-62990	Hs	12,0	18,4	9,11	5,23
AD-62991	Hs	7,2	14,2	1,30	2,96
AD-62992	Hs	3,9	16,0	1,15	1,80
AD-62993	Hs	22,3	58,4	9,91	6,28
AD-62994	Hs	3,2	10,8	1,21	1,69
AD-62995	Hs	5,5	17,6	4,58	3,25
AD-62996	Hs	3,4	20,7	2,16	3,73
AD-62997	Hs	4,5	24,2	0,67	3,32
AD-62998	Hs	4,3	14,7	0,49	0,29
AD-62999	Hs	11,4	15,5	1,23	2,50
AD-63000	Hs	45,5	90,6	13,41	43,49
AD-63001	Hs	13,3	31,0	0,20	2,13
AD-63002	Hs	6,6	22,0	0,26	5,75
AD-63003	Hs	36,8	5,1	47,09	0,60
AD-63004	Hs	12,7	35,4	1,55	9,42
AD-62933	Hs/Mm	5,8	13,4	0,71	0,13
AD-62934	Hs/Mm	52,2	35,9	6,64	5,08
AD-62935	Hs/Mm	7,7	22,7	1,53	4,97
AD-62939	Hs/Mm	25,1	49,0	9,48	2,88

037115

AD-62940	Hs/Mm	11,9	50,4	4,12	13,91
AD-62941	Hs/Mm	9,6	30,3	7,28	3,11
AD-62944	Hs/Mm	8,0	18,5	1,40	5,63
AD-62945	Hs/Mm	22,9	36,5	17,16	13,81
AD-62946	Hs/Mm	19,3	29,5	15,29	1,74
AD-62949	Hs/Mm	34,1	84,2	18,11	18,42
AD-62950	Hs/Mm	12,7	36,2	5,69	6,54
AD-62954	Hs/Mm	46,0	53,2	37,57	10,61
AD-62955	Hs/Mm	24,6	36,0	0,97	16,36
AD-62959	Hs/Mm	32,3	37,4	12,49	12,08
AD-62960	Hs/Mm	18,1	37,5	2,12	3,12
AD-62964	Hs/Mm	16,2	52,4	5,59	22,40
AD-62965	Hs/Mm	18,5	34,5	3,77	22,38
AD-62969	Hs/Mm	11,7	34,0	0,17	12,55
AD-62970	Hs/Mm	13,6	21,2	1,13	5,85
AD-62936	Mm	91,3	55,6	16,03	0,27
AD-62937	Mm	45,8	77,7	22,77	47,01
AD-62938	Mm	78,3	55,1	8,81	2,70
AD-62942	Mm	18,8	21,7	7,34	8,00
AD-62943	Mm	6,7	31,0	0,79	7,22
AD-62947	Mm	27,9	82,0	14,01	2,01
AD-62948	Mm	21,9	52,5	6,56	21,01
AD-62951	Mm	40,1	77,4	8,76	3,03
AD-62952	Mm	33,7	69,9	17,76	1,71
AD-62953	Mm	79,9	65,1	96,61	22,79
AD-62956	Mm	7,6	16,4	1,01	12,39
AD-62957	Mm	6,7	21,3	0,99	3,02
AD-62958	Mm	38,9	54,4	21,66	29,39
AD-62961	Mm	35,3	66,0	0,35	24,65
AD-62962	Mm	70,7	63,7	21,17	26,36
AD-62963	Mm	35,1	66,5	35,49	9,42
AD-62966	Mm	69,0	100,3	17,07	3,44
AD-62967	Mm	90,7	116,7	22,01	47,77
AD-62968	Mm	46,3	72,2	28,37	67,08
AD-62971	Mm	17,9	46,3	1,23	23,41
AD-62972	Mm	75,6	122,9	24,75	18,00
AD-62973	Mm	102,8	73,9	22,49	14,39

Таблица 3б

Дополнительный скрининг в отношении однократной дозы
для НАО1 с использованием первичных гепатоцитов обезьяны

ID дуплекса	Вид	10 нМ PCH	0,1 нМ PCH	SD 10 нМ PCH	SD 0,1 нМ PCH
AD-62974.2	Hs	5,3	29,8	1,87	11,11
AD-62975.2	Hs	7,6	31,3	0,34	1,99
AD-62976.2	Hs	4,7	35,5	0,34	13,90
AD-62977.2	Hs	29,2	66,9	8,32	43,88
AD-62978.2	Hs	3,8	8,9	0,15	4,29
AD-62979.2	Hs	27,5	80,7	1,35	19,58
AD-62980.2	Hs	7,4	32,2	1,26	1,42
AD-62981.2	Hs	18,7	49,9	3,46	12,83
AD-62982.2	Hs	2,2	8,5	0,10	7,71
AD-62983.2	Hs	19,4	41,0	11,19	6,60
AD-62984.2	Hs	6,7	13,3	1,05	2,60
AD-62985.2	Hs	2,3	8,3	0,24	2,68
AD-62986.2	Hs	39,0	57,2	3,82	16,31
AD-62987.2	Hs	11,5	17,8	14,62	15,39
AD-62989.2	Hs	10,6	34,2	2,23	2,68
AD-62990.2	Hs	12,0	18,4	9,11	5,23
AD-62991.2	Hs	7,2	14,2	1,30	2,96
AD-62992.2	Hs	3,9	16,0	1,15	1,80
AD-62993.2	Hs	22,3	58,4	9,91	6,28
AD-62994.2	Hs	3,2	10,8	1,21	1,69
AD-62995.2	Hs	5,5	17,6	4,58	3,25
AD-62996.2	Hs	3,4	20,7	2,16	3,73
AD-62997.2	Hs	4,5	24,2	0,67	3,32
AD-62998.2	Hs	4,3	14,7	0,49	0,29
AD-62999.2	Hs	11,4	15,5	1,23	2,50
AD-63000.2	Hs	45,5	90,6	13,41	43,49
AD-63001.2	Hs	13,3	31,0	0,20	2,13
AD-63002.2	Hs	6,6	22,0	0,26	5,75
AD-63003.2	Hs	36,8	5,1	47,09	0,60
AD-63004.2	Hs	12,7	35,4	1,55	9,42
AD-62933.2	Hs/Mm	5,8	13,4	0,71	0,13
AD-62934.2	Hs/Mm	52,2	35,9	6,64	5,08
AD-62935.2	Hs/Mm	7,7	22,7	1,53	4,97
AD-62939.2	Hs/Mm	25,1	49,0	9,48	2,88
AD-62940.2	Hs/Mm	11,9	50,4	4,12	13,91
AD-62941.2	Hs/Mm	9,6	30,3	7,28	3,11
AD-62944.2	Hs/Mm	8,0	18,5	1,40	5,63
AD-62945.2	Hs/Mm	22,9	36,5	17,16	13,81
AD-62946.2	Hs/Mm	19,3	29,5	15,29	1,74

AD-62949.2	Hs/Mm	34,1	84,2	18,11	18,42
AD-62950.2	Hs/Mm	12,7	36,2	5,69	6,54
AD-62954.2	Hs/Mm	46,0	53,2	37,57	10,61
AD-62955.2	Hs/Mm	24,6	36,0	0,97	16,36
AD-62959.2	Hs/Mm	32,3	37,4	12,49	12,08
AD-62960.2	Hs/Mm	18,1	37,5	2,12	3,12
AD-62964.2	Hs/Mm	16,2	52,4	5,59	22,40
AD-62965.2	Hs/Mm	18,5	34,5	3,77	22,38
AD-62969.2	Hs/Mm	11,7	34,0	0,17	12,55
AD-62970.2	Hs/Mm	13,6	21,2	1,13	5,85
AD-62936.2	Mm	91,3	55,6	16,03	0,27
AD-62937.2	Mm	45,8	77,7	22,77	47,01
AD-62938.2	Mm	78,3	55,1	8,81	2,70
AD-62942.2	Mm	18,8	21,7	7,34	8,00
AD-62943.2	Mm	6,7	31,0	0,79	7,22
AD-62947.2	Mm	27,9	82,0	14,01	2,01
AD-62948.2	Mm	21,9	52,5	6,56	21,01
AD-62951.2	Mm	40,1	77,4	8,76	3,03
AD-62952.2	Mm	33,7	69,9	17,76	1,71
AD-62953.2	Mm	79,9	65,1	96,61	22,79
AD-62956.2	Mm	7,6	16,4	1,01	12,39
AD-62957.2	Mm	6,7	21,3	0,99	3,02
AD-62958.2	Mm	38,9	54,4	21,66	29,39
AD-62961.2	Mm	35,3	66,0	0,35	24,65
AD-62962.2	Mm	70,7	63,7	21,17	26,36
AD-62963.2	Mm	35,1	66,5	35,49	9,42
AD-62966.2	Mm	69,0	100,3	17,07	3,44
AD-62967.2	Mm	90,7	116,7	22,01	47,77
AD-62968.2	Mm	46,3	72,2	28,37	67,08
AD-62971.2	Mm	17,9	46,3	1,23	23,41
AD-62972.2	Mm	75,6	122,9	24,75	18,00
AD-62973.2	Mm	102,8	73,9	22,49	14,39

Пример 3. Скрининг в отношении однократной дозы *in vitro* с использованием первичных гепатоцитов мыши.

Модифицированные и конъюгированные дуплексы siRNA для HAO1 оценивали на эффективность с помощью анализов с трансфекцией с использованием первичных гепатоцитов мыши. siRNA для HAO1 трансфицировали в двух дозах, 20 и 0,2 нМ. Результаты этих анализов показаны в табл. 4, и данные выражены как доля оставшегося количества транскрипта в клетках, трансфицированных siRNA, целенаправленно воздействующими на HAO1, по отношению к клеткам, трансфицированным отрицательным по siRNA контролем, AD-1955, $\pm$ среднее квадратичное отклонение (SD).

Таблица 4а

Скрининг в отношении однократной дозы для НАО1
с использованием первичных гепатоцитов мыши

ID дуплекса	Вид	20 нМ PMH	0,2 нМ PMH	SD 20 нМ PMH	SD 0,2 нМ PMH
AD-62974	Hs	1,5	11,5	0,3	8,5
AD-62975	Hs	6,2	24,5	1,9	19,4
AD-62976	Hs	8,3	60,0	3,9	7,9
AD-62977	Hs	69,1	106,9	44,8	18,3
AD-62978	Hs	30,0	46,3	26,0	27,3
AD-62979	Hs	50,7	59,5	45,6	43,4
AD-62980	Hs	65,4	89,5	68,9	29,3
AD-62981	Hs	65,8	83,3	31,9	23,7
AD-62982	Hs	86,6	67,0	92,1	65,5
AD-62983	Hs	81,5	103,6	61,3	68,0
AD-62984	Hs	13,5	51,8	1,2	37,7
AD-62985	Hs	53,8	37,7	38,1	26,3
AD-62986	Hs	138,5	153,4	140,7	119,6
AD-62987	Hs	39,0	99,6	44,9	110,7
AD-62989	Hs	17,1	2,2	23,1	1,6
AD-62990	Hs	4,3	46,3	4,6	46,4
AD-62991	Hs	125,2	102,6	111,9	92,9
AD-62992	Hs	64,7	65,6	67,8	55,8
AD-62993	Hs	83,8	79,0	63,0	22,2
AD-62994	Hs	1,9	5,4	1,5	0,2
AD-62995	Hs	2,9	17,4	1,8	13,8
AD-62996	Hs	49,3	61,4	43,6	49,9
AD-62997	Hs	60,2	83,4	19,1	45,7
AD-62998	Hs	73,5	86,7	71,5	69,4
AD-62999	Hs	38,7	50,0	29,5	22,7
AD-63000	Hs	27,3	56,6	26,1	41,4
AD-63001	Hs	56,6	83,8	52,9	13,5
AD-63002	Hs	81,6	74,2	67,4	70,5
AD-63003	Hs	46,4	47,7	42,4	21,4
AD-63004	Hs	28,6	64,5	17,0	44,5
AD-62933	Hs/Mm	1,1	4,6	0,5	4,0
AD-62934	Hs/Mm	7,6	43,4	0,6	32,6
AD-62935	Hs/Mm	1,3	7,0	0,3	3,4

037115

AD-62939	Hs/Mm	6,1	21,4	2,2	14,5
AD-62940	Hs/Mm	6,0	16,9	1,4	3,8
AD-62941	Hs/Mm	5,6	8,5	3,9	6,3
AD-62944	Hs/Mm	3,3	4,3	2,9	4,5
AD-62945	Hs/Mm	6,4	7,0	1,0	7,2
AD-62946	Hs/Mm	18,3	21,4	19,2	21,1
AD-62949	Hs/Mm	11,4	43,7	8,9	38,3
AD-62950	Hs/Mm	9,9	21,9	4,7	20,8
AD-62954	Hs/Mm	9,4	65,5	0,2	64,3
AD-62955	Hs/Mm	5,8	21,8	5,5	5,8
AD-62959	Hs/Mm	4,2	9,6	1,8	5,3
AD-62960	Hs/Mm	5,4	10,1	3,8	2,5
AD-62964	Hs/Mm	3,7	21,2	0,9	12,7
AD-62965	Hs/Mm	8,0	20,8	5,3	23,5
AD-62969	Hs/Mm	6,4	4,7	3,8	5,1
AD-62970	Hs/Mm	19,6	5,2	14,6	6,1
AD-62936	Mm	7,0	17,5	0,1	9,9
AD-62937	Mm	4,0	16,9	0,8	10,2
AD-62938	Mm	4,0	49,1	0,7	42,4
AD-62942	Mm	3,4	4,9	1,2	5,3
AD-62943	Mm	3,8	14,9	2,2	10,6
AD-62947	Mm	10,9	6,4	9,6	1,6
AD-62948	Mm	6,7	18,7	6,9	15,8
AD-62951	Mm	8,1	11,8	8,6	14,5
AD-62952	Mm	9,4	23,2	10,1	29,2
AD-62953	Mm	11,3	10,3	13,7	12,1
AD-62956	Mm	2,2	3,9	1,8	1,6
AD-62957	Mm	3,2	22,5	3,1	20,0
AD-62958	Mm	7,5	16,0	5,8	13,2
AD-62961	Mm	4,3	6,9	2,8	5,6
AD-62962	Mm	17,1	42,4	14,2	49,5
AD-62963	Mm	2,3	10,8	0,6	8,3
AD-62966	Mm	5,7	11,6	5,8	5,6
AD-62967	Mm	3,8	21,7	2,0	23,0
AD-62968	Mm	3,5	9,4	0,3	9,0
AD-62971	Mm	4,6	3,1	5,0	2,7
AD-62972	Mm	13,8	22,7	17,0	24,9
AD-62973	Mm	19,3	51,9	19,7	21,9

Таблица 4b

Дополнительный скрининг в отношении однократной дозы
для НАО1 с использованием первичных гепатоцитов мыши

ID дуплекса	Вид	Название смыслового олигонуклео- тида	20 нМ РМН	0,2 нМ РМН	SD 20 нМ РМН	SD 0,2 нМ РМН
AD-62974.2	Hs	A-126176.1	1,5	11,5	0,3	8,5
AD-62975.2	Hs	A-126192.1	6,2	24,5	1,9	19,4
AD-62976.2	Hs	A-126208.1	8,3	60,0	3,9	7,9
AD-62977.2	Hs	A-126224.1	69,1	106,9	44,8	18,3
AD-62978.2	Hs	A-126178.1	30,0	46,3	26,0	27,3
AD-62979.2	Hs	A-126194.1	50,7	59,5	45,6	43,4
AD-62980.2	Hs	A-126210.1	65,4	89,5	68,9	29,3
AD-62981.2	Hs	A-126226.1	65,8	83,3	31,9	23,7
AD-62982.2	Hs	A-126180.1	86,6	67,0	92,1	65,5
AD-62983.2	Hs	A-126196.1	81,5	103,6	61,3	68,0
AD-62984.2	Hs	A-126212.1	13,5	51,8	1,2	37,7
AD-62985.2	Hs	A-126228.1	53,8	37,7	38,1	26,3
AD-62986.2	Hs	A-126182.1	138,5	153,4	140,7	119,6
AD-62987.2	Hs	A-126198.1	39,0	99,6	44,9	110,7
AD-62989.2	Hs	A-126230.1	17,1	2,2	23,1	1,6
AD-62990.2	Hs	A-126184.1	4,3	46,3	4,6	46,4
AD-62991.2	Hs	A-126200.1	125,2	102,6	111,9	92,9
AD-62992.2	Hs	A-126216.1	64,7	65,6	67,8	55,8
AD-62993.2	Hs	A-126232.1	83,8	79,0	63,0	22,2
AD-62994.2	Hs	A-126186.1	1,9	5,4	1,5	0,2
AD-62995.2	Hs	A-126202.1	2,9	17,4	1,8	13,8
AD-62996.2	Hs	A-126218.1	49,3	61,4	43,6	49,9
AD-62997.2	Hs	A-126234.1	60,2	83,4	19,1	45,7
AD-62998.2	Hs	A-126188.1	73,5	86,7	71,5	69,4
AD-62999.2	Hs	A-126204.1	38,7	50,0	29,5	22,7
AD-63000.2	Hs	A-126220.1	27,3	56,6	26,1	41,4
AD-63001.2	Hs	A-126236.1	56,6	83,8	52,9	13,5
AD-63002.2	Hs	A-126190.1	81,6	74,2	67,4	70,5
AD-63003.2	Hs	A-126206.1	46,4	47,7	42,4	21,4
AD-63004.2	Hs	A-126222.1	28,6	64,5	17,0	44,5
AD-62933.2	Hs/Mm	A-126094.1	1,1	4,6	0,5	4,0
AD-62934.2	Hs/Mm	A-126110.1	7,6	43,4	0,6	32,6
AD-62935.2	Hs/Mm	A-126126.1	1,3	7,0	0,3	3,4
AD-62939.2	Hs/Mm	A-126096.1	6,1	21,4	2,2	14,5
AD-62940.2	Hs/Mm	A-126112.1	6,0	16,9	1,4	3,8

AD-62941.2	Hs/Mm	A-126128.1	5,6	8,5	3,9	6,3
AD-62944.2	Hs/Mm	A-126098.1	3,3	4,3	2,9	4,5
AD-62945.2	Hs/Mm	A-126114.1	6,4	7,0	1,0	7,2
AD-62946.2	Hs/Mm	A-126130.1	18,3	21,4	19,2	21,1
AD-62949.2	Hs/Mm	A-126100.1	11,4	43,7	8,9	38,3
AD-62950.2	Hs/Mm	A-126116.1	9,9	21,9	4,7	20,8
AD-62954.2	Hs/Mm	A-126102.1	9,4	65,5	0,2	64,3
AD-62955.2	Hs/Mm	A-126118.1	5,8	21,8	5,5	5,8
AD-62959.2	Hs/Mm	A-126104.1	4,2	9,6	1,8	5,3
AD-62960.2	Hs/Mm	A-126120.1	5,4	10,1	3,8	2,5
AD-62964.2	Hs/Mm	A-126106.1	3,7	21,2	0,9	12,7
AD-62965.2	Hs/Mm	A-126122.1	8,0	20,8	5,3	23,5
AD-62969.2	Hs/Mm	A-126108.1	6,4	4,7	3,8	5,1
AD-62970.2	Hs/Mm	A-126124.1	19,6	5,2	14,6	6,1
AD-62936.2	Mm	A-126142.1	7,0	17,5	0,1	9,9
AD-62937.2	Mm	A-126158.1	4,0	16,9	0,8	10,2
AD-62938.2	Mm	A-126174.1	4,0	49,1	0,7	42,4
AD-62942.2	Mm	A-126144.1	3,4	4,9	1,2	5,3
AD-62943.2	Mm	A-126160.1	3,8	14,9	2,2	10,6
AD-62947.2	Mm	A-126146.1	10,9	6,4	9,6	1,6
AD-62948.2	Mm	A-126162.1	6,7	18,7	6,9	15,8
AD-62951.2	Mm	A-126132.1	8,1	11,8	8,6	14,5
AD-62952.2	Mm	A-126148.1	9,4	23,2	10,1	29,2
AD-62953.2	Mm	A-126164.1	11,3	10,3	13,7	12,1
AD-62956.2	Mm	A-126134.1	2,2	3,9	1,8	1,6
AD-62957.2	Mm	A-126150.1	3,2	22,5	3,1	20,0
AD-62958.2	Mm	A-126166.1	7,5	16,0	5,8	13,2
AD-62961.2	Mm	A-126136.1	4,3	6,9	2,8	5,6
AD-62962.2	Mm	A-126152.1	17,1	42,4	14,2	49,5
AD-62963.2	Mm	A-126168.1	2,3	10,8	0,6	8,3
AD-62966.2	Mm	A-126138.1	5,7	11,6	5,8	5,6
AD-62967.2	Mm	A-126154.1	3,8	21,7	2,0	23,0
AD-62968.2	Mm	A-126170.1	3,5	9,4	0,3	9,0
AD-62971.2	Mm	A-126140.1	4,6	3,1	5,0	2,7
AD-62972.2	Mm	A-126156.1	13,8	22,7	17,0	24,9
AD-62973.2	Mm	A-126172.1	19,3	51,9	19,7	21,9

Пример 4. Скрининг в отношении эффекта дозы с использованием первичных гепатоцитов обезьяны.

Значения IC₅₀ модифицированных и конъюгированных дуплексов siRNA для HAO1 определяли с использованием первичных гепатоцитов обезьяны. siRNA для HAO1 трансфицировали в пределах диапазона доз с конечной концентрацией дуплекса, составляющей от 10 нМ до 36 фМ, с использованием 86-кратных разведений. Результаты этих анализов показаны в табл. 5.

Таблица 5а
Скрининг в отношении эффекта дозы
для HAO1 с использованием первичных
гепатоцитов мыши

ID дуплекса	Вид	IC50 РСН (нМ)
AD-62984	Hs	0,017
AD-62994	Hs	0,029
AD-62989	Hs	0,175
AD-62974	Hs	0,288
AD-62975	Hs	0,399
AD-62933	Hs/Mm	0,019
AD-62944	Hs/Mm	0,027
AD-62935	Hs/Mm	0,137
AD-62965	Hs/Mm	0,155
AD-62941	Hs/Mm	0,245
AD-62940	Hs/Mm	0,927

Таблица 5b
Дополнительный скрининг в отношении
эффекта дозы для HAO1 с использованием
первичных гепатоцитов мыши

ID дуплекса	Вид	IC50 РСН (нМ)
AD-62984.2	Hs	0,017
AD-62994.2	Hs	0,029
AD-62989.2	Hs	0,175
AD-62974.2	Hs	0,288
AD-62975.2	Hs	0,399
AD-62933.2	Hs/Mm	0,019
AD-62944.2	Hs/Mm	0,027
AD-62935.2	Hs/Mm	0,137
AD-62965.2	Hs/Mm	0,155
AD-62941.2	Hs/Mm	0,245
AD-62940.2	Hs/Mm	0,927

Пример 5. Скрининг в отношении эффекта дозы с использованием первичных гепатоцитов мыши.

Значения IC50 модифицированных и конъюгированных дуплексов siRNA для HAO1 определяли с использованием первичных гепатоцитов мыши. siRNA для HAO1 трансфицировали в пределах диапазона доз с конечной концентрацией дуплекса, составляющей от 10 нМ до 36 фМ, с использованием 86-кратных разведений. Результаты этих анализов показаны в табл. 6.

Таблица 6а
Скрининг в отношении эффекта дозы
для HAO1 с использованием первичных
гепатоцитов мыши

ID дуплекса	Вид	IC50 РМН (нМ)
AD-62989	Hs	0,003
AD-62994	Hs	0,006
AD-62975	Hs	0,059
AD-62974	Hs	0,122
AD-62984	Hs	0,264
AD-62944	Hs/Mm	0,002
AD-62935	Hs/Mm	0,007
AD-62965	Hs/Mm	0,008
AD-62933	Hs/Mm	0,008
AD-62941	Hs/Mm	0,087
AD-62940	Hs/Mm	0,090

Таблица 6b

Дополнительный скрининг в отношении эффекта
дозы для НАО1 с использованием первичных
гепатоцитов мыши

ID дуплекса	Вид	IC50 РМН (нМ)
AD-62989.2	Hs	0,003
AD-62994.2	Hs	0,006
AD-62975.2	Hs	0,059
AD-62974.2	Hs	0,122
AD-62984.2	Hs	0,264
AD-62944.2	Hs/Mm	0,002
AD-62935.2	Hs/Mm	0,007
AD-62965.2	Hs/Mm	0,008
AD-62933.2	Hs/Mm	0,008
AD-62941.2	Hs/Mm	0,087
AD-62940.2	Hs/Mm	0,090

Таблица 7

Дополнительный скрининг в отношении однократной дозы
для НАО1 с использованием первичных гепатоцитов яванского макака и мыши

ID дуплекса	10 нМ РСН	0,1 нМ РСН	SD 10 нМ РСН	SD 0,1 нМ РСН	10 нМ РМН	0,1 нМ РМН	SD 10 нМ РМН	SD 0,1 нМ РМН
AD-62933.1	26,1	22,8	17,0	6,0	9,0	26,3	6,0	7,6
AD-65584.1	12,9	28,0	5,1	6,0	3,8	12,3	0,7	7,3
AD-65585.1	9,8	21,0	4,1	1,0	6,8	11,6	4,5	5,7

037115

AD- 65586.1	24,3	24,2	10,9	2,7	16,7	19,0	5,1	1,8
AD- 65587.1	24,7	31,7	10,2	21,9	13,6	27,1	5,7	10,3
AD- 65588.1	39,2	33,0	35,6	5,6	27,1	33,5	11,0	8,3
AD- 65590.1	5,6	15,4	0,4	6,6	4,2	8,7	1,1	0,5
AD- 65591.1	13,9	20,4	5,0	4,9	7,6	18,4	0,1	2,9
AD- 65592.1	15,6	24,3	7,4	3,7	10,1	24,5	3,1	1,0
AD- 65593.1	30,8	37,5	4,4	8,7	38,4	41,3	5,2	10,4
AD- 65594.1	18,0	21,8	5,6	2,6	24,7	25,3	0,5	7,6
AD- 65595.1	19,9	31,9	0,1	11,3	9,1	12,2	5,0	5,7
AD- 65596.1	12,3	19,2	0,6	1,6	10,0	19,9	1,0	1,9
AD- 65597.1	10,2	34,8	2,8	10,1	22,8	32,0	6,2	5,7
AD- 65598.1	14,4	21,2	3,2	8,6	10,8	22,0	2,6	8,8
AD- 65599.1	15,0	28,3	2,5	21,3	18,0	25,4	1,7	8,3
AD- 65600.1	11,8	13,7	5,6	0,3	6,4	14,5	5,7	6,8
AD- 65601.1	15,4	20,5	0,5	1,6	5,5	17,2	0,3	3,9
AD- 65602.1	12,9	23,3	0,8	12,0	11,0	25,4	2,6	2,6
AD- 65603.1	33,8	41,0	2,2	6,8	37,4	58,6	3,0	10,5
AD- 65604.1	10,4	18,7	1,3	2,3	12,9	24,5	0,9	9,2
AD- 65606.1	14,3	12,3	0,2	3,1	4,8	14,0	2,0	4,2
AD- 65607.1	9,2	18,5	2,1	3,6	14,4	32,8	1,9	1,6
AD- 65608.1	36,6	31,1	7,9	11,6	27,5	29,8	8,5	4,6

037115

AD- 65609.1	14,2	19,8	5,1	0,8	14,6	23,6	5,3	1,5
AD- 65610.1	59,1	59,6	15,0	13,3	35,0	70,9	10,0	0,1
AD- 65611.1	12,9	14,2	5,4	1,8	4,5	17,3	0,6	2,2
AD- 65612.1	19,3	20,5	1,5	9,0	16,2	23,3	3,8	1,7
AD- 65613.1	20,0	19,3	5,7	0,7	11,0	23,9	1,0	5,4
AD- 65614.1	12,4	27,1	2,2	0,5	14,2	16,7	3,8	11,9
AD- 65615.1	53,1	60,3	1,4	7,7	48,2	80,9	9,9	39,4
AD- 65616.1	21,7	12,5	17,8	5,5	5,3	13,3	0,5	7,2
AD- 65618.1	19,4	67,6	3,4	35,9	16,7	21,6	4,2	4,8
AD- 65619.1	17,0	27,2	0,5	12,4	12,5	26,3	3,2	2,3
AD- 65620.1	58,0	70,5	21,8	2,8	37,9	54,8	0,4	12,7
AD- 65621.1	12,3	17,5	4,6	2,3	3,8	11,3	1,3	0,3
AD- 65622.1	17,7	20,4	6,1	0,9	10,8	13,9	6,3	3,1
AD- 65623.1	44,4	32,9	7,9	н.д.	37,7	20,6	28,5	0,9
AD- 65624.1	13,0	23,3	5,0	9,8	9,2	7,9	2,8	0,4
AD- 65625.1	9,8	13,3	0,6	1,5	10,0	19,2	4,6	1,6
AD- 65626.1	7,7	15,0	1,1	4,9	8,6	14,7	3,6	2,4
AD- 65627.1	18,8	24,8	7,8	1,8	19,7	18,5	8,1	12,0
AD- 65628.1	27,3	31,7	4,9	3,9	29,7	43,4	6,4	19,6
AD- 65629.1	12,8	20,8	1,0	8,1	18,9	23,2	3,2	13,9
AD- 65630.1	7,2	14,0	0,3	5,3	6,1	8,5	1,3	2,1

037115

AD- 65631.1	6,7	17,2	0,7	5,7	12,0	23,1	4,0	0,9
AD- 65633.1	13,8	28,6	3,4	5,4	17,0	26,2	1,2	3,9
AD- 65634.1	12,2	23,6	6,6	1,2	21,6	35,2	1,4	8,2
AD- 65635.1	11,7	27,7	5,7	4,7	18,5	38,4	2,5	6,5
AD- 65636.1	13,1	29,4	0,6	12,9	21,3	35,6	3,1	13,1
AD- 65637.1	16,0	22,8	5,1	9,6	8,3	18,5	0,6	0,4
AD- 65638.1	11,5	15,9	4,3	2,1	20,8	31,8	3,5	3,2
AD- 65639.1	14,6	28,3	7,4	5,5	18,6	35,2	0,2	0,3
AD- 65641.1	32,3	49,3	3,4	8,9	29,1	34,0	4,8	8,8
AD- 65642.1	10,4	23,0	0,1	4,7	10,1	21,3	1,0	6,5
AD- 65643.1	12,6	13,7	0,3	2,5	5,3	20,6	1,8	6,8
AD- 65644.1	8,1	13,5	0,1	0,3	16,4	24,1	3,4	4,2
AD- 65645.1	69,5	88,7	6,3	26,6	81,8	75,5	13,6	5,8
AD- 65646.1	8,9	47,0	0,9	15,6	26,5	37,7	3,7	4,7
AD- 65647.1	11,0	14,0	2,9	0,3	16,6	23,7	2,6	0,7
AD- 65648.1	7,3	25,4	3,3	2,9	5,9	13,9	2,1	0,9
AD- 65649.1	11,6	23,0	1,9	3,4	20,7	29,8	2,1	3,6
AD- 65650.1	27,9	40,6	13,1	14,0	27,6	30,6	9,7	6,8
AD- 65652.1	73,4	72,2	5,2	1,8	47,6	59,7	7,5	21,4
AD- 65653.1	9,6	32,4	2,7	4,7	5,9	24,3	0,0	6,7
AD- 65654.1	41,6	45,5	10,4	11,7	22,8	35,7	2,9	3,1

AD-65655.1	19,2	18,3	0,1	4,8	17,8	18,8	3,8	3,9
AD-65656.1	10,8	16,1	4,7	3,1	6,2	13,8	1,6	1,8
AD-65657.1	107,8	114,5	8,7	6,7	36,3	51,2	1,6	14,1
AD-65658.1	9,6	13,5	0,7	1,3	4,8	11,7	0,2	3,3
AD-65659.1	17,5	39,8	1,1	1,4	13,0	24,6	3,5	3,3
AD-65660.1	21,5	33,1	5,4	1,6	14,6	29,0	0,5	4,1
AD-65661.1	13,9	40,1	2,2	12,8	13,2	27,3	6,8	7,1
AD-65662.1	111,2	242,2	29,9	179,6	42,5	47,9	4,6	1,6
AD-65663.1	11,5	28,2	3,8	н.д.	5,5	7,6	1,4	0,1
AD-65665.1	104,8	141,7	13,0	26,9	39,4	44,2	13,1	5,3
AD-65666.1	14,4	28,1	6,9	1,8	3,8	12,7	0,3	4,8

Таблица 8

**Дополнительный скрининг в отношении однократной дозы
с использованием первичных гепатоцитов яванского макака**

Дуплекс	10 нМ PCH	10 нМ PCH SD	0,1 нМ PCH	0,1 нМ PCH SD
AD-65626.5	7,1	0,7	23,5	3,7
AD-68272.1	10,1	1,9	39,5	10,3
AD-68273.1	6,8	2,2	29,7	10,1
AD-68274.1	15,7	4,7	49,4	12,1
AD-68275.1	15,5	2,7	47,4	10,4
AD-68276.1	22,3	8,1	83,0	21,7
AD-68277.1	14,2	1,1	25,2	7,9
AD-68278.1	18,6	3,2	97,5	25,4
AD-68279.1	14,7	3,8	62,5	19,6
AD-68280.1	24,9	2,6	54,7	8,1
AD-68281.1	38,3	18,6	70,7	8,8
AD-68282.1	11,3	3,1	35,9	3,6
AD-68283.1	14,4	3,6	79,9	26,5
AD-68284.1	25,1	4,7	82,3	8,2
AD-68285.1	10,4	1,3	39,3	10,3

AD-68286.1	14,7	4,5	71,9	18,3
AD-68287.1	8,0	2,3	28,4	3,5
AD-68288.1	14,8	3,5	31,7	6,3
AD-68289.1	11,8	2,5	30,8	3,5
AD-68290.1	11,5	4,9	40,3	8,4
AD-68291.1	15,8	6,3	69,9	6,6
AD-68292.1	9,8	3,0	37,3	20,7
AD-68293.1	20,2	6,1	85,2	20,8
AD-68294.1	12,9	5,0	68,7	21,6
AD-68295.1	7,5	1,4	22,6	3,9
AD-68296.1	8,5	1,1	51,3	7,0
AD-68297.1	8,2	2,4	27,4	4,0
AD-68298.1	10,1	2,8	35,6	10,4
AD-68299.1	11,8	2,4	47,7	16,2
AD-68300.1	7,2	1,7	33,8	4,6
AD-68301.1	34,2	14,3	78,3	25,8
AD-68302.1	15,6	5,8	57,1	10,0
AD-68303.1	7,0	2,0	23,9	4,5
AD-68304.1	14,8	2,4	64,2	12,1
AD-68305.1	25,3	3,8	106,5	23,8
AD-68306.1	12,4	2,0	19,8	1,8
AD-68307.1	22,2	8,9	93,1	22,6
AD-68308.1	22,2	4,0	79,6	7,8
AD-68309.1	8,0	2,7	19,9	3,7

Пример 6. Оценка *in vivo* конъюгатов GO-GalNAc у мышей линии C57B6.

Конъюгаты GO-GalNAc вводили дозами подкожно мышам линии C57B6 в концентрации, составляющей 10, 5, 2,5 или 1,25 мг/кг, и при помощи qPCR оценивали степень нокдауна мРНК в печени через 72 ч после введения доз. Значения ED50 для однократной дозы составляют примерно 1,25 и 2,5 мг/кг для соединения А (AD-62994) и соединения В (AD-62933) соответственно. При исследованиях с повторной дозой конъюгаты вводили дозами подкожно еженедельно (QW) в течение 4 недель и оценивали уровни мРНК GO в печени через 72 ч после 4-ой дозы. Значения ED50 повторной дозы составляли ~0,3 мг/кг для обоих соединений. Результаты показаны на фиг. 4.

Пример 7. Оценка *in vivo* степени нокдауна GO и влияния на уровни оксалатов у КО по AGXT мышей.

siRNA для GO (AD-40257) в липидных наночастицах (LNP) вводили дозами внутривенно КО по AGXT мышам (Salido et al. (2006) PNAS 103:18249) в концентрации, составляющей 1 мг/кг. Уровни оксалатов или гликолата в моче измеряли на 15-й день при помощи ионообменной хроматографии/масс-спектрометрии. Результаты показаны на фиг. 5. Данные выражали относительно показателей до введения доз и нормализовали по отношению к уровню креатинина (Cr) для регулирования разбавления мочи. N=4 мышей на группу и планки погрешностей представляют среднее квадратичное отклонение.

Пример 8. Оценка *in vivo* конъюгатов GO-GalNAc на крысиной модели с нокдауном по AGXT.

Для получения крысиной модели PH1 siRNA для AGXT (AD-63102) в LNP (AF-011-63102) вводили дозами в концентрации, составляющей 1 мг/кг, внутривенно самкам крыс линии Sprague Dawley на 1-й день и на 7-й день для поддержания нокдауна AGXT в печени крыс и 1% этиленгликоля добавляли к питьевой воде для дополнительной стимуляции образования оксалатов. На 0-й день и 7-й день некоторым крысам также вводили дозами конъюгат GalNAc-siRNA для GO (AD-62994) или PBS-контроль. Результаты показаны на фиг. 6. На фиг. 6А показана количественная оценка уровней мРНК AGXT в печени через 72 ч после однократной дозы siRNA для AGXT в LNP, составляющей 1 мг/кг. На фиг. 6В, уровни оксалатов в моче количественно определяли с помощью собранной за 24 ч мочи, собранной с -1-го дня по 0-й день, с 3-го дня по 4-й день, с 5-го дня по 6-й день и с 7-го дня по 8-й день. Данные нормализовали по отношению к уровню креатинина для регулирования разбавления мочи. N=3 для групп AGXT и N=2 для группы PBS-контроля. На фиг. 6С, за этими же крысами (что и на фиг. 6В) далее наблюдали до 49-го дня с продолжающимся еженедельным введением доз на 14 и 21 дни как AF-011-63102, так и AD-62994 и сборами мочи за 24 ч, как показано. Этиленгликоль продолжали добавлять в питьевую воду до 28-го дня. На фиг. 6D продолжительность нокдауна HAO1 у крыс показана при помощи измерения уровней мРНК

либо через одну неделю, либо через четыре недели после последней из 4 доз (что соответствует 28 и 49 дням на фиг. 6С) и приведены относительно уровней, наблюдаемых у крыс, которых лечили при помощи PBS. Планки погрешностей представляют среднее квадратичное отклонение везде, где используются.

Название дуплекса	Мишень	Название смысловой целевой нити
AD-40257.1	HAO1	NM_017545,2_1306-1324_s
AD-40257.2	HAO1	NM_017545,2_1306-1324_s
AD-63102.1	AGXT	NM_016702,3_1109-1127_s
AD-63102.2	AGXT	NM_016702,3_1109-1127_s
AD-63102.3	AGXT	NM_016702,3_1109-1127_s

Название дуплекса	Модифицированная последовательность смысловой нити	Немодифицированная последовательность смысловой нити	SEQ ID NO:
AD-40257.1	uucAAuGGGuGuccuAGGAdTsdT	UUCAAUGGGUGUCCUAGGA	770 и 771
AD-40257.2	uucAAuGGGuGuccuAGGAdTsdT	UUCAAUGGGUGUCCUAGGA	770 и 771
AD-63102.1	AcAAcuGGAGGGAcAucGudTsdT	ACAACUGGAGGGACAUCGU	772 и 773
AD-63102.2	AcAAcuGGAGGGAcAucGudTsdT	ACAACUGGAGGGACAUCGU	772 и 773
AD-63102.3	AcAAcuGGAGGGAcAucGudTsdT	ACAACUGGAGGGACAUCGU	772 и 773

Название дуплекса	Модифицированная последовательность антисмысловой нити	Немодифицированная последовательность антисмысловой нити	SEQ ID NO:
AD-40257.1	UCCuAGGAcACCCAUUGAAAdTsdT	UCCUAGGACACCCAUUGAA	774 и 775
AD-40257.2	UCCuAGGAcACCCAUUGAAAdTsdT	UCCUAGGACACCCAUUGAA	774 и 775
AD-63102.1	ACGAUGUCCUCCAGUUGUdTsdT	ACGAUGUCCUCCAGUUGU	776 и 777
AD-63102.2	ACGAUGUCCUCCAGUUGUdTsdT	ACGAUGUCCUCCAGUUGU	776 и 777
AD-63102.3	ACGAUGUCCUCCAGUUGUdTsdT	ACGAUGUCCUCCAGUUGU	776 и 777

Пример 9. Оценка *in vivo* конъюгатов GO-GalNac.

Самкам мышей линии C57BL/6 возрастом 6-8 недель вводили однократную подкожную дозу конъюгатов siRNA-GalNac для GO, в табл. 9. Мышей выводили из эксперимента через 72 ч и печень анализировали в отношении мРНК HAO при помощи анализа с bDNA. Результаты показаны на фиг. 13.

Таблица 9

Конъюгаты siRNA-GalNac для GO (HAO)

Название дуплекса	Модифицированная последовательность смысловой нити	SEQ ID NO:
AD-62989.2	UfscsCfuAfgGfaAfCfCfuUfuUfaGfaAfaUfL96	778
AD-62994.2	GfsasCfuUfuCfaUfCfCfuGfgAfaAfuAfuAfL96	779
AD-62933.2	GfsasAfuGfuGfaAfaAfGfuCfaUfcGfaCfaAfL96	780
AD-62935.2	CfsasUfuGfgUfgAfGfGfaAfaAfaUfcCfuUfL96	781
AD-62940.2	AfsusCfgAfcAfaGfAfCfaUfuGfgUfgAfgAfL96	782
AD-62941.2	AfscsAfuUfgGfuGfAfGfgAfaAfaAfuCfcUfL96	783
AD-62944.2	GfsasAfaGfuCfaUfCfGfaCfaAfgAfcAfuUfL96	784
AD-62965.2	AfsasAfgUfcAfuCfGfAfcAfaGfaCfaUfuAfL96	785

Название дуплекса	Модифицированная антисмысловая нить	SEQ ID NO:
AD-62989.2	asUfsuUfcUfaAfaAfgguUfcCfuAfgGfascsa	786
AD-62994.2	usAfsuAfuUfuCfcAfggaUfgAfaAfgUfcscsa	787
AD-62933.2	usUfsgUfcGfaUfgAfcuuUfcAfcAfuUfcsusg	788
AD-62935.2	asAfsgGfaUfuUfuUfccuCfaCfcAfaUfsgusc	789
AD-62940.2	usCfsuCfaCfcAfaUfgucUfuGfuCfgAfusgsa	790
AD-62941.2	asGfsgAfuUfuUfuCfcucAfcCfaAfuGfscsu	791
AD-62944.2	asAfsuGfuCfuUfgUfcgaUfgAfcUfuUfcsasc	792
AD-62965.2	usAfsaUfgUfcUfuGfucgAfuGfaCfuUfscsa	793

Название дуплекса	Перекрестная реактивность	Морской свинки?	ММ к мыши	ММ к GP
AD-62989.2	Hs	да	пол. 8	
AD-62994.2	Hs	нет	пол. 16	пол. 2, 12, 16
AD-62933.2	Hs/Mm	да		
AD-62935.2	Hs/Mm	да		
AD-62940.2	Hs/Mm	да		
AD-62941.2	Hs/Mm	да		
AD-62944.2	Hs/Mm	да		
AD-62965.2	Hs/Mm	да		

Пример 10. Оценка *in vivo* конъюгатов GO-GalNAc у мышей.

Самкам мышей линии C57 BL/6 вводили однократную подкожную дозу, составляющую 3 мг/кг, ряда конъюгатов siRNA-GalNAc для GO, описанных в данном документе, или PBS-контроль. Мышей выводили из эксперимента через 72 ч и при помощи qPCR оценивали степень нокдауна мРНК HAO1 в печени. Результаты показаны на фиг. 14, выраженные относительно PBS-контроля.

Пример 11. Оценка эффекта дозы конъюгатов GO-GalNAc у мышей.

Самкам мышей линии C57 BL/6 вводили однократную подкожную дозу, составляющую либо 1, либо 3 мг/кг, одного из конъюгатов siRNA-GalNAc для GO, соединения A (AD-62994), соединения B (AD-62933), соединения C (AD-65644), соединения D (AD-65626), соединения E (AD-65590), соединения F (AD-65585) или PBS-контроля. Через десять дней мышей выводили из эксперимента и при помощи qPCR оценивали степень нокдауна мРНК HAO1 в печени. При исследованиях с повторной дозой соединения C, D, F или PBS-контроль вводили дозами подкожно еженедельно (QW) в течение 4 недель и уровни мРНК HAO1 в печени оценивали через 10 дней после последней дозы. Результаты экспериментов с использованием однократной дозы показаны на фиг. 15 и экспериментов с использованием повторной дозы показаны на фиг. 16, выраженные относительно PBS-контроля. Из этих данных видна улучшенная действенность соединений AD-65644 и AD-65626 относительно AD-62933 и соединений AD-65590 и AD-65585 относительно AD-62994.

Пример 12. Оценка эффекта дозы соединения D у мышей.

Самкам мышей линии C57 BL/6 вводили однократную подкожную дозу AD-65626 или PBS-контроля, составляющую 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг. Через десять дней мышей выводили из эксперимента и при помощи qPCR оценивали степень нокдауна мРНК HAO1 в печени, при этом результаты выражали относительно PBS-контроля, как показано на фиг. 17. Из этих результатов видно более чем 3-кратное улучшение действенности по сравнению с соединением AD-62933.

Пример 13. Взаимосвязь нокдауна мРНК с уровнями гликолата в сыворотке крови у мышей.

Самкам мышей линии C57 BL/6 вводили однократную подкожную дозу AD-65585 или PBS-контроля, составляющую 0,1, 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг. Через десять дней мышей выводили из эксперимента и при помощи qPCR оценивали степень нокдауна мРНК HAO1 в печени, при этом результаты выражали относительно PBS-контроля. Уровни гликолата в образцах сыворотки крови от этих же самых мышей количественно определяли при помощи ионообменной хроматографии совместно с масс-спектроскопией, как описано ранее (Knight et al., Anal. Biochem. 1 Февраля 2012 г; 421(1): 121-124). Результаты для этих экспериментов показаны на фиг. 18.

Из этих результатов видно, что AD-65585 является таким же действенным, как и AD-65626, оба характеризуются значением ED50 однократной дозы, составляющим ~0,3 мг/кг, у мышей WT. Кроме того, сайленсинг мРНК HAO1 приводит к зависимым от дозы повышению уровня гликолата в сыворотке крови, составляющим до 4 раз (примерно 200 мкМ), при двух наивысших дозах.

Пример 14. Взаимосвязь нокдауна мРНК с уровнями гликолата в сыворотке крови у крыс.

Самцам крыс линии Sprague Dawley вводили однократную подкожную дозу AD-65626 или PBS-контроля, составляющую 1, 3 или 10 мг/кг. Через четырнадцать дней крыс выводили из эксперимента и при помощи qPCR оценивали степень нокдауна мРНК HAO1 в печени, при этом результаты выражали относительно PBS-контроля. Уровни гликолата в образцах сыворотки крови от этих же самых крыс, собранные как перед введением доз, так и на 14-й день, количественно определяли при помощи ионообменной хроматографии совместно с масс-спектроскопией, и в этом случае также как описано (Knight et al., Anal. Biochem. 1 Февраля 2012 г; 421(1):121-124). Результаты для этих экспериментов показаны на фиг. 19.

Согласно результатам наблюдений за мышами дикого типа из этих результатов также видно, что сайленсинг мРНК HAO1 у крыс линии Sprague Dawley приводит к зависимым от дозы повышению уровня гликолата в сыворотке крови, составляющим до 12 раз (примерно 140 мкМ), при двух наивысших дозах.

Пример 15. Исследование фармакологических свойств ALN-65585.

Ингибирование HAO1 в гепатоцитах.

Первичные гепатоциты яванского макака трансфицировали с помощью RNAimax (Invitrogen) серийно разведенным AD-65585 (ALN-65585, "ALN-GO1") или контролем, представляющим собой нецеливающуюся мРНК с люциферазой (AD1955), в концентрации, составляющей 10 нМ. Относительные уровни мРНК HAO1 определяли путем нормализации в отношении уровней мРНК GAPDH, которые количественно определяли при помощи RT-PCR в режиме реального времени. Данные наносили на график с расчетом показателя IC50, составляющего 10 пМ. Результаты показаны на фиг. 20.

Трансфекция *in vitro* AD-65585 показала значение ED50, составляющее примерно 10 пМ, на первичных гепатоцитах яванского макака.

Фармакологические свойства однократной дозы у мыши.

Фармакологические свойства ALN-GO1 оценивали у мышей путем количественного определения уровней мРНК HAO1 в печени и гликолата в сыворотке крови (фиг. 21). Однократная SC доза ALN-GO1 приводила к дозозависимой супрессии мРНК HAO1 в дозе, составляющей 10 мг/кг, приводящей к сайленсингу со значением ED90. Установили, что доза со значением ED50 для сайленсинга GO1 у мыши составляет 0,3 мг/кг. Уровни гликолата в сыворотке крови повышались зависимым от дозы образом, при этом максимальный уровень составлял примерно в 4 раза выше от исходных уровней. Результаты показаны на фигуре 21, на которой показаны уровни мРНК HAO1 в печени и гликолата в сыворотке крови через 10 дней после однократной подкожной дозы ALN-65585 у мышей линии C57BL/6. Столбики представляют среднее значение, полученное от 3 или 4 животных, и планки погрешностей отображают среднее квадратичное отклонение.

Продолжительность действия однократной дозы у мыши.

Сайленсинг GO1 был долговременным и обратимым после однократной SC дозы (фиг. 22). Однократная SC доза ALN-GO1 у мышей в концентрации, составляющей 3 мг/кг, приводила к $\geq 70\%$ сайленсингу мРНК в течение примерно 6 недель, после чего уровни мРНК возвращались к исходным уровням через 12 недель после введения дозы. Результаты показаны на фиг. 22: уровни мРНК HAO1 в печени в многочисленных моменты времени после однократной подкожной дозы ALN-65585 у мышей линии C57BL/6. Каждая точка измерения представляет среднее значение, полученное от 3 животных, и планки погрешностей отображают среднее квадратичное отклонение.

Фармакологические свойства однократной дозы у крысы Фармакологические свойства ALN-GO1 оценивали у крыс путем количественного определения уровней мРНК HAO1 в печени (фиг. 23). Однократное SC введение ALN-GO1 самцам крыс линии Sprague Dawley приводило к дозозависимой супрессии мРНК HAO1 в дозе, составляющей ≥ 3 мг/кг, приводящей к сайленсингу со значением ED90. Результаты показаны на фиг. 23: уровни мРНК HAO1 в печени через 10 дней после однократной подкожной дозы ALN-65585 у крыс линии Sprague Dawley. Столбики представляют среднее значение, полученное от 3 животных, и планки погрешностей отображают среднее квадратичное отклонение. Установили, что доза со значением ED50 для сайленсинга GO1 у крысы составляет 0,3 мг/кг.

Фармакологические свойства однократной дозы у КО по AGXT мыши.

Влияние ALN-GO1 на уровни оксалатов оценивали на КО по AGXT мышинной модели PH1. Результаты показаны на фиг. 24. Выделение оксалатов (вверху) и гликолата (внизу) с мочой за 24 ч КО по AGXT мышей после однократной подкожной дозы ALN-65585. Разные буквы означают значимое различие между 3 группами доз на каждой конкретной неделе ($n=3$ на дозу). Выделение с мочой с течением времени существенно не изменяется у животных с PBS-контролем ($n=1$).

Уровни оксалатов в моче показали дозозависимые сокращения количества после однократной дозы ALN-GO1 с наибольшим примерно 50% снижением количества оксалатов при дозе, составляющей 3 мг/кг, которое длилось в течение ≥ 3 недель перед возвращением к уровням до введения дозы. Уровни гликолата в моче показали дозозависимые повышения после однократной дозы ALN-GO1 с наибольшими примерно 5-кратными повышениями при дозе, составляющей 3 мг/кг, которые длились в течение ≥ 4 недель.

Фармакологические свойства однократной дозы на индуцированной крысиной модели PH1.

ALN-GO1 оценивали на второй модели PH1 на грызунах, при которой у крыс с использованием siRNA ингибировали AGXT в печени и уровни оксалатов стимулировали этиленгликолем (фиг. 25A и 25B). Уровни мРНК HAO1 в печени и оксалатов в моче за 24 ч количественно определяли для определения степени снижения HAO1, необходимой для наибольшего сокращения количества оксалатов. Результаты показаны на фиг. 25A и 25B: уровни мРНК HAO1 в печени у крысиной индуцированной модели PH1 через 14 дней после однократной подкожной дозы ALN-65585 и еженедельного введения доз siRNA AF-011-AGXT (2 дозы, составляющие 1 мг/кг). Уровни оксалатов в моче за 24 ч, нормализованные к уровням креатинина в моче. Столбики представляют среднее значение, полученное от 3 животных, и планки погрешностей отображают среднее квадратичное отклонение. Корреляционное поле снижения уровней мРНК и оксалатов представляет отдельных животных из множества экспериментов.

Однократная доза ALN-GO1 в этой модели показала дозозависимое снижение уровней мРНК и оксалатов в моче с примерно 85% наибольшим сокращением количества мРНК и примерно 90% наибольшим сокращением количества оксалатов в моче, наблюдаемые при наивысших дозах ALN-GO1 (фиг. 25А и 25В). В этой индуцированной крысиной модели РН1 сокращения количеств мРНК и оксалатов в моче привели к соотношению 1:1.

Фармакологические свойства многократных доз на индуцированной крысиной модели РН1.

Действенность ALN-GO1 оценивали в исследованиях на нормальных крысах с ингибированной активностью AGXT и этиленгликолем (индуцированная модель РН1) путем количественного определения уровней мРНК HAO1 в печени и оксалатов в моче за 24 ч. Результаты показаны на фиг. 26: уровни мРНК HAO1 в печени у крысиной индуцированной модели РН1 через 28 дней после повторного подкожного введения дозы ALN-65585 и повторного iv введения дозы siRNA AF-011-AGXT (четыре дозы, составляющие 1 мг/кг). Уровни оксалатов в моче за 24 ч, нормализованные к уровням креатинина в моче. Столбики представляют среднее значение, полученное от 2 или 3 животных, и планки погрешностей отображают среднее квадратичное отклонение.

Лечение с помощью ALN-GO1 приводило к устойчивым сокращениям количества оксалатов в моче у всех групп лечения в течение примерно 3 недель. На 28-й день после повторного введения дозы ALN-GO1 (и четырех доз AF-011-AGXT) во всех группах присутствует >95% сокращение количества мРНК, >85% снижение уровней оксалатов в моче.

Фармакологические свойства многократных доз у NHP.

Фармакологические свойства ALN-GO1 оценивали у макаков-крабоедов (отличный от человека примат (NHP)) путем количественного определения уровней мРНК HAO1 при биопсии печени и гликолата в сыворотке крови. В следующей ниже таблице показан план исследования фармакологических свойств с использованием NHP с подробным изображением уровня доз и режима введения доз.

№ группы	Тестируемый объект	Уровень дозы (мг/кг)	Частота введения дозы
1	PBS	н.д.	QM x 6
2	AD-65585	0,25	QM x 8
3	AD-65585	1	QM x 8
4	AD-65585	1	QM x 6
5	AD-65585	2	QM x 6
6	AD-65585	4	QM x 6
7	AD-65585	2 -> 1	QM x 4 -> QM x 5

Результаты показаны на фиг. 27. Уровни гликолата в сыворотке крови у NHP для всех групп до 85-го дня, данные представляют групповые средние величины, полученные от 3 животных на группу, линии представляют среднее квадратичное отклонение. Количество мРНК HAO1 при биопсии печени на 29-й день, линии представляют групповые средние величины, символы представляют уровни мРНК отдельных животных относительно PBS-контроля на 29-й день.

После первого месяца введения доз (29-й день) дозозависимый сайленсинг мРНК наблюдали во всех группах с сайленсингом мРНК до 99% в группах 6 и 7, которым вводили дозы, составляющие 4 мг/кг ежемесячно или 2 мг/кг еженедельно. Наибольшие повышенные уровни гликолата в сыворотке крови, составляющие примерно 70 мкМ, сохранялись в течение по меньшей мере 3 недель в группе 6, которой ежемесячно вводили дозу, составляющую 4 мг/кг. Промежуточный уровень гликолата в сыворотке крови.

Пример 16. Дополнительные последовательности siRNA.

Конструирование дополнительных siRNA выполняли для идентификации siRNA, целенаправленно воздействующих на HAO1, NM_017545.2.

Немодифицированная последовательность	SEQ ID NO:	Модифицированная последовательность	SEQ ID NO:	Нить	Длина
AUGUAUGUUACUUCUUAGAGA	794	asusguauGfuUfAfCfuucuagagaL96	1890	смысловая	21
UCUCUAAGAAGUAACA UACAUC	795	usCfsucuAfaGfAfagu aAfcAfuacauscsc	1891	антисмысловая	23
UGUAUGUUACUUCUUA GAGAG	796	usgsuauGfuUfAfCfUfucuagagagL96	1892	смысловая	21
CUCUCUAAGAAGUAAC AUACAUC	797	csUfscucUfaAfGfaag uAfaCfauacasusc	1893	антисмысловая	23
UAGGAUGUAUGUUACUUCUUA	798	usasggauGfuAfUfGfuuacuucuL96	1894	смысловая	21
UAAGAAGUAACAUAACA UCCUAAA	799	usAfsagaAfgUfAfaca uAfcAfuccuasasa	1895	антисмысловая	23
UUAGGAUGUAUGUUACUUCU	800	ususaggaUfgUfAfUfguuacuucuL96	1896	смысловая	21
AAGAAGUAACAUAUAU CCUAAAA	801	asAfsgaaGfuAfAfcau aCfaUfccuaasasa	1897	антисмысловая	23
AGAAAGGUGUUAAGAUGUCC	802	asgsaaagGfuGfUfUfcaauguccL96	1898	смысловая	21
GGACAUCUUGAACACC UUUCUCC	803	gsGfsacaUfcUfUfgaa cAfcCfuucuscsc	1899	антисмысловая	23
GAAAGGUGUUAAGAU GUCCU	804	gsasaaggUfgUfUfCfa agauguccuL96	1900	смысловая	21
AGGACAUCUUGAACACC CUUUCUC	805	asGfsgacAfuCfUfuga aCfaCfuuucsusc	1901	антисмысловая	23
GGGGAGAAAGGUGUUAAGAU	806	gsgsggagAfaAfGfGfuguucaagauL96	1902	смысловая	21
AUCUUGAACACCUUUC UCCCCCU	807	asUfscuuGfaAfCfacc uUfuCfucscscsu	1903	антисмысловая	23
GGGGAGAAAGGUGUUA CAAGA	808	gsgsgggaGfaAfAfGfg uguucaagaL96	1904	смысловая	21
UCUUGAACACCUUUCU CCCCCUG	809	usCfsuugAfaCfAfccu uUfcUfccccsusg	1905	антисмысловая	23
AGAAACUUUGGUGUAUAAUAU	810	asgsaaacUfuUfGfGfg ugauaauL96	1906	смысловая	21
AUAUUAUCAGCCAAAGUUUCUUC	811	asUfsauuAfuCfAfgcc aAfaGfuucusc	1907	антисмысловая	23
GAAACUUUGGUGUAUAUAUU	812	gsasaacuUfuGfGfCfugauaauL96	1908	смысловая	21

AAUAUUUAUCAGCCAAA GUUUCUU	813	asAfsuauUfaUfCfagc cAfaAfguuucsusu	1909	антисмысловая	23
AUGAAGAAACUUUGGC UGAUA	814	asusgaagAfaAfCfUfu uggcugauaL96	1910	смысловая	21
UAUCAGCCAAAGUUUC UUCAUCA	815	usAfsucaGfcCfAfaag uUfuCfuucauscsa	1911	антисмысловая	23
GAUGAAGAAACUUUGG CUGAU	816	gsasugaaGfaAfAfCfu uuggcugauL96	1912	смысловая	21
AUCAGCCAAAGUUUCU UCAUCAU	817	asUfscagCfcAfAfagu uUfcUfucausasu	1913	антисмысловая	23
AAGGCACUGAUGUUCU GAAAG	818	asasggcaCfuGfAfUfg uucugaaagL96	1914	смысловая	21
CUUUCAGAACAUCAGU GCCUUUC	819	csUfsuucAfgAfAfcau cAfgUfgccuususc	1915	антисмысловая	23
AGGCACUGAUGUUCUG AAAGC	820	asgsgcacUfgAfUfGfu ucugaaagcL96	1916	смысловая	21
GCUUUCAGAACAUCAAG UGCCUUU	821	gsCfsuuuCfaGfAfaca uCfaGfugccususu	1917	антисмысловая	23
CGGAAAGGCACUGAUG UUCUG	822	csgsgaaaGfgCfAfCfu gauguucugL96	1918	смысловая	21
CAGAACAUCAGUGCCU UCCGCA	823	csAfsгааCfaUfCfagu gCfcUfuuccgscsa	1919	антисмысловая	23
GCGGAAAGGCACUGAU GUUCU	824	gscsggaaAfgGfCfAfc ugauguucuL96	1920	смысловая	21
AGAACAUCAGUGCCUU UCCGCAC	825	asGfsaacAfuCfAfgug cCfuUfuccgcsasc	1921	антисмысловая	23
AGAAGACUGACAUCAU UGCCA	826	asgsaagaCfuGfAfCfa ucauugccaL96	1922	смысловая	21
UGGCAUUGAUGUCAGU CUUCUCA	827	usGfsgcaAfuGfAfugu cAfgUfcuucuscscsa	1923	антисмысловая	23
GAAGACUGACAUCAUU GCCAA	828	gsasagacUfgAfCfAfu cauugccaaL96	1924	смысловая	21
UUGGCAUUGAUGUCAG UCUUCUC	829	usUfsggcAfaUfGfaug uCfaGfucuucsusc	1925	антисмысловая	23
GCUGAGAAGACUGACA UCAUU	830	gscsugagAfaGfAfCfu gacaucauuL96	1926	смысловая	21
AAUGAUGUCAGUCUUC UCAGCCA	831	asAfsugaUfgUfCfagu cUfuCfucagcscsa	1927	антисмысловая	23

GGCUGAGAAGACUGAC AUCAU	832	gsgscugaGfaAfGfAfc ugacaucauL96	1928	смысловая	21
AUGAUGUCAGUCUUCU CAGCCAU	833	asUfsgauGfuCfAfguc uUfcUfcagccsas	1929	антисмысловая	23
UAAUGCCUGAUUCACA ACUUU	834	usasaugcCfuGfAfUfu cacaacuuuL96	1930	смысловая	21
AAAGUUGUGAAUCAGG CAUUACC	835	asAfsaguUfgUfGfaau cAfgGfcuuascsc	1931	антисмысловая	23
AAUGCCUGAUUCACAA CUUUG	836	asasugccUfgAfUfUfc acaacuuugL96	1932	смысловая	21
CAAAGUUGUGAAUCAG GCAUUAC	837	csAfsaagUfuGfUfgaa uCfaGfgcauusasc	1933	антисмысловая	23
UUGGUAUUGCCUGAUU CACAA	838	ususguaAfuGfCfCfu gauucacaaL96	1934	смысловая	21
UUGUGAAUCAGGCAUU ACCAACA	839	usUfsgugAfaUfCfagg cAfuUfaccascsa	1935	антисмысловая	23
GUUGGUAUUGCCUGAU UCACA	840	gsusugguAfaUfGfCfc ugauucacaL96	1936	смысловая	21
UGUGAAUCAGGCAUUA CCAACAC	841	usGfsugaAfuCfAfggc aUfuAfccaacsasc	1937	антисмысловая	23
UAUCAAAUGGCUGAGA AGACU	842	usasucaaAfuGfGfCfu gagaagacuL96	1938	смысловая	21
AGUCUUCUCAGCCAUU UGAUUUC	843	asGfsucuUfcUfCfagc cAfuUfugauasusc	1939	антисмысловая	23
AUCAAUUGGCUGAGAA GACUG	844	asuscaaaUfgGfCfUfg agaagacugL96	1940	смысловая	21
CAGUCUUCUCAGCCAU UUGAUU	845	csAfsgucUfuCfUfcag cCfaUfuugausasu	1941	антисмысловая	23
AAGAUUCAAUUGGCU GAGAA	846	asasgauaUfcAfAfAfu ggcugagaaL96	1942	смысловая	21
UUCUCAGCCAUUUGAU AUCUUC	847	usUfscucAfgCfCfauu uGfaUfaucuuascsc	1943	антисмысловая	23
GAAGAUUCAAUUGGC UGAGA	848	gsasagauAfuCfAfAfa uggcugagaL96	1944	смысловая	21
UCUCAGCCAUUUGAUA UCUUC	849	usCfsucaGfcCfAfuuu gAfuAfucuuascsc	1945	антисмысловая	23
UCUGACAGUGCACAAU AUUUU	850	uscsugacAfgUfGfCfa caauuuuuL96	1946	смысловая	21

AAAAUAUUGUGCACUG UCAGAU	851	asAfsaaUfUfGfugc aCfuGfucagasusc	1947	антисмысловая	23
CUGACAGUGCACAAUA UUUUC	852	csusgacaGfuGfCfAfc aaauuuucL96	1948	смысловая	21
GAAAAUAUUGUGCACU GUCAGAU	853	gsAfsaaaUfaUfUfgug cAfcUfgucagsasu	1949	антисмысловая	23
AAGAUCUGACAGUGCA CAAUA	854	asasgaucUfgAfCfAfg ugcacaauaL96	1950	смысловая	21
UAUUGUGCACUGUCAG AUCUUGG	855	usAfsuugUfgCfAfcug uCfaGfaucuuusgsg	1951	антисмысловая	23
CAAGAUCUGACAGUGC ACAAU	856	csasagauCfuGfAfCfa gugcacaauL96	1952	смысловая	21
AUUGUGCACUGUCAGA UCUUGGA	857	asUfsuguGfcAfCfugu cAfgAfucuuusgsa	1953	антисмысловая	23
ACUGAUGUUCUGAAAG CUCUG	858	ascsugauGfuUfCfUfg aaagcucugL96	1954	смысловая	21
CAGAGCUUUCAGAAC UCAGUGC	859	csAfsgagCfuUfUfcag aAfcAfucagusgsc	1955	антисмысловая	23
CUGAUGUUCUGAAAGC UCUGG	860	csusgaugUfuCfUfGfa aagcucuggL96	1956	смысловая	21
CCAGAGCUUUCAGAAC AUCAGUG	861	csCfsagaGfcUfUfuca gAfaCfaucagsusg	1957	антисмысловая	23
AGGCACUGAUGUUCUG AAAGC	862	asgsgcacUfgAfUfGfu ucugaaagcL96	1958	смысловая	21
GCUUUCAGAACAUACAG UGCCUUU	863	gsCfsuuuCfaGfAfaca uCfaGfugccususu	1959	антисмысловая	23
AAGGCACUGAUGUUCU GAAAG	864	asasggcaCfuGfAfUfg uucugaaagL96	1960	смысловая	21
CUUUCAGAACAUACAGU GCCUUUC	865	csUfsuucAfgAfAfcau cAfgUfgccuususc	1961	антисмысловая	23
AACAACAUAGCUAAUAC AGUAC	866	asascaacAfuGfCfUfa aaucaguacL96	1962	смысловая	21
GUACUGAUUUAGCAUG UUGUUA	867	gsUfsacuGfaUfUfuag cAfuGfuuguuscsa	1963	антисмысловая	23
ACAACAUGCUAAAUAC GUACU	868	ascsaacaUfgCfUfAfa aucaguacuL96	1964	смысловая	21
AGUACUGAUUUAGCAU GUUGUUC	869	asGfsuacUfgAfUfuua gCfaUfguugususc	1965	антисмысловая	23

UAUGAACACAUGCUA AAUCA	870	usasugaaCfaAfCfAfu gcuaaaaucaL96	1966	смысловая	21
UGAUUUAGCAUGUUGU UCAUAAU	871	usGfsauuUfaGfCfaug uUfgUfucauasasu	1967	антисмысловая	23
UUUAUGAACACAUGCU AAAUC	872	ususaugaAfcAfAfCfa ugcuaaaucL96	1968	смысловая	21
GAUUUAGCAUGUUGUU CAUAAUC	873	gsAfsuuuAfgCfAfugu uGfuUfcauaasusc	1969	антисмысловая	23
UCUUUAGUGUCUGAAU AUAUC	874	uscsuuuaGfuGfUfCfu gaauauaucL96	1970	смысловая	21
GAUAUAUUCAGACACU AAAGAUG	875	gsAfsuauAfuUfCfaga cAfcUfaaagasusg	1971	антисмысловая	23
CUUUAGUGUCUGAAUA UAUCC	876	csusuagUfgUfCfUfg aauauauccL96	1972	смысловая	21
GGAUAUAUUCAGACAC UAAAGAU	877	gsGfsauaUfaUfUfcag aCfaCfuaaagsasu	1973	антисмысловая	23
CACAUCUUUAGUGUCU GAAUA	878	csascaucUfuUfAfGfu gucugaauaL96	1974	смысловая	21
UAUUCAGACACUAAAG AUGUGAU	879	usAfsuucAfgAfCfacu aAfaGfaugugsasu	1975	антисмысловая	23
UCACAUCUUUAGUGUC UGAAU	880	uscsacauCfuUfUfAfg ugucugaauL96	1976	смысловая	21
AUUCAGACACUAAAGA UGUGAUU	881	asUfsucaGfaCfAfcua aAfgAfugugasusu	1977	антисмысловая	23
UGAUACUUCUUUGAAU GUAGA	882	usgsauacUfuCfUfUfu gaauguagaL96	1978	смысловая	21
UCUACAUUCAAGAAG UAUCACC	883	usCfsuacAfuUfCfaaa gAfaGfuaucascsc	1979	антисмысловая	23
GAUACUUCUUUGAAUG UAGAU	884	gsasuacuUfcUfUfUfg aauugagauL96	1980	смысловая	21
AUCUACAUUCAAGAA GUAUCAC	885	asUfscuaCfaUfUfcaa aGfaAfguaucscasc	1981	антисмысловая	23
UUGGUGAUACUUCUUU GAAUG	886	ususggugAfuAfCfUfu cuuugaaugL96	1982	смысловая	21
CAUUCAAAGAAGUAUC ACCAAUU	887	csAfsuucAfaAfGfaag uAfuCfaccaasusu	1983	антисмысловая	23
AUUGGUGAUACUUCUU UGAAU	888	asusugguGfaUfAfCfu ucuuugaauL96	1984	смысловая	21

AUUCAAAGAAGUAUCA CCAUAUA	889	asUfsucaAfaGfAfagu aUfcAfccaaususa	1985	антисмысловая	23
AAUAACCGUGAAAAU GCUCC	890	asasuaacCfuGfUfGfa aaaugcuccL96	1986	смысловая	21
GGAGCAUUUUCACAGG UUAUUGC	891	gsGfsagcAfuUfUfuca cAfgGfuuausgsc	1987	антисмысловая	23
AUAACCGUGAAAAUG CUCCC	892	asusaaccUfgUfGfAfa aaugcuccL96	1988	смысловая	21
GGGAGCAUUUUCACAG GUUAUUG	893	gsGfsgagCfaUfUfuuc aCfaGfguaaususg	1989	антисмысловая	23
UAGCAAUAACCGUGA AAAUG	894	usasgcaaUfaAfCfCfu gugaaaaugL96	1990	смысловая	21
CAUUUUCACAGGUUAU UGCUAUC	895	csAfsuuUfcAfCfagg uUfaUfugcuasusc	1991	антисмысловая	23
AUAGCAAUAACCGUG AAAAU	896	asusagcaAfuAfAfCfc ugugaaaaL96	1992	смысловая	21
AUUUUCACAGGUUAU GCUAUCC	897	asUfsuuCfaCfAfggu uAfuUfgcuauusc	1993	антисмысловая	23
AAUCACAUCUUUAGUG UCUGA	898	asasucacAfuCfUfUfu agugucugaL96	1994	смысловая	21
UCAGACACUAAAGAUG UGAUUGG	899	usCfsagaCfaCfUfaaa gAfuGfugauusgsg	1995	антисмысловая	23
AUCACAUCUUUAGUGU CUGAA	900	asuscacaUfcUfUfUfa gugucugaaL96	1996	смысловая	21
UUCAGACACUAAAGAU GUGAUUG	901	usUfscagAfcAfCfuua aGfaUfgugaususg	1997	антисмысловая	23
UUCCAAUCACAUCUUU AGUGU	902	ususccaaUfcAfCfAfu cuuuaguguL96	1998	смысловая	21
ACACUAAAGAUGUGAU UGGAAAU	903	asCfsacuAfaAfGfauug uGfaUfuggaasasu	1999	антисмысловая	23
UUUCCAAUCACAUCUU UAGUG	904	ususuccaAfuCfAfCfa ucuuuagugL96	2000	смысловая	21
CACUAAAGAUGUGAUU GGAAAU	905	csAfsquaAfaGfAfugu gAfuUfggaaasusc	2001	антисмысловая	23
ACGGGCAUGAUGUUGA GUUCC	906	ascsgggcAfuGfAfUfg uugaguuccL96	2002	смысловая	21
GGAACUCAACAUCAUG CCCGUUC	907	gsGfsaacUfcAfAfcau cAfuGfcccususc	2003	антисмысловая	23

CGGGCAUGAUGUUGAG UUCU	908	csgsggcaUfgAfUfGfu ugaguuccuL96	2004	смысловая	21
AGGAACUCAACAUCAU GCCCCGU	909	asGfsgaaCfuCfAfaca uCfaUfgcccgssusu	2005	антисмысловая	23
GGGAACGGGCAUGAUG UUGAG	910	gsgsgaacGfgGfCfAfu gauguugagL96	2006	смысловая	21
CUCAACAUCAUGCCCG UCCCCAG	911	csUfscaaCfaUfCfaug cCfcGfuucccsasg	2007	антисмысловая	23
UGGGAACGGGCAUGAU GUUGA	912	usgsggaaCfgGfGfCfa ugauguugaL96	2008	смысловая	21
UCAACAUCAUGCCCGU UCCCCAGG	913	usCfsaacAfuCfAfugc cCfgUfucccasgsg	2009	антисмысловая	23
ACUAAGGUGAAAAGAU AAUGA	914	ascsuaagGfuGfAfAfa agauaaugaL96	2010	смысловая	21
UCAUUAUCUUUUCACC UUAGUGU	915	usCfsauuAfuCfUfuuu cAfcCfuagusgsu	2011	антисмысловая	23
CUAAGGUGAAAAGAU AUGAU	916	csusaaggUfgAfAfAfa gauaaugauL96	2012	смысловая	21
AUCAUUAUCUUUUCAC CUUAGUG	917	asUfscauUfaUfCfuuu uCfaCfcuagsusg	2013	антисмысловая	23
AAACACUAAGGUGAAA AGAU	918	asasacacUfaAfGfGfu gaaaagauL96	2014	смысловая	21
UAUCUUUUCACCUUAG UGUUUGC	919	usAfsucuUfuUfCfacc uUfaGfuguusgsc	2015	антисмысловая	23
CAAACACUAAGGUGAA AAGAU	920	csasaacaCfuAfAfGfg ugaaaagauL96	2016	смысловая	21
AUCUUUUCACCUUAGU GUUUGCU	921	asUfscuuUfuCfAfccu uAfgUfguugsusu	2017	антисмысловая	23
AGGUAGCACUGGAGAG AAUUG	922	asgsguagCfaCfUfGfg agagaauugL96	2018	смысловая	21
CAAUUCUCUCCAGUGC UACCUUC	923	csAfsauuCfuCfUfcca gUfgCfuaccususc	2019	антисмысловая	23
GGUAGCACUGGAGAGA AUUGG	924	gsgsuagCfcUfGfGfa gagaauuggL96	2020	смысловая	21
CCAAUUCUCUCCAGUG CUACCUU	925	csCfsaauUfcUfCfucc aGfuGfcuaccsusu	2021	антисмысловая	23
GAGAAGGUAGCACUGG AGAGA	926	gsasgaagGfuAfGfCfa cuggagagaL96	2022	смысловая	21

UCUCUCCAGUGCUACC UUCUCAA	927	usCfsucuCfcAfGfugc uAfcCfuucucsasa	2023	антисмысловая	23
UGAGAAGGUAGCACUG GAGAG	928	usgsagaaGfgUfAfGfc acuggagagL96	2024	смысловая	21
CUCUCCAGUGCUACCU UCUCAA	929	csUfscucCfaGfUfgcu aCfcUfucucasasa	2025	антисмысловая	23
AGUGGACUUGCUGCAU AUGUG	930	asgsuggaCfuUfGfCfu gcauauugL96	2026	смысловая	21
CACAUAUGCAGCAAGU CCACUGU	931	csAfscauAfuGfCfagc aAfgUfccacusgsu	2027	антисмысловая	23
GUGGACUUGCUGCAUA UGUGG	932	gsusggacUfuGfCfUfg cauauuggL96	2028	смысловая	21
CCACAUAUGCAGCAAG UCCACUG	933	csCfsacaUfaUfGfcag cAfaGfuccacsusg	2029	антисмысловая	23
CGACAGUGGACUUGCU GCAUA	934	csgsacagUfgGfAfCfu ugcugcauL96	2030	смысловая	21
UAUGCAGCAAGUCCAC UGUCGUC	935	usAfsugcAfgCfAfagu cCfaCfugucgsusc	2031	антисмысловая	23
ACGACAGUGGACUUGC UGCAU	936	ascsgacaGfuGfGfAfc uugcugcauL96	2032	смысловая	21
AUGCAGCAAGUCCACU GUCGUCU	937	asUfsgcaGfcAfAfguc cAfcUfgucguscsu	2033	антисмысловая	23
AAGGUGUUCAAGAUGU CCUCG	938	asasggugUfuCfAfAfg auguccucgL96	2034	смысловая	21
CGAGGACAUCUUGAAC ACCUUUC	939	csGfsaggAfcAfUfcuu gAfaCfaccuususc	2035	антисмысловая	23
AGGUGUUCAAGAUGUC CUCGA	940	asgsguguUfcAfAfGfa uguccucgaL96	2036	смысловая	21
UCGAGGACAUCUUGAA CACCUUU	941	usCfsgagGfaCfAfucu uGfaAfcaccususu	2037	антисмысловая	23
GAGAAAGGUGUUCAAG AUGUC	942	gsasgaaaGfgUfGfUfu caagaugucL96	2038	смысловая	21
GACAUCUUGAACACCU UUCUCCC	943	gsAfscauCfuUfGfaac aCfcUfuucucscsc	2039	антисмысловая	23
GGAGAAAGGUGUUCAA GAUGU	944	gsagsagaaAfgGfUfGfu ucaagauguL96	2040	смысловая	21
ACAUCUUGAACACCUU UCUCCCC	945	asCfsaucUfuGfAfaca cCfuUfucuccscsc	2041	антисмысловая	23

AACCGUCUGGAUGAUG UGCGU	946	asascgucCfuGfGfAfu gaugugcguL96	2042	смысловая	21
ACGCACAUCAUCCAGA CGGUUGC	947	asCfsgcaCfaUfCfauc cAfgAfcgguusgsc	2043	антисмысловая	23
ACCGUCUGGAUGAUGU GCGUA	948	ascscgucUfgGfAfUfg augugcguL96	2044	смысловая	21
UACGCACAUCAUCCAG ACGGUUG	949	usAfsccgCfCfUfcau cCfaGfacggususg	2045	антисмысловая	23
GGGCAACCGUCUGGAU GAUGU	950	gsgsgcaaCfcGfUfCfu ggaugauguL96	2046	смысловая	21
ACAUCAUCCAGACGGU UGCCCAG	951	asCfsaucAfuCfCfaga cGfgUfugcccsasg	2047	антисмысловая	23
UGGGCAACCGUCUGGA UGAUG	952	usgsggcaAfcCfGfUfc uggaugaugL96	2048	смысловая	21
CAUCAUCCAGACGGUU GCCCAGG	953	csAfsucaUfcCfAfgac gGfuUfgcccasgsg	2049	антисмысловая	23
GAAACUUUGGCUGAUA AUUUU	954	gsasaacuUfuGfGfCfu gauaauuuL96	2050	смысловая	21
AAUAUUUAUCGCCAA GUUUCUU	955	asAfsuauUfaUfCfagc cAfaAfguuucsusu	2051	антисмысловая	23
AAACUUUGGCUGAUAA UAUUG	956	asasacuuUfgGfCfUfg auaauauugL96	2052	смысловая	21
CAUAUUUAUCGCCAA AGUUUCU	957	csAfsauaUfuAfUfcag cCfaAfaguuuscsu	2053	антисмысловая	23
UGAAGAAACUUUGGCU GAUAA	958	usgsaagaAfaCfUfUfu ggcugauaaL96	2054	смысловая	21
UUAUCAGCCAAAGUUU CUUCAUC	959	usUfsaucAfgCfCfaaa gUfuUfcuucasusc	2055	антисмысловая	23
AUGAAGAAACUUUGGC UGAUA	960	asusgaagAfaCfCfUfu uggcugauaL96	2056	смысловая	21
UAUCAGCCAAAGUUUC UUCAUCA	961	usAfsucaGfcCfAfaag uUfuCfucauscsa	2057	антисмысловая	23
AAAGGUGUUAAGAUG UCCUC	962	asasagguGfuUfCfAfa gauguccucL96	2058	смысловая	21
GAGGACAUCUUGAACA CCUUUCU	963	gsAfsggaCfaUfCfuug aAfcAfccuuuscsu	2059	антисмысловая	23
AAGGUGUUAAGAUGU CCUCG	964	asasggugUfuCfAfAfg auguccucgL96	2060	смысловая	21

CGAGACAUCUUGAAC ACCUUUC	965	csGfsaggAfcAfUfcuu gAfaCfaccuususc	2061	антисмысловая	23
GGAGAAAGGUGUCAA GAUGU	966	gsgsagaaAfgGfUfGfu ucaagauguL96	2062	смысловая	21
ACAUCUUGAACACCUU UCUCCCC	967	asCfsaucUfuGfAfaca cCfuUfucuccscsc	2063	антисмысловая	23
GGGAGAAAGGUGUUA AGAUG	968	gsgsgagaAfaGfGfUfg uucaagaugL96	2064	смысловая	21
CAUCUUGAACACCUUU CUCCCCC	969	csAfsucuUfgAfAfcac cUfuUfcuccscsc	2065	антисмысловая	23
AAAUCAGUACUCCAA AGUCU	970	asasaucGfuAfCfUfu ccaaagucuL96	2066	смысловая	21
AGACUUUGGAAGUACU GAUUUAG	971	asGfsacuUfuGfGfaag uAfcUfgauusasg	2067	антисмысловая	23
AAUCAGUACUCCAAA GUCUA	972	asasucagUfaCfUfUfc caaagucuaL96	2068	смысловая	21
UAGACUUUGGAAGUAC UGAUUUA	973	usAfsgacUfuUfGfgaa gUfaCfugauususa	2069	антисмысловая	23
UGCUAUAUCAGUACUU CCAAA	974	usgscuaaAfuCfAfGfu acuuccaaaL96	2070	смысловая	21
UUUGGAAGUACUGAUU UAGCAUG	975	usUfsuggAfaGfUfacu gAfuUfuagcasusg	2071	антисмысловая	23
AUGCUAAAUCAGUACU UCCAA	976	asusgcuaAfaUfCfAfg uacuuccaaL96	2072	смысловая	21
UUGGAAGUACUGAUUU AGCAUGU	977	usUfsggaAfgUfAfcug aUfuUfagcausgsu	2073	антисмысловая	23
ACAUCUUUAGUGUCUG AAUAU	978	ascsaucuUfuAfGfUfg ucugaauauL96	2074	смысловая	21
AUAUUCAGACACUAAA GAUGUGA	979	asUfsauuCfaGfAfcac uAfaAfgaugusgsa	2075	антисмысловая	23
CAUCUUUAGUGUCUGA AUAUA	980	csasucuuUfaGfUfGfu cugaauauaL96	2076	смысловая	21
UAUAUUCAGACACUAA AGAUGUG	981	usAfsuauUfcAfGfaca cUfaAfagaugsusg	2077	антисмысловая	23
AAUCACAUCUUUAGUG UCUGA	982	asasucacAfuCfUfUfu agugucugaL96	2078	смысловая	21
UCAGACACUAAAGAUG UGAUUGG	983	usCfsagaCfaCfUfaaa gAfuGfugauusgsg	2079	антисмысловая	23

CAAUCACAUCUUUAGU GUCUG	984	csasaucaCfaUfCfUfu uagugucugL96	2080	смысловая	21
CAGACACUAAAGAUGU GAUUGGA	985	csAfgacAfcUfAfaag aUfgUfgauugsgsa	2081	антисмысловая	23
GCAUGUAUUACUUGAC AAAGA	986	gscsauguAfuUfAfCfu ugacaaagaL96	2082	смысловая	21
UCUUUGUCAAGUAAUA CAUGCUG	987	usCfsuuGfuCfAfagu aAfuAfcaugcsusg	2083	антисмысловая	23
CAUGUAUUACUUGACA AAGAG	988	csasuguaUfuAfCfUfu gacaaagagL96	2084	смысловая	21
CUCUUUGUCAAGUAAU ACAUGCU	989	csUfscuuUfgUfCfaag uAfaUfacaugscsu	2085	антисмысловая	23
UUCAGCAUGUAUUACU UGACA	990	ususcagcAfuGfUfAfu uacuugacaL96	2086	смысловая	21
UGUCAAGUAAUACAUG CUGAAAA	991	usGfsucaAfgUfAfaua cAfuGfcugaasasa	2087	антисмысловая	23
UUUCAGCAUGUAUUAC UUGAC	992	ususucagCfaUfGfUfa uuacuugacL96	2088	смысловая	21
GUCAAGUAAUACAUGC UGAAAAA	993	gsUfscaaGfuAfAfua aUfgCfugaaasasa	2089	антисмысловая	23
AUGUUACUUCUAGAG AGAAA	994	asusguuaCfuUfCfUfu agagagaaaL96	2090	смысловая	21
UUUCUCUUAAGAAGU AACAUAC	995	usUfsucuCfuCfUfaag aAfgUfaacausasc	2091	антисмысловая	23
UGUUACUUCUAGAGA GAAAU	996	usgsuuacUfuCfUfUfa gagagaaauL96	2092	смысловая	21
AUUUCUCUCUAGAAG UAACAU	997	asUfsuucUfcUfCfu gAfaGfuaacasusa	2093	антисмысловая	23
AUGUAUGUUACUUCU AGAGA	998	asusguauGfuUfAfCfu ucuuagagaL96	2094	смысловая	21
UCUCUAAGAAGUACA UACAUCC	999	usCfsucuAfaGfAfagu aAfcAfuauscsc	2095	антисмысловая	23
GAUGUAUGUUACUUCU UAGAG	1000	gsasuguaUfgUfUfAfc uucuuagagL96	2096	смысловая	21
CUCUAAGAAGUACAU ACAUCU	1001	csUfscuaAfgAfAfgua aCfaUfacaucscsu	2097	антисмысловая	23
ACAACUUUGAGAAGGU AGCAC	1002	ascsaacuUfuGfAfGfa agguagcacL96	2098	смысловая	21

GUGCUACCUUCUCAA GUUGUGA	1003	gsUfsgcuAfcCfUfucu cAfaAfguugusgsa	2099	антисмысловая	23
CAACUUUGAGAAGGUA GCACU	1004	csasacuuUfgAfGfAfa gguagcacuL96	2100	смысловая	21
AGUGCUACCUUCUCAA AGUUGUG	1005	asGfsugcUfaCfCfuuc uCfaAfaguugsusg	2101	антисмысловая	23
AUUCACAACUUUGAGA AGGUA	1006	asusucacAfaCfUfUfu gagaagguaL96	2102	смысловая	21
UACCUUCUCAAAGUUG UGAAUCA	1007	usAfscuuUfcUfCfaaa gUfuGfugaauscsa	2103	антисмысловая	23
GAUUCACAACUUUGAG AAGGU	1008	gsasuucacfaAfCfUfu ugagaagguaL96	2104	смысловая	21
ACCUUCUCAAAGUUGU GAAUCAG	1009	asCfscuuCfuCfAfaag uUfgUfgaauuscsa	2105	антисмысловая	23
AACAUGCUAAAUCAGU ACUUC	1010	asascaugCfuAfAfAfu caguacuucL96	2106	смысловая	21
GAAGUACUGAUUUAGC AUGUUGU	1011	gsAfsaguAfcUfGfauu uAfgCfauguusgsu	2107	антисмысловая	23
ACAUGCUAAAUCAGUA CUUCC	1012	ascsaugcUfaAfAfUfc aguacuuccL96	2108	смысловая	21
GGAAGUACUGAUUUAG CAUGUUG	1013	gsGfsaagUfaCfUfgau uUfaGfcaugusug	2109	антисмысловая	23
GAACAACUAGCUAAA CAGUA	1014	gsasacaaCfaUfGfCfu aaaucaguaL96	2110	смысловая	21
UACUGAUUUAGCAUGU UGUUCAU	1015	usAfscugAfuUfUfagc aUfgUfuguucsasu	2111	антисмысловая	23
UGAACAACUAGCUAAA UCAGU	1016	usgsaacaAfcAfUfGfc uaaaucaguL96	2112	смысловая	21
ACUGAUUUAGCAUGUU GUUCAUA	1017	asCfsugaUfuUfAfgca uGfuUfguucasusa	2113	антисмысловая	23
AAACCAGUACUUUAUC AUUUU	1018	asasaccaGfuAfCfUfu uaucauuuuL96	2114	смысловая	21
AAAUGAUAAAAGUACU GGUUUCA	1019	asAfsaauGfaUfAfaag uAfcUfgguuuscsa	2115	антисмысловая	23
AACCAGUACUUUAUCA UUUUC	1020	asasccagUfaCfUfUfu aucauuuucL96	2116	смысловая	21
GAAAUGAUAAAAGUAC UGGUUUC	1021	gsAfsaaaUfgAfUfaaa gUfaCfugguususc	2117	антисмысловая	23

UUUGAAACCAGUACUU UAUCA	1022	ususugaaAfcCfAfGfu acuuuaucaL96	2118	смысловая	21
UGAUAAAGUACUGGUU UCAAAAU	1023	usGfsauaAfaGfUfacu gGfuUfucaaasasu	2119	антисмысловая	23
UUUUGAAACCAGUACU UUAUC	1024	ususugaAfaCfCfAfg uacuuuaucl96	2120	смысловая	21
GAUAAAGUACUGGUUU CAAAAUU	1025	gsAfsuaaAfgUfAfcug gUfuUfcaaaasusu	2121	антисмысловая	23
GAGAAGAUGGGCUACA AGGCC	1026	gsasgaagAfuGfGfGfc uacaaggccL96	2122	смысловая	21
GGCCUUGUAGCCCAUC UUCUCUG	1027	gsGfscuUfgUfAfgcc cAfuCfuucucsusg	2123	антисмысловая	23
AGAAGAUGGGCUACAA GGCCA	1028	asgsaagaUfgGfGfCfu acaaggccaL96	2124	смысловая	21
UGGCCUUGUAGCCCAU CUUCUCU	1029	usGfsgccUfuGfUfagc cCfaUfcuucuscscu	2125	антисмысловая	23
GGCAGAGAAGAUGGGC UACAA	1030	gsgscagaGfaAfGfAfu gggcuacaaL96	2126	смысловая	21
UUGUAGCCCAUCUUCU CUGCCUG	1031	usUfsguaGfcCfCfauc uUfcUfcugccsusg	2127	антисмысловая	23
AGGCAGAGAAGAUGGG CUACA	1032	asgsgcagAfgAfAfGfa ugggcuacaL96	2128	смысловая	21
UGUAGCCCAUCUUCUC UGCCUGC	1033	usGfsuagCfcCfAfuc uCfuCfugccusgsc	2129	антисмысловая	23
AACGGGCAUGAUGUUG AGUUC	1034	asascgggCfaUfGfAfu guugaguucL96	2130	смысловая	21
GAACUCAACAUCUAGC CCGUUCC	1035	gsAfsacuCfaAfCfauc aUfgCfccguuscsc	2131	антисмысловая	23
ACGGGCAUGAUGUUGA GUUCC	1036	ascsgggcAfuGfAfUfg uugaguuccL96	2132	смысловая	21
GGAACUCAACAUCUAG CCCGUUC	1037	gsGfsaacUfcAfAfcau cAfuGfcccgususc	2133	антисмысловая	23
UGGGAACGGGCAUGAU GUUGA	1038	usgsggaaCfGfGfCfa ugauguugaL96	2134	смысловая	21
UCAACAUCUAGCCCGU UCCCAGG	1039	usCfsaacAfuCfAfugc cCfGfUfcccasgsg	2135	антисмысловая	23
CUGGGAACGGGCAUGA UGUUG	1040	csusgggaAfcGfGfGfc augauguugL96	2136	смысловая	21

CAACAUC AUGCCGUU CCCAGGG	1041	csAfsacaUfcAfUfgcc cGfuUfccagsgsg	2137	антисмысловая	23
AUGUGGCUAAAGCAAU AGACC	1042	asusguggCfuAfAfAfg caauagaccL96	2138	смысловая	21
GGUCUAUUGCUUUAGC CACAUAU	1043	gsGfsucuAfuUfGfcuu uAfgCfcacausasu	2139	антисмысловая	23
UGUGGCUAAAGCAAUA GACCC	1044	usgsuggcUfaAfAfGfc aauagaccL96	2140	смысловая	21
GGGUCUAUUGCUUUAG CCACAU	1045	gsGfsgucUfaUfUfgcu uUfaGfccacasusa	2141	антисмысловая	23
GCAUAUGUGGCUAAAG CAAUA	1046	gscauauGfuGfGfcfu aaagcauaL96	2142	смысловая	21
UAUUGCUUUAGCCACA UAUGCAG	1047	usAfsuugCfuUfUfagc cAfcAfuaugcsasg	2143	антисмысловая	23
UGCAUAUGUGGCUAAA GCAAU	1048	usgscauaUfgUfGfGfc uaaagcaauL96	2144	смысловая	21
AUUGCUUUAGCCACA AUGCAGC	1049	asUfsugcUfuUfAfgcc aCfaUfaugcasgsc	2145	антисмысловая	23
AGGAUGCUCCGGAAUG UUGCU	1050	asgsgaugCfuCfCfGfg aauugucL96	2146	смысловая	21
AGCAACAUCCGGAGC AUCCUUG	1051	asGfscaaCfaUfUfccg gAfgCfauccusug	2147	антисмысловая	23
GGAUGCUCCGGAAUGU UGCUG	1052	gsgsaugcUfcCfGfGfa auguugcugL96	2148	смысловая	21
CAGCAACAUCCGGAG CAUCCUU	1053	csAfsgcaAfcAfUfucc gGfaGfcauccsusu	2149	антисмысловая	23
UCCAAGGAUGCUCCGG AAUGU	1054	uscscaagGfaUfGfCfu ccggaauL96	2150	смысловая	21
ACAUCCGGAGCAUCC UUGGAUA	1055	asCfsauuCfcGfGfagc aUfcCfuuggasusa	2151	антисмысловая	23
AUCCAAGGAUGCUCCG GAAUG	1056	asusccaaGfgAfUfGfc uccggaugL96	2152	смысловая	21
CAUCCGGAGCAUCCU UGGAUAC	1057	csAfsuucCfGfAfgca uCfcUfuggausasc	2153	антисмысловая	23
UCACAUCUUUAGUGUC UGAAU	1058	uscsacauCfuUfUfAfg ugucugaauL96	2154	смысловая	21
AUUCAGACACUAAAGA UGUGAUU	1059	asUfsucaGfaCfAfcua aAfgAfugugasusu	2155	антисмысловая	23

CACAUCUUUAGUGUCU GAAUA	1060	csascaucUfuUfAfGfu gucugaauaL96	2156	смысловая	21
UAUUCAGACACUAAAG AUGUGAU	1061	usAfsuucAfgAfCfacu aAfaGfaugugsasu	2157	антисмысловая	23
CCAAUCACAUCUUUAG UGUCU	1062	cscsaauCfcAfUfCfu uuagugucuL96	2158	смысловая	21
AGACACUAAAGAUGUG AUUGGAA	1063	asGfsacaCfuAfAfaga uGfuGfauuggsasa	2159	антисмысловая	23
UCCAAUCACAUCUUUA GUGUC	1064	uscscaauCfaCfAfUfc uuuagugucL96	2160	смысловая	21
GACACUAAAGAUGUGA UUGGAAA	1065	gsAfscaCfUfAfAfgau gUfgAfuuggasasa	2161	антисмысловая	23
AAAUGUGUUUAGACAA CGUCA	1066	asasauguGfuUfUfAfg acaacgucaL96	2162	смысловая	21
UGACGUUGUCUAAACA CAUUUUC	1067	usGfsacgUfuGfUfcua aAfcAfcauuususc	2163	антисмысловая	23
AAUGUGUUUAGACAAC GUCAU	1068	asasugugUfuUfAfGfa caacgucauL96	2164	смысловая	21
AUGACGUUGUCUAAAC ACAUUUU	1069	asUfsgacGfuUfGfucu aAfaCfacauususu	2165	антисмысловая	23
UUGAAAUGUGUUUAG ACAAC	1070	ususgaaaAfuGfUfGfu uuagacaacL96	2166	смысловая	21
GUUGUCUAAACACAUU UUCAAUG	1071	gsUfsuguCfuAfAfaca cAfuUfucaasusg	2167	антисмысловая	23
AUUGAAAUGUGUUUA GACAA	1072	asusugaaAfaUfGfUfg uuuagacaaL96	2168	смысловая	21
UUGUCUAAACACAUUU UCAAUGU	1073	usUfsgucUfaAfAfcac aUfuUfucaausgsu	2169	антисмысловая	23
UACUAAAGGAAGAAUU CCGGU	1074	usascuaaAfgGfAfAfg aaauccggguL96	2170	смысловая	21
ACCGGAUUUCUCCUU UAGUAUC	1075	asCfscggAfaUfUfcuu cCfuUfuaguasusc	2171	антисмысловая	23
ACUAAAGGAAGAAUUC CGGUU	1076	ascsuaaaGfgAfAfGfa auuccggguL96	2172	смысловая	21
AACCGGAUUUCUCCU UUAGUAU	1077	asAfscggGfaAfUfucu uCfcUfuagusasasu	2173	антисмысловая	23
GAGAUACUAAAGGAAG AAUUC	1078	gsasgauaCfuAfAfAfg gaagaauucL96	2174	смысловая	21

GAAUUCUCCUUUAGU AUCUCGA	1079	gsAfsauuCfuUfCfcuu uAfgUfaucucsgsa	2175	антисмысловая	23
CGAGAUACUAAAGGAA GAAUU	1080	csgsagauAfcUfAfAfa ggaagaauL96	2176	смысловая	21
AAUUCUCCUUUAGUA UCUCGAG	1081	asAfsuucUfuCfCfuuu aGfuAfucucgsasg	2177	антисмысловая	23
AACUUUGGCUGAUAAU AUUGC	1082	asascuuGfgCfUfGfa uaauauugcL96	2178	смысловая	21
GCAAUAUUUACAGCCA AAGUUUC	1083	gsCfsaauAfuUfAfuca gCfcAfaaguususc	2179	антисмысловая	23
ACUUUGGCUGAUAAUA UUGCA	1084	ascsuuugGfcUfGfAfu aaauuugcaL96	2180	смысловая	21
UGCAAUAUUUACAGCC AAGUUU	1085	usGfscaaUfaUfUfauc aGfcCfaaagususu	2181	антисмысловая	23
AAGAAACUUUGGCUGA UAAUA	1086	asasgaaaCfuUfUfGfg cugauaauL96	2182	смысловая	21
UAUUUACAGCCAAAGU UUCUUA	1087	usAfsuuaUfcAfGfcca aAfgUfuucuuscsa	2183	антисмысловая	23
GAAGAAACUUUGGCUG AUAUU	1088	gsasagaaAfcUfUfUfg gcugauaauL96	2184	смысловая	21
AUUUACAGCCAAAGUU UCUUAU	1089	asUfsuauCfaGfCfcaa aGfuUfucucsasus	2185	антисмысловая	23
AAAUGGCUGAGAAGAC UGACA	1090	asasauggCfuGfAfGfa agacugacaL96	2186	смысловая	21
UGUCAGUCUUCUCAGC CAUUUGA	1091	usGfsucaGfuCfUfuc cAfgCfcauuusgsa	2187	антисмысловая	23
AAUGGCUGAGAAGACU GACAU	1092	asasuggcUfgAfGfAfa gacugacauL96	2188	смысловая	21
AUGUCAGUCUUCUCAG CCAUUUG	1093	asUfsgucAfgUfCfuuc uCfaGfccauusug	2189	антисмысловая	23
UAUCAAAUGGCUGAGA AGACU	1094	usasucaaAfuGfGfCfu gagaagacuL96	2190	смысловая	21
AGUCUUCUCAGCCAUU UGAUUUC	1095	asGfsucuUfcUfCfagc cAfuUfugauasusc	2191	антисмысловая	23
AUAUCAAAUGGCUGAG AAGAC	1096	asusaucaAfaUfGfGfc ugagaagacL96	2192	смысловая	21
GUCUUCUCAGCCAUUU GAUAUCU	1097	gsUfscuuCfuCfAfgcc aUfuUfgauauscsu	2193	антисмысловая	23

GUGGUUCUAAAUGU AAGCU	1098	gsusgguuCfuUfAfAfa uuguaagcuL96	2194	смысловая	21
AGCUUACAAUUUAGA ACCACUG	1099	asGfscuuAfcAfAfuuu aAfgAfaccacsusg	2195	антисмысловая	23
UGGUUCUAAAUGUA AGCUC	1100	usgsguucUfuAfAfAfu uguaagcucL96	2196	смысловая	21
GAGCUUACAAUUUAG AACCACU	1101	gsAfsgcuUfaCfAfauu uAfaGfaaccascsu	2197	антисмысловая	23
AACAGUGGUUCUAAA UUGUA	1102	asascaguGfgUfUfCfu uaaaauguaL96	2198	смысловая	21
UACAAUUUAGAACCA CUGUUUU	1103	usAfscAAUfuUfAfaga aCfcAfcuguususu	2199	антисмысловая	23
AAACAGUGGUUCUAA AUUGU	1104	asasacagUfgGfUfUfc uuaaauguL96	2200	смысловая	21
ACAAUUUAGAACCAC UGUUUUUA	1105	asCfsaauUfuAfAfgaa cCfaCfuguuususa	2201	антисмысловая	23
AAGUCAUCGACAAGAC AUUGG	1106	asasgucaUfcGfAfCfa agacauuggL96	2202	смысловая	21
CAAUGUCUUGUCGAU GACUUUC	1107	csCfsaauGfuCfUfugu cGfaUfgacuususc	2203	антисмысловая	23
AGUCAUCGACAAGACA UUGGU	1108	asgsucauCfgAfCfAfa gacauugguL96	2204	смысловая	21
ACCAAUGUCUUGUCGA UGACUUU	1109	asCfscaaUfgUfCfuug uCfgAfugacususu	2205	антисмысловая	23
GUGAAAGUCAUCGACA AGACA	1110	gsusgaaaGfuCfAfUfc gacaagacaL96	2206	смысловая	21
UGUCUUGUCGAUGACU UUCACAU	1111	usGfsucuUfgUfCfgau gAfcUfuacacsasu	2207	антисмысловая	23
UGUGAAAGUCAUCGAC AAGAC	1112	usgsugaaAfgUfCfAfu cgacaagacL96	2208	смысловая	21
GUCUUGUCGAUGACUU UCACAUU	1113	gsUfscuuGfuCfGfauG aCfuUfucacasusu	2209	антисмысловая	23
GAUAAUAUUGCAGCAU UUUCC	1114	gsasuaauAfuUfGfCfa gcuuuuuccL96	2210	смысловая	21
GGAAAAUGCUGCAUA UUAUCAG	1115	gsGfsaaaAfuGfCfugc aAfuAfuaucsasg	2211	антисмысловая	23
AUAAUAUUGCAGCAUU UUCCA	1116	asusaauaUfuGfCfAfg cauuuuccaL96	2212	смысловая	21

UGGAAAUGCUGCAAU AUUAUCA	1117	usGfsgaaAfaUfGfcug cAfaUfauuascsa	2213	антисмысловая	23
GGCUGAUAAUUAUGCA GCAUU	1118	gsgscugaUfaAfUfAfu ugcagcauuL96	2214	смысловая	21
AAUGCUGCAAUAUUAU CAGCCAA	1119	asAfsugcUfgCfAfaa uUfaUfcagccsasa	2215	антисмысловая	23
UGGCUGAUAAUUAUGC AGCAU	1120	usgsgcugAfuAfAfUfa uugcagcauL96	2216	смысловая	21
AUGCUGCAAUAUUAUC AGCCAAA	1121	asUfsgcuGfcAfAfuau uAfuCfagccasasa	2217	антисмысловая	23
GCUAUUUGUAUCAAU GAUUA	1122	gscsuaauUfuGfUfAfu caaugauuaL96	2218	смысловая	21
UUAUCAUUGAUACAAA UUAGCCG	1123	usAfsaucAfuUfGfaa cAfaAfuagcscsg	2219	антисмысловая	23
CUAAUUUGUAUCAAUG AUUAU	1124	csusaauUfgUfAfUfc aaugauuaL96	2220	смысловая	21
AUAAUCAUUGAUACAA AUUAGCC	1125	asUfsaauCfaUfUfgau aCfaAfaauagscsc	2221	антисмысловая	23
CCCGGCUAAUUUGUAU CAAUG	1126	cscscggcUfaAfUfUfu guaucaaugL96	2222	смысловая	21
CAUUGAUACAAAUUAG CCGGGGG	1127	csAfsuugAfuAfCfaaa uUfaGfccggsgsg	2223	антисмысловая	23
CCCCGGCUAAUUUGUA UCAAU	1128	cscscggCfuAfAfUfu uguaucaauL96	2224	смысловая	21
AUUGAUACAAAUUAGC CGGGGGA	1129	asUfsugaUfaCfAfaa uAfgCfcggggsgsa	2225	антисмысловая	23
UAAUUGGUAUACUUC UUUGA	1130	usasauugGfuGfAfUfa cuucuugaL96	2226	смысловая	21
UCAAGAAGUAUCACC AAUUACC	1131	usCfsaaaGfaAfGfuau cAfcCfaauascsa	2227	антисмысловая	23
AAUUGGUGAUACUUCU UUGAA	1132	asasuugUfgAfUfAfc uucuugaaL96	2228	смысловая	21
UUCAAAGAAGUAUCAC CAAUUAC	1133	usUfscaaAfgAfAfgua uCfaCfcaauusasc	2229	антисмысловая	23
GCGGUAUUGGUGAUA CUUCU	1134	gscsgguaAfuUfGfGfu gauacuucuL96	2230	смысловая	21
AGAAGUAUCACCAAUU ACCGCCA	1135	asGfsaagUfaUfCfacc aAfuUfaccgcsa	2231	антисмысловая	23

GGCGGUAAUUGGUGAU ACUUC	1136	gsgscgguAfaUfUfGfg ugauacuucL96	2232	смысловая	21
GAAGUAUCACCAAUUA CCGCCAC	1137	gsAfsaguAfuCfAfcca aUfuAfccgccsasc	2233	антисмысловая	23
CAGUGGUUCUUAUUU GUAAG	1138	csasguggUfuCfUfUfa aauguaagL96	2234	смысловая	21
CUUACAAUUUAAGAAC CACUGUU	1139	csUfsuacAfaUfUfuua gAfaCfcacugsusu	2235	антисмысловая	23
AGUGGUUCUUAUUUG UAAGC	1140	asgsugguUfcUfUfAfa auuguaagcL96	2236	смысловая	21
GCUUACAAUUUAAGAA CCACUGU	1141	gsCfsuuaCfaAfUfuua aGfaAfccacusgsu	2237	антисмысловая	23
AAAACAGUGGUUCUUA AAUUG	1142	asasaacaGfuGfGfUfu cuuaauugL96	2238	смысловая	21
CAUUUUAGAACCACU GUUUUAA	1143	csAfsauuUfaAfGfaac cAfCfUfguuusasa	2239	антисмысловая	23
UAAAACAGUGGUUCUU AAAUU	1144	usasaaacAfgUfGfGfu ucuuaauuL96	2240	смысловая	21
AAUUUAAGAACCACUG UUUUAAA	1145	asAfsuuuAfaGfAfacc aCfuGfuuuasasa	2241	антисмысловая	23
ACCUGUAUUCUGUUUA CAUGU	1146	ascscuguAfuUfCfUfg uuacauguL96	2242	смысловая	21
ACAUGUAAACAGAAUA CAGGUUA	1147	asCfsaugUfaAfAfcag aAfuAfcaggususa	2243	антисмысловая	23
CCUGUAUUCUGUUUAC AUGUC	1148	cscsuguaUfuCfUfGfu uuacaugucL96	2244	смысловая	21
GACAUGUAAACAGAAU ACAGGUU	1149	gsAfscauGfuAfAfaca gAfaUfacaggsusu	2245	антисмысловая	23
AUUAACCGUAUUCUG UUUAC	1150	asusuaacCfuGfUfAfu ucuguuuacL96	2246	смысловая	21
GUAAACAGAAUACAGG UUAAUAA	1151	gsUfsaaaCfaGfAfaua cAfgGfuuaasasa	2247	антисмысловая	23
UAUUAACCGUAUUCU GUUUA	1152	usasuaaCfcUfGfUfa uucuguuuuL96	2248	смысловая	21
UAAACAGAAUACAGGU UAAUAAA	1153	usAfsaacAfgAfAfuac aGfgUfuauasasa	2249	антисмысловая	23
AAGAAACUUUGGCUGA UAAUA	1154	asasgaaaCfuUfUfGfg cugauaauaL96	2250	смысловая	21

UAUUUAUCAGCCAAAGU UUCUUCA	1155	usAfsuuaUfcAfGfcca aAfgUfuucuscscsa	2251	антисмысловая	23
AGAAACUUUGGCUGAU AAUAU	1156	asgsaaacUfuUfGfGfc ugauaaauL96	2252	смысловая	21
AUAUUUAUCAGCCAAAG UUUCUUC	1157	asUfsauuAfuCfAfgcc aAfaGfuucuscusc	2253	антисмысловая	23
GAUGAAGAAACUUUGG CUGAU	1158	gsasugaaGfaAfAfCfu uuggcugauL96	2254	смысловая	21
AUCAGCCAAAGUUUCU UCAUCAU	1159	asUfscagCfcAfAfagu uUfcUfcaucsasus	2255	антисмысловая	23
UGAUGAAGAAACUUUG GCUGA	1160	usgsaugaAfgAfAfAfc uuuggcugaL96	2256	смысловая	21
UCAGCCAAAGUUUCU CAUCAU	1161	usCfsagcCfaAfAfguu uCfuUfcaucasusu	2257	антисмысловая	23
GAAAGGUGUUAAGAU GUCCU	1162	gsasaaggUfgUfUfCfa agauguccuL96	2258	смысловая	21
AGGACAUCUUGAACAC CUUUCUC	1163	asGfsgacAfuCfUfuga aCfaCfcuucuscusc	2259	антисмысловая	23
AAAGGUGUUAAGAU UCCUC	1164	asasagguGfuUfCfAfa gauguccucL96	2260	смысловая	21
GAGGACAUCUUGAACA CCUUUCU	1165	gsAfsggaCfaUfCfuug aAfcAfccuucscsu	2261	антисмысловая	23
GGGAGAAAGGUGUUA AGAUG	1166	gsgsgagaAfaGfGfUfg uucaaugL96	2262	смысловая	21
CAUCUUGAACACCUUU CUCCCCC	1167	csAfsucuUfgAfAfcac cUfuUfcuccccscsc	2263	антисмысловая	23
GGGAGAAAGGUGUUC AAGAU	1168	gsgsggagAfaAfGfGfu guucaagauL96	2264	смысловая	21
AUCUUGAACACCUUUC UCCCCCU	1169	asUfscuuGfaAfCfacc uUfuCfuuccccscsu	2265	антисмысловая	23
AUCUUGGUGUCGAAUC AUGGG	1170	asuscuugGfuGfUfCfg aaucaugggL96	2266	смысловая	21
CCCAUGAUUCGACACC AAGAUCC	1171	csCfscauGfaUfUfcga cAfcCfaagauscsc	2267	антисмысловая	23
UCUUGGUGUCGAAUCA UGGGG	1172	uscsuuggUfgUfCfGfa aucauggggL96	2268	смысловая	21
CCCCAUGAUUCGACAC CAAGAUC	1173	csCfsccaUfgAfUfucg aCfaCfcaagasusc	2269	антисмысловая	23

UGGGAUCUUGGUGUCG AAUCA	1174	usgsggauCfuUfGfGfu gucgaaucaL96	2270	смысловая	21
UGAUUCGACACCAAGA UCCCAUU	1175	usGfsauuCfGfAfCfacc aAfgAfucccasusu	2271	антисмысловая	23
AUGGGAUCUUGGUGUC GAAUC	1176	asusgggaUfcUfUfGfg ugucgaaucaL96	2272	смысловая	21
GAUUCGACACCAAGAU CCCAUUC	1177	gsAfsuucGfaCfAfcca aGfaUfcccaususc	2273	антисмысловая	23
GCUACAAGGCCAUUU UGUGA	1178	gscsuacaAfgGfCfCfa uauuugugaL96	2274	смысловая	21
UCACAAAUUGGCCUU GUAGCCC	1179	usCfsacaAfaUfAfugg cCfuUfguagcscsc	2275	антисмысловая	23
CUACAAGGCCAUUUU GUGAC	1180	csusacaaGfgCfCfAfu auuugugacL96	2276	смысловая	21
GUCACAAAUUGGCCU UGUAGCC	1181	gsUfscacAfaAfUfaug gCfcUfuguagcscsc	2277	антисмысловая	23
AUGGGCUACAAGGCCA UAUUU	1182	asusgggcUfaCfAfAfg gccauuuuL96	2278	смысловая	21
AAAUUGGCCUUGUAG CCCAUCU	1183	asAfsauaUfgGfCfcuu gUfaGfcccauscsu	2279	антисмысловая	23
GAUGGGCUACAAGGCC AUUUU	1184	gsasugggCfuAfCfAfa ggccauuuL96	2280	смысловая	21
AAUUGGCCUUGUAGC CCAUCUU	1185	asAfsuauGfgCfCfuug uAfgCfccauscsu	2281	антисмысловая	23
ACUGGAGAGAAUUGGA AUGGG	1186	ascsuggaGfaGfAfAfu uggaauugggL96	2282	смысловая	21
CCCAUCCAAUUCUCU CCAGUGC	1187	csCfscauUfcCfAfaau cUfcUfccagusgsc	2283	антисмысловая	23
CUGGAGAGAAUUGGAA UGGGU	1188	csusggagAfgAfAfUfu ggaauggguL96	2284	смысловая	21
ACCCAUCCAAUUCUC UCCAGUG	1189	asCfsccaUfuCfCfaau uCfuCfuccagsusg	2285	антисмысловая	23
UAGCACUGGAGAGAAU UGGAA	1190	usasgcacUfgGfAfGfa gaauuggaaL96	2286	смысловая	21
UUCCAAUUCUCUCCAG UGCUACC	1191	usUfscCaAfuUfCfcu cCfaGfugcuascsc	2287	антисмысловая	23
GUAGCACUGGAGAGAA UUGGA	1192	gsusagcaCfuGfGfAfg agaauuggaL96	2288	смысловая	21

UCCAAUUCUCUCCAGU GCUACCU	1193	usCfscaaUfuCfUfcuc cAfgUfgcuacsusu	2289	антисмысловая	23
ACAGUGGACACACCUU ACUG	1194	ascasagugGfaCfAfCfa ccuaccugL96	2290	смысловая	21
CAGGUAAGGUGUGUCC ACUGUCA	1195	csAfsgguAfaGfGfugu gUfcCfacuguscsa	2291	антисмысловая	23
CAGUGGACACACCUUA CCUGG	1196	csasgugGafCfAfCfCf cuuaccugL96	2292	смысловая	21
CCAGGUAAGGUGUGUC CACUGUC	1197	csCfsaggUfaAfGfgug uGfuCfcacugsusc	2293	антисмысловая	23
UGUGACAGUGGACACA CCUUA	1198	usgsugacAfgUfGfGfa cacaccuuaL96	2294	смысловая	21
UAAGGUGUGUCCACUG UCACAAA	1199	usAfsaggUfgUfGfucc aCfuGfucacasasa	2295	антисмысловая	23
UUGUGACAGUGGACAC ACCUU	1200	usugugaCfaGfUfGfg acacaccuuL96	2296	смысловая	21
AAGGUGUGUCCACUGU CACAAAU	1201	asAfsgguGfuGfUfcca cUfgUfcacaasasu	2297	антисмысловая	23
GAAGACUGACAUCAUU GCCAA	1202	gsasagacUfgAfCfAfu cauugccaaL96	2298	смысловая	21
UUGGCAAUGAUGUCAG UCUUCUC	1203	usUfsggcAfaUfGfaug uCfaGfucuuusc	2299	антисмысловая	23
AAGACUGACAUCAUUG CCAAU	1204	asagacuGfaCfAfUfc auugccaaL96	2300	смысловая	21
AUUGGCAAUGAUGUCA GUCUUCU	1205	asUfsuggCfaAfUfgau gUfcAfgucuusc	2301	антисмысловая	23
CUGAGAAGACUGACAU CAUUG	1206	csusgagaAfgAfCfUfg acaucauugL96	2302	смысловая	21
CAAUGAUGUCAGUCUU CUCAGCC	1207	csAfsaugAfuGfUfcag uCfuUfcucagscsc	2303	антисмысловая	23
GCUGAGAAGACUGACA UCAUU	1208	gscsugagAfaGfAfCfu gacaucauuL96	2304	смысловая	21
AAUGAUGUCAGUCUUC UCAGCCA	1209	asAfsugaUfgUfCfagu cUfuCfucagscscsa	2305	антисмысловая	23
GCUCAGGUUCAAGUG UUGGU	1210	gscsucagGfuUfCfAfa aguguugguL96	2306	смысловая	21
ACCAACACUUUGAACC UGAGCUU	1211	asCfscaaCfaCfUfuug aAfcCfugagcsusu	2307	антисмысловая	23

CUCAGGUUCAAAGUGU UGGUA	1212	csuscaggUfuCfAfAfa guguugguaL96	2308	смысловая	21
UACCAACACUUUGAAC CUGAGCU	1213	usAfsccaAfcAfCfuuu gAfaCfcugagscsu	2309	антисмысловая	23
GUAAGCUCAGGUUCAA AGUGU	1214	gsusaagcUfcAfGfGfu ucaaaguguL96	2310	смысловая	21
ACACUUUGAACCUGAG CUUACAA	1215	asCfsacuUfuGfAfacc uGfaGfcuuacsasa	2311	антисмысловая	23
UGUAAGCUCAGGUUCA AAGUG	1216	usgsuaagCfuCfAfGfg uucuaagugL96	2312	смысловая	21
CACUUUGAACCUGAGC UUACAAU	1217	csAfsctuUfgAfAfccu gAfgCfuacacasu	2313	антисмысловая	23
AUGUAUUACUUGACAA AGAGA	1218	asusguauUfaCfUfUfg acaaagagaL96	2314	смысловая	21
UCUCUUUGUCAAGUAA UACAUGC	1219	usCfsucuUfuGfUfcaa gUfaAfuaausgsc	2315	антисмысловая	23
UGUAUUACUUGACAAA GAGAC	1220	usgsuauuAfcUfUfGfa caaagagacL96	2316	смысловая	21
GUCUCUUUGUCAAGUA AUACAUG	1221	gsUfscucUfuUfGfuca aGfUfauacasusg	2317	антисмысловая	23
CAGCAUGUAUUACUUG ACAAA	1222	csasgcuaGfuAfUfUfa cuugacaaaL96	2318	смысловая	21
UUUGUCAAGUAAUACA UGCUGAA	1223	usUfsuguCfaAfGfuua uAfcAfugcugsasa	2319	антисмысловая	23
UCAGCAUGUAUUACUU GACAA	1224	uscsagcaUfgUfAfUfu acuugacaaL96	2320	смысловая	21
UUUGUCAAGUAAUACAU GCUGAAA	1225	usUfsgucAfaGfUfaau aCfaUfgcugasasa	2321	антисмысловая	23
CUGCAACUGUAUAUCU ACAAG	1226	csusgcaaCfuGfUfAfu aucuacaagL96	2322	смысловая	21
CUUGUAGAUUACAGU UGCAGCC	1227	csUfsuguAfgAfUfaaa cAfgUfugcagscsc	2323	антисмысловая	23
UGCAACUGUAUAUCUA CAAGG	1228	usgscaacUfgUfAfUfa ucuacaaggL96	2324	смысловая	21
CCUUGUAGAUUACAG UUGCAGC	1229	csCfsuugUfaGfAfuau aCfaGfuugcasgsc	2325	антисмысловая	23
UUGGCUGCAACUGUAU AUCUA	1230	ususggcuGfcAfAfCfu guauaucuaL96	2326	смысловая	21

UAGAUUAUACAGUUGCA GCCAACG	1231	usAfsgauAfuAfCfagu uGfcAfgccaascsg	2327	антисмысловая	23
GUUGGCUGCAACUGUA UAUCU	1232	gsusuggcUfgCfAfAfc uguauaucuL96	2328	смысловая	21
AGAUAUACAGUUGCAG CCAACGA	1233	asGfsauaUfaCfAfguu gCfaGfccaacsgsa	2329	антисмысловая	23
CAAUGAUGAAGAAAC UUUGG	1234	csasaaugAfuGfAfAfg aaacuuuggL96	2330	смысловая	21
CCAAAGUUUCUUAUC AUUUGCC	1235	csCfsaaaGfuUfUfcuu cAfuCfauuugscsc	2331	антисмысловая	23
AAAUGAUGAAGAAACU UUGGC	1236	asasaugaUfgAfAfGfa aacuuuggcL96	2332	смысловая	21
GCCAAAGUUUCUUAU CAUUUGC	1237	gsCfscaaAfgUfUfucu uCfaUfcuuusgsc	2333	антисмысловая	23
GGGGCAAUGAUGAAG AAACU	1238	gsgsggcaAfaUfGfAfu gaagaaacuL96	2334	смысловая	21
AGUUUCUUAUCAUUU GCCCCAG	1239	asGfsuuuUfuUfCfauc aUfuUfgcccsasg	2335	антисмысловая	23
UGGGCAAUGAUGAA GAAAC	1240	usgsgggcAfaAfUfGfa ugaagaaacL96	2336	смысловая	21
GUUUCUUAUCAUUUG CCCCAGA	1241	gsUfsuucUfuCfAfuca uUfuGfccccasgsa	2337	антисмысловая	23
CAAAGGGUGUCGUUCU UUUCC	1242	csasaaggGfuGfUfCfg uucuuuuccL96	2338	смысловая	21
GGAAAAGAACGACACC CUUUGUA	1243	gsGfsaaaAfgAfAfcga cAfcCfcuuugsusa	2339	антисмысловая	23
AAAGGGUGUCGUUCUU UUCCA	1244	asasaggUfgUfCfGfu ucuuuuccaL96	2340	смысловая	21
UGGAAAAGAACGACAC CCUUUGU	1245	usGfsgaaAfaGfAfacg aCfaCfccuuusgsu	2341	антисмысловая	23
AAUACAAAGGGUGUCG UUCUU	1246	asasuacaAfaGfGfGfu gucguucuuL96	2342	смысловая	21
AAGAACGACACCCUUU GUAUUGA	1247	asAfsgaaCfGfAfcacc cUfuUfguuusgsa	2343	антисмысловая	23
CAAUACAAAGGGUGUC GUUCU	1248	csasauacAfaAfGfGfg ugucguucuuL96	2344	смысловая	21
AGAACGACACCCUUUG UAUUGAA	1249	asGfsaacGfaCfAfcac uUfuGfuauugsasa	2345	антисмысловая	23

AAAGGCACUGAUGUUC UGAAA	1250	asasaggcAfcUfGfAfu guucugaaaL96	2346	смысловая	21
UUUCAGAACAUCAUG CCUUUC	1251	usUfsucaGfaAfCfauc aGfuGfccuuuscsc	2347	антисмысловая	23
AAGGCACUGAUGUUCU GAAAG	1252	asasggcaCfuGfAfUfg uucugaaagL96	2348	смысловая	21
CUUUCAGAACAUCAUG GCCUUUC	1253	csUfsuucAfgAfAfcau cAfgUfgccuususc	2349	антисмысловая	23
GCGGAAAGGCACUGAU GUUCU	1254	gscsggaaAfgGfCfAfc ugauguucuL96	2350	смысловая	21
AGAACAUCAUGGCCUU UCCGCAC	1255	asGfsaacAfuCfAfgug cCfuUfuccgcsasc	2351	антисмысловая	23
UGCGGAAAGGCACUGA UGUUC	1256	usgscggaAfaGfGfCfa cugauguucL96	2352	смысловая	21
GAACAUCAGUGCCUUU CCGCACA	1257	gsAfsacaUfcAfGfugc cUfuUfccgcascsa	2353	антисмысловая	23
AAGGAUGCUCCGGAU GUUGC	1258	asasggauGfcUfCfCfG gaauguugcL96	2354	смысловая	21
GCAACAUUCCGGAGCA UCCUUGG	1259	gsCfsaacAfuUfCfcgg aGfcAfuccuusgsg	2355	антисмысловая	23
AGGAUGCUCCGGAUG UUGCU	1260	asgsgaugCfuCfCfGfg aauguugcuL96	2356	смысловая	21
AGCAACAUUCCGGAGC AUCCUUG	1261	asGfscaaCfaUfUfccg gAfgCfauccususg	2357	антисмысловая	23
AUCCAAGGAUGCUCCG GAAUG	1262	asusccaaGfgAfUfGfc uccggaaugL96	2358	смысловая	21
CAUCCGGAGCAUCCU UGGAUAC	1263	csAfsuucCfgGfAfgca uCfcUfuggausasc	2359	антисмысловая	23
UAUCCAAGGAUGCUCC GGAU	1264	usasuccaAfgGfAfUfg cuccggaauL96	2360	смысловая	21
AUCCGGAGCAUCCUU GGAUACA	1265	asUfsuccGfgAfGfcau cCfuUfggauascsa	2361	антисмысловая	23
AAUGGGUGGCGGUAU UGGUG	1266	asasugggUfgGfCfGfg uaauuggugL96	2362	смысловая	21
CACCAAUUACCGCCAC CCAUUC	1267	csAfsccaAfuUfAfccg cCfaCfccauuscsc	2363	антисмысловая	23
AUGGGUGGCGGUAAU GGUGA	1268	asusggguGfgCfGfGfu aauggugaL96	2364	смысловая	21

UCACCAAUUACCGCCA CCCAUUC	1269	usCfsaccAfaUfUfacc gCfcAfcccaususc	2365	антисмысловая	23
UUGGAAUGGGUGGCGG UAAUU	1270	ususggaaUfgGfGfUfg gcgguaauL96	2366	смысловая	21
AAUUACCGCCACCCAU UCCAAUU	1271	asAfsuuaCfcGfCfcac cCfaUfuccaasusu	2367	антисмысловая	23
AUUGGAAUGGGUGGCG GUAAU	1272	asusuggaAfuGfGfGfu ggcgguauL96	2368	смысловая	21
AUUACCGCCACCCAU CCAAUUC	1273	asUfsuacCfcGfCfacc cAfuUfcccaususc	2369	антисмысловая	23
GGAAAGGCACUGAUGU UCUGA	1274	gsgsaaagGfcAfCfUfg auguucugaL96	2370	смысловая	21
UCAGAACAUCAGUGCC UUUCCGC	1275	usCfsagaAfcAfUfcag uGfcCfuuccsgsc	2371	антисмысловая	23
GAAAGGCACUGAUGU CUGAA	1276	gsasaaggCfaCfUfGfa uguucugaaL96	2372	смысловая	21
UUCAGAACAUCAGUGC CUUCCG	1277	usUfscagAfaCfAfuca gUfgCfcuucscsg	2373	антисмысловая	23
GUGCGGAAAGGCACUG AUGUU	1278	gsusgcggAfaAfGfGfc acugauguuL96	2374	смысловая	21
AACAUCAGUGCCUUUC CGCACAC	1279	asAfscauCfaGfUfgcc uUfuCfcgcacsasc	2375	антисмысловая	23
UGUGCGGAAAGGCACU GAUGU	1280	usgsugcgGfaAfAfGfg cacugauguL96	2376	смысловая	21
ACAUCAGUGCCUUUCC GCACACC	1281	asCfsaucAfgUfGfccu uUfcCfcgcacascsc	2377	антисмысловая	23
AAUUGUAAGCUCAGGU UCAAA	1282	asasuuguAfaGfCfUfc agguucaaL96	2378	смысловая	21
UUUGAACCUGAGCUUA CAAUUUA	1283	usUfsugaAfcCfUfgag cUfuAfcaauususa	2379	антисмысловая	23
AUUGUAAGCUCAGGU CAAAG	1284	asusuguaAfgCfUfCfa gguucaaagL96	2380	смысловая	21
CUUUGAACCUGAGCUU ACAAUUU	1285	csUfsuugAfaCfCfuga gCfuUfacaasusu	2381	антисмысловая	23
CUUAAAUGUAAGCUC AGGUU	1286	csusuaaaUfuGfUfAfa gcucagguuL96	2382	смысловая	21
AACCUGAGCUUACAAU UUAAGAA	1287	asAfsccuGfaGfCfuua cAfaUfuuaagsasa	2383	антисмысловая	23

UCUUAAAUGUAAGCU CAGGU	1288	uscsuuaaAfuUfGfUfa agcucagguL96	2384	смысловая	21
ACCUGAGCUUACAAUU UAAGAAC	1289	asCfscugAfgCfUfuac aAfuUfuaagasasc	2385	антисмысловая	23
GCAAAACACUAAGGUGA AAAGA	1290	gscsaaacAfcUfAfAfg gugaaaagaL96	2386	смысловая	21
UCUUUUCACCUUAGUG UUUGCUA	1291	usCfsuuUfcAfCfcuu aGfuGfuugcsusa	2387	антисмысловая	23
CAAACACUAAGGUGAA AAGAU	1292	csasaacaCfuAfAfGfg ugaaaagauL96	2388	смысловая	21
AUCUUUUCACCUUAGU GUUUGCU	1293	asUfscuuUfuCfAfccu uAfgUfguuugscsu	2389	антисмысловая	23
GGUAGCAAACACUAAG GUGAA	1294	gsgsuagcAfaAfCfAfc uaaggugaaL96	2390	смысловая	21
UUCACCUUAGUGUUUG CUACCUC	1295	usUfscacCfuUfAfgug uUfuGfcuaccsusc	2391	антисмысловая	23
AGGUAGCAAACACUAA GGUGA	1296	asgsguagCfaAfAfCfa cuaaggugaL96	2392	смысловая	21
UCACCUUAGUGUUUGC UACCUC	1297	usCfsaccUfuAfGfugu uUfgCfuaccuscsc	2393	антисмысловая	23
AGGUAGCAAACACUAA GGUGA	1298	asgsguagCfaAfAfCfa cuaaggugaL96	2394	смысловая	21
UCACCUUAGUGUUUGC UACCUC	1299	usCfsaccUfuAfGfugu uUfgCfuaccuscsc	2395	антисмысловая	23
GGUAGCAAACACUAAG GUGAA	1300	gsgsuagcAfaAfCfAfc uaaggugaaL96	2396	смысловая	21
UUCACCUUAGUGUUUG CUACCUC	1301	usUfscacCfuUfAfgug uUfuGfcuaccsusc	2397	антисмысловая	23
UUGGAGGUAGCAAACA CUAAG	1302	ususggagGfuAfGfCfa aacacuaagL96	2398	смысловая	21
CUUAGUGUUUGCUACC UCCAAUU	1303	csUfsuagUfgUfUfugc uAfcCfuccaasusu	2399	антисмысловая	23
AUUGGAGGUAGCAAAC ACUAA	1304	asusuggaGfgUfAfGfc aaacacuaaL96	2400	смысловая	21
UUAGUGUUUGCUACCU CCAAUUU	1305	usUfsaguGfuUfUfgcu aCfcUfccaausus	2401	антисмысловая	23
UAAAGUGCUGUAUCCU UUAGU	1306	usasaaguGfcUfGfUfa uccuuuaguL96	2402	смысловая	21

ACUAAAGGAUACAGCA CUUUAGC	1307	asCfsuaaAfgGfAfuac aGfcAfcuuuasgsc	2403	антисмысловая	23
AAAGUGCUGUAUCCUU UAGUA	1308	asasagugCfuGfUfAfu ccuuuaguaL96	2404	смысловая	21
UACUAAAGGAUACAGC ACUUUAG	1309	usAfscuaAfaGfGfaua cAfgCfacuuuasg	2405	антисмысловая	23
AGGCUAAAGUGCUGUA UCCUU	1310	asgsgcuaAfaGfUfGfc uguauccuuL96	2406	смысловая	21
AAGGAUACAGCACUUU AGCCUGC	1311	asAfsggaUfaCfAfgca cUfuUfagccusgsc	2407	антисмысловая	23
CAGGCUAAAGUGCUGU AUCCU	1312	csasggcuAfaAfGfUfg cuguauccuL96	2408	смысловая	21
AGGAUACAGCACUUUA GCCUGCC	1313	asGfsgauAfcAfGfcac uUfuAfgccugscsc	2409	антисмысловая	23
AAGACAUUGGUGAGGA AAAAU	1314	asasgacaUfuGfGfUfg aggaaaaauL96	2410	смысловая	21
AUUUUUCCUCACCAAU GUCUUGU	1315	asUfsuuUfcCfUfcac cAfaUfgucuuusgsu	2411	антисмысловая	23
AGACAUUGGUGAGGAA AAAUC	1316	asgsacauUfgGfUfGfa ggaaaaaucL96	2412	смысловая	21
GAUUUUUCCUCACCAA UGUCUUG	1317	gsAfsuuUfuCfCfuca cCfaAfugucususg	2413	антисмысловая	23
CGACAAGACAUUGGUG AGGAA	1318	csgsacaaGfaCfAfUfu ggugaggaaL96	2414	смысловая	21
UCCUCACCAAUGUCU UGUCGAU	1319	usUfscuCfaCfCfaau gUfcUfugucgsasu	2415	антисмысловая	23
UCGACAAGACAUUGGU GAGGA	1320	uscsgacaAfgAfCfAfu uggugaggaaL96	2416	смысловая	21
UCCUCACCAAUGUCUU GUCGAUG	1321	usCfscuCfCfAfaug uCfuUfgucgasusg	2417	антисмысловая	23
AAGAUGUCCUCGAGAU ACUAA	1322	asasgaugUfcCfUfCfg agauacuaaL96	2418	смысловая	21
UUAGUAUCUCGAGGAC AUCUUGA	1323	usUfsaguAfuCfUfcga gGfaCfaucuuusgsa	2419	антисмысловая	23
AGAUGUCCUCGAGUA CUAAA	1324	asgsauguCfcUfCfGfa gauacuaaaL96	2420	смысловая	21
UUUAGUAUCUCGAGGA CAUCUUG	1325	usUfsuagUfaUfCfucg aGfgAfcaucususg	2421	антисмысловая	23

GUUCAAGAUGUCCUCG AGAUUA	1326	gsusucaaGfaUfGfUfc cucgagauaL96	2422	смысловая	21
UAUCUCGAGGACAUCU UGAACAC	1327	usAfsucuCfgAfGfgac aUfcUfugaacsasc	2423	антисмысловая	23
UGUUCAAGAUGUCCUC GAGAU	1328	usgsuucAfgAfUfGfu ccucgagauL96	2424	смысловая	21
AUCUCGAGGACAUCUU GAACACC	1329	asUfscucGfaGfGfaca uCfuUfgaacascsc	2425	антисмысловая	23
GAGAAAGGUGUUAAG AUGUC	1330	gsasgaaaGfgUfGfUfu caaugucL96	2426	смысловая	21
GACAUCUUGAACACCU UUCUCCC	1331	gsAfscauCfuUfGfaac aCfcUfuucuscsc	2427	антисмысловая	23
AGAAAGGUGUUAAGA UGUCC	1332	asgsaaagGfuGfUfUfc aagauguccL96	2428	смысловая	21
GGACAUCUUGAACACC UUUCUCC	1333	gsGfsacaUfcUfUfgaa cAfcCfuucuscsc	2429	антисмысловая	23
GGGGGAGAAAGGUGUU CAAGA	1334	gsghgggaGfaAfAfGfg uguucaagaL96	2430	смысловая	21
UCUUGAACACCUUUCU CCCCUG	1335	usCfsuugAfaCfAfccu uUfcUfccccusg	2431	антисмысловая	23
AGGGGGAGAAAGGUGU UCAAG	1336	asghgggaAfgAfAfAfg guguucaagL96	2432	смысловая	21
CUUGAACACCUUUCUC CCCCUGG	1337	csUfsugaAfcAfCfcuu uCfuCfccccusgsg	2433	антисмысловая	23
GCUGGGAAGAUUAUCAA AUGGC	1338	gsCsugggAfaGfAfUfa ucaaauggcL96	2434	смысловая	21
GCCAUUUGAUUUCUUC CCAGCUG	1339	gsCfscauUfuGfAfua cUfuCfccagcsusg	2435	антисмысловая	23
CUGGGAAGAUUAUCAA UGGCU	1340	csusgggaAfgAfUfAfu caaauggcuL96	2436	смысловая	21
AGCCAUUUGAUUUCUU CCCAGCU	1341	asGfsccaUfuUfGfaua uCfuUfccagscsu	2437	антисмысловая	23
AUCAGCUGGGAAGAUUA UCAAA	1342	asuscagcUfgGfGfAfa gauaucaaaL96	2438	смысловая	21
UUUGAUUUCUCCCAG CUGAUAG	1343	usUfsugaUfaUfCfuuc cCfaGfcugausasg	2439	антисмысловая	23
UAUCAGCUGGGAAGAU AUCAA	1344	usasucagCfuGfGfGfa agauaucaaL96	2440	смысловая	21

UUGAUUUCUCCAGC UGAUAGA	1345	usUfsgauAfuCfUfucc cAfgCfugauasgsa	2441	антисмысловая	23
UCUGUCGACUUCUGUU UUAGG	1346	uscsugucGfaCfUfUfc uguuuuaggL96	2442	смысловая	21
CCUAAAACAGAAGUCG ACAGAUC	1347	csCfsuaaAfaCfAfgaa gUfcGfacagasusc	2443	антисмысловая	23
CUGUCGACUUCUGUUU UAGGA	1348	csusgucgAfcUfUfCfu guuuuaggaL96	2444	смысловая	21
UCCUAAAACAGAAGUC GACAGAU	1349	usCfscuaAfaAfcfaga aGfuCfagacagsasu	2445	антисмысловая	23
CAGAUCUGUCGACUUC UGUUU	1350	csasgaucUfgUfCfGfa cuucuguuuL96	2446	смысловая	21
AAACAGAAGUCGACAG AUCUGUU	1351	asAfsacaGfaAfcGfucg aCfaGfaucugsusu	2447	антисмысловая	23
ACAGAUCUGUCGACUU CUGUU	1352	ascsagauCfuGfUfCfG acuucuguuL96	2448	смысловая	21
AACAGAAGUCGACAGA UCUGUUU	1353	asAfscagAfaGfUfcga cAfgAfucugususu	2449	антисмысловая	23
UACUUCUUUGAAUGUA GAUUU	1354	usascuucUfuUfGfAfa uguagauuuL96	2450	смысловая	21
AAAUCUACAUUCAAG AAGUAUC	1355	asAfsaucUfaCfAfuuc aAfaGfaaguasusc	2451	антисмысловая	23
ACUUCUUUGAAUGUAG AUUUC	1356	ascsuucUfuGfAfaFu guagauuucL96	2452	смысловая	21
GAAUUCUACAUUCAAA GAAGUAU	1357	gsAfsaauCfuAfcfauu cAfaAfgaagusasu	2453	антисмысловая	23
GUGAUACUUCUUUGAA UGUAG	1358	gsusgauaCfuUfCfUfu ugaauguagL96	2454	смысловая	21
CUACAUUCAAGAAGU AUCACCA	1359	csUfsacaUfuCfAfaag aAfgUfaucacscsa	2455	антисмысловая	23
GGUGAUACUUCUUUGA AUGUA	1360	gsgsugauAfcUfUfCfu uugaauguaL96	2456	смысловая	21
UACAUUCAAGAAGUA UCACCAA	1361	usAfscauUfcAfaAfga aGfuAfucaccsasa	2457	антисмысловая	23
UGGGAAGAUUCAAAU GGCUG	1362	usgsggaaGfaUfAfuCf aaauggcugL96	2458	смысловая	21
CAGCCAUUUGAUUCU UCCAGC	1363	csAfsgccAfuUfUfgau aUfcUfuccasgsc	2459	антисмысловая	23

GGGAAGAUUCAAUG GCUGA	1364	gsgsgaagAfuAfUfCfa aauggcugaL96	2460	смысловая	21
UCAGCCAUUUGAUUUC UCCCCAG	1365	usCfsagcCfaUfUfuga uAfuCfuucccsasg	2461	антисмысловая	23
CAGCUGGGAAGAUUUC AAAUG	1366	csasgcugGfgAfAfGfa uaucaaaugL96	2462	смысловая	21
CAUUUGAUUUCUCCCC AGCUGAU	1367	csAfsuuuGfaUfAfucu uCfcCfagcugsasu	2463	антисмысловая	23
UCAGCUGGGAAGAUUUC CAAAU	1368	uscsagcuGfgGfAfAfg auaucaaaL96	2464	смысловая	21
AUUUGAUUUCUCCCCA GCUGAUA	1369	asUfsuugAfuAfUfucu cCfcAfgcugasusa	2465	антисмысловая	23
UCCAAAGUCUAUAUAU GACUA	1370	uscscaaaGfuCfUfAfu auaugacuaL96	2466	смысловая	21
UAGUCAUAUAUAGACU UUGGAAG	1371	usAfsgucAfuAfUfaua gAfcUfuuggasasg	2467	антисмысловая	23
CCAAAGUCUAUAUAU ACUAU	1372	cscsaaagUfcUfAfUfa uaugacuauL96	2468	смысловая	21
AUAGUCAUAUAUAGAC UUUGGAA	1373	asUfsaguCfaUfAfuau aGfaCfuuggsasa	2469	антисмысловая	23
UACUCCAAAGUCUAUA AUAUG	1374	usascuucCfaAfAfGfu cuauauaugL96	2470	смысловая	21
CAUAUAUAGACUUUGG AAGUACU	1375	csAfsuauAfuAfGfacu uUfgGfaaguascsu	2471	антисмысловая	23
GUACUCCAAAGUCUAUA UAUAU	1376	gsusacuuCfcAfAfAfg ucuauauauL96	2472	смысловая	21
AUAUAUAGACUUUGGA AGUACUG	1377	asUfsauaUfaGfAfcuu uGfgAfaguacsusg	2473	антисмысловая	23
UUAUGAACAACAUGCU AAAUC	1378	ususaugaAfcAfAfCfa ugcuaaaucL96	2474	смысловая	21
GAUUUAGCAUGUUGUU CAUAAUC	1379	gsAfsuuuAfgCfAfugu uGfuUfcuaasusc	2475	антисмысловая	23
UAUGAACAACAUGCUA AAUCA	1380	usasugaaCfaAfCfAfu gcuaaaucL96	2476	смысловая	21
UGAUUUAGCAUGUUGU UCAUAU	1381	usGfsauuUfaGfCfaug uUfgUfucuaasasu	2477	антисмысловая	23
AUGAUUAUGAACAACA UGCUA	1382	asusgauuAfuGfAfAfc aacaugcuaL96	2478	смысловая	21

UAGCAUGUUGUUCAUA AUCAUUG	1383	usAfsgcaUfgUfUfguu cAfuAfaucaususg	2479	антисмысловая	23
AAUGAUUAUGAACAAAC AUGCU	1384	asasugauUfaUfGfAfa caacaugcuL96	2480	смысловая	21
AGCAUGUUGUUCAUAA UCAUUGA	1385	asGfscauGfuUfGfuuc aUfaAfucuuusgsa	2481	антисмысловая	23
AAUCCCCACUUCAAU ACAAA	1386	asasuuccCfcAfCfUfu caauacaaaL96	2482	смысловая	21
UUUGUAUUGAAGUGGG GAAUUAAC	1387	usUfsuguAfuUfGfaag uGfgGfgaausasc	2483	антисмысловая	23
AUCCCCCACUUCAAUA CAAAG	1388	asusucccCfaCfUfUfc aauacaaagL96	2484	смысловая	21
CUUUGUAUUGAAGUGG GGAAUUA	1389	csUfsuugUfaUfUfgaa gUfgGfggaususa	2485	антисмысловая	23
CUGUAUUCUCCCCACU CAAUA	1390	csusguuaUfuCfCfCfc acuucuaaL96	2486	смысловая	21
UAUUGAAGUGGGGAAU UACAGAC	1391	usAfsuugAfaGfUfggg gAfaUfuacagsasc	2487	антисмысловая	23
UCUGUAAUCCCCACU UCAAU	1392	uscsuguaAfuUfCfCfc cacuucuaaL96	2488	смысловая	21
AUUGAAGUGGGGAAU ACAGACU	1393	asUfsugaAfgUfGfggg aAfuUfacagascsu	2489	антисмысловая	23
UGAUGUGCGUAACAGA UUCAA	1394	usgsauguGfcGfUfAfa cagauucaL96	2490	смысловая	21
UUGAAUCUGUACGCA CAUCAUC	1395	usUfsgaaUfcUfGfuua cGfcAfcaucasusc	2491	антисмысловая	23
GAUGUGCGUAACAGAU UCAAA	1396	gsasugugCfGfUfAfc agauucaaaL96	2492	смысловая	21
UUUGAAUCUGUACGC ACAUCAU	1397	usUfsugaAfuCfUfguu aCfGcfacaucsasu	2493	антисмысловая	23
UGGAUGAUGUGCGUAA CAGAU	1398	usgsgaugAfuGfUfGfc guaacagauL96	2494	смысловая	21
AUCUGUUACGCACAUC AUCCAGA	1399	asUfscugUfuAfCfGca cAfuCfauccasgsa	2495	антисмысловая	23
CUGGAUGAUGUGCGUA ACAGA	1400	csusggauGfaUfGfUfg cguaacagaL96	2496	смысловая	21
UCUGUUACGCACAUCA UCCAGAC	1401	usCfsuguUfaCfGfcac aUfcAfuccagsasc	2497	антисмысловая	23

GAAUGGGUGGCGGUAA UUGGU	1402	gsasauggGfuGfGfCfG guaaauugguL96	2498	смысловая	21
ACCAAUUACCGCCACC CAUUCCA	1403	asCfscaaUfuAfCfGgc cAfCfcauucscsa	2499	антисмысловая	23
AAUGGGUGGCGGUAAU UGGUG	1404	asasugggUfgGfCfGfg uaauuggugL96	2500	смысловая	21
CACCAAUUACCGCCAC CCAUUC	1405	csAfsccaAfuUfAfccg cCfaCfccaauuscsc	2501	антисмысловая	23
AUUGGAAUGGGUGGCG GUAAU	1406	asusuggaAfuGfGfGfu ggcgguaaL96	2502	смысловая	21
AUUACCGCCACCAU CCAUUC	1407	asUfsuacCfGfCfCfacc cAfuUfccaaususc	2503	антисмысловая	23
AAUUGGAAUGGGUGGC GGUAA	1408	asasuuggAfaUfGfGfg uggcgguaaL96	2504	смысловая	21
UUACCGCCACCAUUC CAAUUCU	1409	usUfsaccGfCfAfccc aUfuCfcaauuscscsu	2505	антисмысловая	23
UCCGGAUUGUUGCUGA AACAG	1410	uscscggaAfuGfUfUfg cugaaacagL96	2506	смысловая	21
CUGUUUCAGCAACAU CCGGAGC	1411	csUfsguuUfcAfGfcaa cAfuUfccggasgsc	2507	антисмысловая	23
CCGGAAUGUUGCUGAA ACAGA	1412	cscsggaaUfgUfUfGfc ugaaacagaL96	2508	смысловая	21
UCUGUUUCAGCAACAU UCCGGAG	1413	usCfsuguUfuCfAfgca aCfaUfuccggsasg	2509	антисмысловая	23
AUGCUCGGAAUGUUG CUGAA	1414	asusgcucCfGfAfAfu guugcugaaL96	2510	смысловая	21
UUCAGCAACAUUCCGG AGCAUCC	1415	usUfscagCfaAfCfauu cCfGfGfagcauscsc	2511	антисмысловая	23
GAUGCUCGGAAUGUU GCUGA	1416	gsasugcuCfCfGfAfa uguugcugaL96	2512	смысловая	21
UCAGCAACAUUCCGGA GCAUCCU	1417	usCfsagcAfaCfAfuuc cGfGfGfagcauscscsu	2513	антисмысловая	23
UGUCCUCGAGAUACUA AAGGA	1418	usgsuccuCfGfAfGfAfu acuaaaggaL96	2514	смысловая	21
UCCUUUAGUAUCUGA GGACAUC	1419	usCfscuuUfaGfUfauc uCfGfGfagcauscsc	2515	антисмысловая	23
GUCCUCGAGAUACUAA AGGAA	1420	gsusccucGfaGfAfUfa cuaaaggaL96	2516	смысловая	21

UUCCUUUAGUAUCUCG AGGACAU	1421	usUfsccuUfuAfGfuau cUfcGfaggacsasu	2517	антисмысловая	23
AAGAUGUCCUCGAGAU ACUAA	1422	asasgaugUfcCfUfCfG agauacuuaL96	2518	смысловая	21
UUAGUAUCUCGAGGAC AUCUUGA	1423	usUfsaguAfuCfUfcga gGfaCfaucuusgsa	2519	антисмысловая	23
CAAGAUGUCCUCGAGA UACUA	1424	csasagauGfuCfCfUfc gagauacuL96	2520	смысловая	21
UAGUAUCUCGAGGACA UCUUGAA	1425	usAfsguaUfcUfCfGag gAfCafucuugsasa	2521	антисмысловая	23
ACAACAUGCUAAAUCA GUACU	1426	ascsaacaUfgCfUfAfa aucaguacuL96	2522	смысловая	21
AGUACUGAUUUAGCAU GUUGUUC	1427	asGfsuacUfgAfUfuua gCfaUfguugususc	2523	антисмысловая	23
CAACAUGCUAAAUCAG UACUU	1428	csasacauGfcUfAfAfa ucaguacuuL96	2524	смысловая	21
AAGUACUGAUUUAGCA UGUUGUU	1429	asAfsguaCfuGfAfuuu aGfcAfuguugsusu	2525	антисмысловая	23
AUGAACAACAUGCUGAA AUCAG	1430	asusgaacAfaCfAfUfg cuaaaucagL96	2526	смысловая	21
CUGAUUUAGCAUGUUG UUCAUAA	1431	csUfsgauUfuAfGfcu gUfuGfucausasa	2527	антисмысловая	23
UAUGAACAACAUGCUGA AAUCA	1432	usasugaaCfaAfCfAfu gcuaaaucL96	2528	смысловая	21
UGAUUUAGCAUGUUGU UCAUAAU	1433	usGfsauuUfaGfCfaug uUfgUfucauasasu	2529	антисмысловая	23
GCCAAGGCUGUGUUUG UGGGG	1434	gscscaagGfcUfGfUfg uuuguggggL96	2530	смысловая	21
CCCCACAAACACAGCC UUGGCGC	1435	csCfsccaCfaAfAfcac aGfcCfuuggcsgsc	2531	антисмысловая	23
CCAAGGCUGUGUUUGU GGGGA	1436	cscsaaggCfuGfUfGfu uuguggggaL96	2532	смысловая	21
UCCCCACAAACACAGC CUUGGCG	1437	usCfscccAfcAfAfaca cAfgCfcuuggscsg	2533	антисмысловая	23
UGGCGCCAAGGCUGUG UUUGU	1438	usgsgcgcCfaAfGfGfc uguguuuguL96	2534	смысловая	21
ACAAACACAGCCUUGG CGCCAAG	1439	asCfsaaaCfaCfAfgcc uUfgGfcgccasag	2535	антисмысловая	23

UUGGCGCCAAGGCUGU GUUUG	1440	ususggcgCfcAfAfGfg cuguguuugL96	2536	смысловая	21
CAAACACAGCCUUGGC GCCAAGA	1441	csAfsaacAfcAfGfccu uGfgCfGCCaasgsa	2537	антисмысловая	23
UGAAAGCUCUGGCUCU UGGCG	1442	usgsaaagCfuCfUfGfg cucuuggcgL96	2538	смысловая	21
CGCCAAGAGCCAGAGC UUUCAGA	1443	csGfsccaAfgAfGfcc gAfgCfuucasgsa	2539	антисмысловая	23
GAAAGCUCUGGCUCUU GGCGC	1444	gsasaagcUfcUfGfGfc ucuuggcgL96	2540	смысловая	21
GCGCCAAGAGCCAGAG CUUUCAG	1445	gsCfsgccAfaGfAfgcc aGfaGfcuuucsasg	2541	антисмысловая	23
GUUCUGAAAGCUCUGG CUCUU	1446	gsusucugAfaAfGfCfu cuggcucuL96	2542	смысловая	21
AAGAGCCAGAGCUUUC AGAACAU	1447	asAfsgagCfcAfGfagc uUfuCfagaacsasu	2543	антисмысловая	23
UGUUCUGAAAGCUCUG GCUCU	1448	usgsuucuGfaAfAfGfc ucuggcucuL96	2544	смысловая	21
AGAGCCAGAGCUUUCA GAACAUC	1449	asGfsagcCfaGfAfgcu uUfcAfgaacasusc	2545	антисмысловая	23
CAGCCACUAUUGAUGU UCUGC	1450	csasgccaCfuAfUfUfg auguucugL96	2546	смысловая	21
GCAGAACAUCAAUAGU GGCUGGC	1451	gsCfsagaAfcAfUfcaa uAfgUfggcugsgsc	2547	антисмысловая	23
AGCCACUAUUGAUGUU CUGCC	1452	asgscacUfaUfUfGfa uguucugccL96	2548	смысловая	21
GGCAGAACAUCAAUAG UGGCUGG	1453	gsGfscagAfaCfAfuca aUfaGfuggcusgsg	2549	антисмысловая	23
GUGCCAGCCACUAUUG AUGUU	1454	gsusgccaGfcCfAfCfu auugauguuL96	2550	смысловая	21
AACAUCAAUAGUGGCU GGCACCC	1455	asAfscauCfaAfUfagu gGfcUfggcacscsc	2551	антисмысловая	23
GGUGCCAGCCACUAUU GAUGU	1456	gsgsugccAfgCfCfAfc uauugauguL96	2552	смысловая	21
ACAUCAAUAGUGGCUG GCACCCC	1457	asCfsaucAfaUfAfgug gCfuGfgcaccscsc	2553	антисмысловая	23
ACAAGGACCGAGAAGU CACCA	1458	ascsaaggAfcCfGfAfg aagucaccaL96	2554	смысловая	21

UGGUGACUUCUCGGUC CUUGUAG	1459	usGfsgugAfcUfUfcuc gGfuCfcuugusasg	2555	антисмысловая	23
CAAGGACCGAGAAGUC ACCAA	1460	csasaggaCfcGfAfGfa agucaccaaL96	2556	смысловая	21
UUGGUGACUUCUCGGU CCUUGUA	1461	usUfsgguGfaCfUfucu cGfgUfccuugsusa	2557	антисмысловая	23
AUCUACAAGGACCGAG AAGUC	1462	asuscuacAfaGfGfAfc cgagaagucL96	2558	смысловая	21
GACUUCUCGGUCCUUG UAGAUAU	1463	gsAfscuuCfuCfGfguc cUfuGfuagausasu	2559	антисмысловая	23
UAUCUACAAGGACCGA GAAGU	1464	usasucuaCfaAfGfGfa ccgagaaguL96	2560	смысловая	21
ACUUCUCGGUCCUUGU AGAUUAU	1465	asCfsuucUfcGfGfucc uUfgUfagauasusa	2561	антисмысловая	23
CAGAAUGUGAAAGUCA UCGAC	1466	csasgaauGfuGfAfAfa gucaucgacL96	2562	смысловая	21
GUCGAUGACUUUCACA UUCUGGC	1467	gsUfscgaUfgAfCfuuu cAfcAfuucugsgsc	2563	антисмысловая	23
AGAAUGUGAAAGUCAU CGACA	1468	asgsaaugUfgAfAfAfg ucaucgacaL96	2564	смысловая	21
UGUCGAUGACUUUCAC AUUCUGG	1469	usGfsucgAfuGfAfcuu uCfaCfaucuscsg	2565	антисмысловая	23
GUGCCAGAAUGUGAAA GUCAU	1470	gsusgccaGfaAfUfGfu gaaagucalL96	2566	смысловая	21
AUGACUUUCACAUUCU GGCACCC	1471	asUfsgacUfuUfCfaca uUfcUfggcacscsc	2567	антисмысловая	23
GGUGCCAGAAUGUGAA AGUCA	1472	gsgsugccAfgAfAfUfg ugaaagucalL96	2568	смысловая	21
UGACUUUCACAUUCUG GCACCCA	1473	usGfsacuUfuCfAfcau uCfuGfgcaccscsa	2569	антисмысловая	23
AGAUGUCCUCGAGAU CUAAA	1474	asgsauguCfcUfCfGfa gauacuaaaL96	2570	смысловая	21
UUUAGUAUCUCGAGGA CAUCUUG	1475	usUfsuagUfaUfCfucg aGfgAfcaucususg	2571	антисмысловая	23
GAUGUCCUCGAGAUAC UAAAG	1476	gsasugucCfuCfGfAfg auacuaaagL96	2572	смысловая	21
CUUUAGUAUCUCGAGG ACAUCUU	1477	csUfsuuaGfuAfUfcuc gAfgGfacaucsusu	2573	антисмысловая	23

UUCAAGAUGUCCUGA GAUAC	1478	ususcaagAfuGfUfCfc ucgagauacL96	2574	смысловая	21
GUAUCUGAGGACAUC UUGAACA	1479	gsUfsaucUfcGfAfgga cAfuCfuugaascsa	2575	антисмысловая	23
GUUCAAGAUGUCCUCG AGAUUA	1480	gsusucaaGfaUfGfUfc cucgagauaL96	2576	смысловая	21
UAUCUCGAGGACAUCU UGAACAC	1481	usAfsucuCfGfGfgac aUfcUfugaacsasc	2577	антисмысловая	23
GUGGACUUGCUGCAUA UGUGG	1482	gsusggacUfuGfCfUfg cauauguggL96	2578	смысловая	21
CCACAUUUGCAGCAAG UCCACUG	1483	csCfsacaUfaUfGfcag cAfaGfuccacsusg	2579	антисмысловая	23
UGGACUUGCUGCAUAU GUGGC	1484	usgsgacuUfgCfUfGfc auauguggcL96	2580	смысловая	21
GCCACAUUUGCAGCAA GUCCACU	1485	gsCfscacAfuAfUfgca gCfaAfguccascsu	2581	антисмысловая	23
GACAGUGGACUUGCUG CAUAU	1486	gsascaguGfgAfCfUfu gcugcauauL96	2582	смысловая	21
AUAUGCAGCAAGUCCA CUGUCGU	1487	asUfsaugCfaGfCfaag uCfcAfcugucsgsu	2583	антисмысловая	23
CGACAGUGGACUUGCUG GCAUA	1488	csgsacagUfgGfAfCfu ugcugcauaL96	2584	смысловая	21
UAUGCAGCAAGUCCAC UGUCGUC	1489	usAfsugcAfgCfAfagu cCfaCfugucgsusc	2585	антисмысловая	23
AACCAGUACUUUAUCA UUUUC	1490	asascagUfaCfUfUfu aucuuuucL96	2586	смысловая	21
GAAAAUGAUAAAGUAC UGGUUUC	1491	gsAfsaaaUfgAfUfaaa gUfaCfugguususc	2587	антисмысловая	23
ACCAGUACUUUAUCAU UUUCU	1492	ascscaguAfcUfUfUfa ucauuuucuL96	2588	смысловая	21
AGAAAAUGAUAAAGUA CUGGUUU	1493	asGfsaaaAfuGfAfuaa aGfuAfcuggususu	2589	антисмысловая	23
UUGAAACCAGUACUUU AUCAU	1494	ususgaaaCfcAfGfUfa cuuuaucauL96	2590	смысловая	21
AUGAUAAAGUACUGGU UUCAAAA	1495	asUfsgauAfaAfGfuac uGfgUfuucaasasa	2591	антисмысловая	23
UUUGAAACCAGUACUU UAUCA	1496	ususugaaAfcCfAfGfu acuuuaucaL96	2592	смысловая	21

UGAUAAAGUACUGGUU UCAAAAU	1497	usGfsauaAfaGfUfacu gGfuUfucaasasu	2593	антисмысловая	23
CGAGAAGUACCAAGA AGCUA	1498	csgsagaaGfuCfAfCfc aagaagcuaL96	2594	смысловая	21
UAGCUUCUUGGUGACU UCUCGGU	1499	usAfsgcuUfcUfUfggu gAfcUfucucsgsgsu	2595	антисмысловая	23
GAGAAGUCACCAAGAA GCUAG	1500	gsasgaagUfcAfCfCfa agaagcuagL96	2596	смысловая	21
CUAGCUUCUUGGUGAC UUCUCGG	1501	csUfsagcUfuCfUfugg uGfaCfuucucsgsg	2597	антисмысловая	23
GGACCGAGAAGUCACC AAGAA	1502	gsgsaccgAfgAfAfGfu caccaagaaL96	2598	смысловая	21
UUCUUGGUGACUUCUC GGUCCUU	1503	usUfscuuGfgUfGfacu uCfuCfpguccsusu	2599	антисмысловая	23
AGGACCGAGAAGUCAC CAAGA	1504	asgsgaccGfaGfAfAfg ucaccaagaL96	2600	смысловая	21
UCUUGGUGACUUCUCG GUCCUUG	1505	usCfsuugGfuGfAfcuu cUfcGfguccusug	2601	антисмысловая	23
UCAAGUGUUGGUAU GCCUG	1506	uscsaaagUfgUfUfGfg uaaugccugL96	2602	смысловая	21
CAGGCAUUAACACAC UUUGAAC	1507	csAfsggcAfuUfAfcca aCfaCfuugasasc	2603	антисмысловая	23
CAAAGUGUUGGUAUG CCUGA	1508	csasaaguGfuUfGfGfu aaugccugaL96	2604	смысловая	21
UCAGGCAUUAACCAACA CUUUGAA	1509	usCfsaggCfaUfUfacc aAfcAfcuugsasa	2605	антисмысловая	23
AGGUUCAAGUGUUGG UAAUG	1510	asgsguucAfaAfGfUfg uugguaaugL96	2606	смысловая	21
CAUUACCAACACUUUG AACCUGA	1511	csAfsuuaCfcAfAfcac uUfuGfaaccusgsa	2607	антисмысловая	23
CAGGUUCAAGUGUUG GUAAU	1512	csasgguuCfaAfAfGfu guugguaauL96	2608	смысловая	21
AUUACCAACACUUUGA ACCUGAG	1513	asUfsuacCfaAfCfacu uUfgAfaccugsasg	2609	антисмысловая	23
UAUUACUUGACAAAGA GACAC	1514	usasuuacUfuGfAfCfa aagagacacL96	2610	смысловая	21
GUGUCUCUUUGUCAAG UAAUACA	1515	gsUfsgucUfcUfUfugu cAfaGfuaauascsa	2611	антисмысловая	23

AUUACUUGACAAAGAG ACACU	1516	asusuacuUfgAfCfAfa agagacacuL96	2612	смысловая	21
AGUGUCUCUUUGUCAA GUAUAC	1517	asGfsuguCfuCfUfuug uCfaAfguaausasc	2613	антисмысловая	23
CAUGUAUUACUUGACA AAGAG	1518	csasuguaUfuAfCfUfu gacaaagagL96	2614	смысловая	21
CUCUUUGUCAAGUAAU ACAUGCU	1519	csUfscuuUfgUfCfaag uAfaUfacaugscsu	2615	антисмысловая	23
GCAUGUAUUACUUGAC AAAGA	1520	gscsauguAfuUfAfCfu ugacaaagaL96	2616	смысловая	21
UCUUUGUCAAGUAAUA CAUGCUG	1521	usCfsuuGfuCfAfagu aAfuAfcaugcsusg	2617	антисмысловая	23
AAAGUCAUCGACAAGA CAUUG	1522	asasagucAfuCfGfAfc aagacauugL96	2618	смысловая	21
CAAUGUCUUGUCGAUG ACUUUCA	1523	csAfsaugUfcUfUfguc gAfuGfacuuuscsc	2619	антисмысловая	23
AAGUCAUCGACAAGAC AUUGG	1524	asasgucaUfcGfAfCfa agacauuggL96	2620	смысловая	21
CCAAUGUCUUGUCGAU GACUUUC	1525	csCfsaauGfuCfUfugu cGfaUfgacuususc	2621	антисмысловая	23
UGUGAAAGUCAUCGAC AAGAC	1526	usgsugaaAfgUfCfAfu cgacaagacL96	2622	смысловая	21
GUCUUGUCGAUGACUU UCACAUU	1527	gsUfscuuGfuCfGfaug aCfuUfucacasusu	2623	антисмысловая	23
AUGUGAAAGUCAUCGA CAAGA	1528	asusgugaAfaGfUfCfa ucgacaagaL96	2624	смысловая	21
UCUUGUCGAUGACUUU CACAUUC	1529	usCfsuugUfcGfAfuga cUfuUfcacaususc	2625	антисмысловая	23
AUAUGUGGCUAAAGCA AUAGA	1530	asusauguGfgCfUfAfa agcaauagaL96	2626	смысловая	21
UCUAUUGCUUUAGCCA CAUAUGC	1531	usCfsuauUfgCfUfuua gCfcAfcauauusgsc	2627	антисмысловая	23
UAUGUGGCUAAAGCAA UAGAC	1532	usasugugGfcUfAfAfa gcaauagacL96	2628	смысловая	21
GUCUAUUGCUUUAGCC ACAU AUG	1533	gsUfscuaUfuGfCfuuu aGfcCfacauasusg	2629	антисмысловая	23
CUGCAUAUGUGGCUAA AGCAA	1534	csusgcAuAfuGfUfGfg cuaaagcaaL96	2630	смысловая	21

UUGC UUUAGCCACAUA UGCAGCA	1535	usUfsgcuUfuAfGfcc cAfuAfugcagscsa	2631	антисмысловая	23
GCUGCAUAUGUGGCUA AAGCA	1536	gscsugcaUfaUfGfUfg gcuaaagcaL96	2632	смысловая	21
UGC UUUAGCCACAUAU GCAGCAA	1537	usGfscuuUfaGfCfcac aUfaUfgcagcsasa	2633	антисмысловая	23
AGACGACAGUGGACUU GCUGC	1538	asgsacgaCfaGfUfGfg acuugcugcL96	2634	смысловая	21
GCAGCAAGUCCACUGU CGUCUCC	1539	gsCfsagcAfaGfUfcca cUfgUfcgucuscsc	2635	антисмысловая	23
GACGACAGUGGACUUG CUGCA	1540	gsascgacAfgUfGfGfa cuugcugcaL96	2636	смысловая	21
UGCAGCAAGUCCACUG UCGUCUC	1541	usGfscagCfaAfGfucc aCfuGfucgucsusc	2637	антисмысловая	23
UUGGAGACGACAGUGG ACUUG	1542	ususggagAfcGfAfCfa guggacuugL96	2638	смысловая	21
CAAGUCCACUGUCGUC UCCAAAA	1543	csAfsaguCfcAfCfugu cGfuCfuccaasasa	2639	антисмысловая	23
UUUGGAGACGACAGUG GACUU	1544	ususuggaGfaCfGfAfc aguggacuuL96	2640	смысловая	21
AAGUCCACUGUCGUCU CCAAAAU	1545	asAfsgucCfaCfUfguc gUfcUfccaasasu	2641	антисмысловая	23
GGCCACCUCUCAAUU GAAGA	1546	gsgscacCfuCfCfUfc aaugaagaL96	2642	смысловая	21
UCUUCAAUUGAGGAGG UGGCCCA	1547	usCfsuucAfaUfUfgag gAfgGfuggccscsa	2643	антисмысловая	23
GCCACCUCUCAAUUG AAGAA	1548	gscscaccUfcCfUfCfa auugaagaaL96	2644	смысловая	21
UUCUUCAAUUGAGGAG GUGGCC	1549	usUfscuuCfaAfUfuga gGfaGfuggcscsc	2645	антисмысловая	23
CCUGGCCACCUCUC AAUUG	1550	ccsugggCfcAfCfCfu ccucaauugL96	2646	смысловая	21
CAAUUGAGGAGGUGGC CCAGGAA	1551	csAfsauuGfaGfGfagg uGfgCfccaggsasa	2647	антисмысловая	23
UCCUGGCCACCUCU CAAUU	1552	uscscuggGfcCfAfCfc uccucaauuL96	2648	смысловая	21
AAUUGAGGAGGUGGCC CAGGAAC	1553	asAfsuugAfgGfAfggu gGfcCfcaggasasc	2649	антисмысловая	23

UGUAUGUUACUUCUUA GAGAG	1554	usgsuaugUfuAfCfUfu cuuagagagL96	2650	смысловая	21
CUCUCUAAGAAGUAA AUACAUC	1555	csUfscucUfaAfGfaag uAfaCfauacasusc	2651	антисмысловая	23
GUAUGUUACUUCUAG AGAGA	1556	gsusauguUfaCfUfUfc uuagagagaL96	2652	смысловая	21
UCUCUCUAAGAAGUAA CAUACAU	1557	usCfsucuCfuAfAfgaa gUfaAfcauacsasu	2653	антисмысловая	23
AGGAUGUAUGUUACUU CUUAG	1558	asgsgaugUfaUfGfUfu acuucuuagL96	2654	смысловая	21
CUAAGAAGUAAACAUAC AUCCUAA	1559	csUfsaagAfaGfUfaac aUfaCfauccusasa	2655	антисмысловая	23
UAGGAUGUAUGUUACU UCUUA	1560	usasggauGfuAfUfGfu uacuucuaL96	2656	смысловая	21
UAAGAAGUAAACAUACA UCCUAAA	1561	usAfsagaAfgUfAfaca uAfcAfuccuasasa	2657	антисмысловая	23
AAAUGUUUUAGGAUGU AUGUU	1562	asasauguUfuUfAfGfg auguauguuL96	2658	смысловая	21
AACAUACAUCUAAAA CAUUUGG	1563	asAfscauAfcAfUfccu aAfaAfcauusgsg	2659	антисмысловая	23
AAUGUUUUAGGAUGUA UGUUA	1564	asasuguuUfuAfGfGfa uguauguuaL96	2660	смысловая	21
UAACAUACAUCUAAAA ACAUUUG	1565	usAfsacaUfaCfAfucc uAfaAfacauusug	2661	антисмысловая	23
AUCCAAUGUUUUAGG AUGUA	1566	asusccaaAfuGfUfUfu uaggauguaL96	2662	смысловая	21
UACAUCUAAAAACAUU UGGAUUA	1567	usAfscauCfcUfAfaaa cAfuUfuggausasu	2663	антисмысловая	23
UAUCCAAUGUUUUAG GAUGU	1568	usasuccaAfaUfGfUfu uuaggauguL96	2664	смысловая	21
ACAUCUAAAAACAUU GGAUUA	1569	asCfsaucCfuAfAfaac aUfuUfggauasusa	2665	антисмысловая	23
AUGGGUGGCGGUAUU GGUGA	1570	asusggguGfgCfGfGfu aauggugaL96	2666	смысловая	21
UCACCAAUUACCGCCA CCCAUUC	1571	usCfsaccAfaUfUfacc gCfcAfcccaususc	2667	антисмысловая	23
UGGGUGGCGGUAUUUG GUGAU	1572	usgsggugGfcGfGfUfa auuggugauL96	2668	смысловая	21

AUCACCAAUUACCGCC ACCCAAU	1573	asUfscacCfaAfUfuac cGfcCfaccasusu	2669	антисмысловая	23
UGGAAUGGGUGGCGGU AAUUG	1574	usgsgaaUGfgGfUfGfg cgguauugL96	2670	смысловая	21
CAAUUACCGCCACCCA UUCCAAU	1575	csAfsauuAfcCfGfcca cCfcAfuuccasasu	2671	антисмысловая	23
UUGGAAUGGGUGGCGG UAAUU	1576	ususggaaUfgGfGfUfg gcguauuuL96	2672	смысловая	21
AAUUACCGCCACCCAU UCCAAUU	1577	asAfsuuaCfcGfCfcac cCfaUfuccasusu	2673	антисмысловая	23
UUCAAAGUGUUGGUA UGCCU	1578	ususcaaaGfUGfUfUfg guaaugccuL96	2674	смысловая	21
AGGCAUUAACCAACACU UUGAAC	1579	asGfsgcaUfuAfCfcaa cAfcUfuugaascsc	2675	антисмысловая	23
UCAAGUGUUGGUAAU GCCUG	1580	uscsaaagUfgUfUfGfg uaaugccugL96	2676	смысловая	21
CAGGCAUUAACCAACAC UUUGAAC	1581	csAfsggcAfuUfAfcca aCfaCfuugasasc	2677	антисмысловая	23
CAGGUUCAAAGUGUUG GUAAU	1582	csasgguuCfaAfAfGfu guugguauL96	2678	смысловая	21
AUUACCAACACUUUGA ACCUGAG	1583	asUfsuacCfaAfCfacu uUfgAfaccugsasg	2679	антисмысловая	23
UCAGGUUCAAAGUGUU GGUAA	1584	uscsagguUfcAfAfAfg uguugguaaL96	2680	смысловая	21
UUACCAACACUUUGAA CCUGAGC	1585	usUfsaccAfaCfAfcuu uGfaAfcugasgsc	2681	антисмысловая	23
CCACCUCUCAAUUGA AGAAG	1586	cscsaccuCfcUfCfAfa uugaagaagL96	2682	смысловая	21
CUUCUCAAUUGAGGA GGUGGCC	1587	csUfsucuUfcAfAfuug aGfgAfggugsgsc	2683	антисмысловая	23
CACCUCUCAAUUGAA GAAGU	1588	csasccucCfuCfAfAfu ugaagaaguL96	2684	смысловая	21
ACUUCUCAAUUGAGG AGGUGGC	1589	asCfsuucUfuCfAfauu gAfgGfaggugsgsc	2685	антисмысловая	23
UGGGCCACCUCUCA UUGAA	1590	usgsggccAfcCfUfCfc ucaauugaaL96	2686	смысловая	21
UUCAAUUGAGGAGGUG GCCCAGG	1591	usUfscaaUfuGfAfgga gGfuGfgccasgsg	2687	антисмысловая	23

CUGGGCCACCUCUCA AUUGA	1592	csusgggcCfaCfCfUfc cucaauugaL96	2688	смысловая	21
UCAAUUGAGGAGGUGG CCCAGGA	1593	usCfsaauUfgAfGfgag gUfgGfccagsgsa	2689	антисмысловая	23
GAGUGGGUGCCAGAAU GUGAA	1594	gsasguggGfuGfCfCfa gaaugugaaL96	2690	смысловая	21
UUCACAUUCUGGCACC CACUCAG	1595	usUfscacAfuUfCfugg cAfcCfcacucsasg	2691	антисмысловая	23
AGUGGGUGCCAGAAUG UGAAA	1596	asgsugggUfgCfCfAfg aaugugaaaL96	2692	смысловая	21
UUUCACAUUCUGGCAC CCACUCA	1597	usUfsucaCfaUfUfcug gCfaCfccacuscsa	2693	антисмысловая	23
CUCUGAGUGGGUGCCA GAAUG	1598	csuscugaGfuGfGfGfu gccagaaugL96	2694	смысловая	21
CAUUCUGGCACCCACU CAGAGCC	1599	csAfsuucUfgGfCfacc cAfcUfcagagscsc	2695	антисмысловая	23
GCUCUGAGUGGGUGCC AGAAU	1600	gscsucugAfgUfGfGfg ugccagaaL96	2696	смысловая	21
AUUCUGGCACCCACUC AGAGCCA	1601	asUfsucuGfgCfAfccc aCfuCfagagcscsa	2697	антисмысловая	23
GCACUGAUGUUCUGAA AGCUC	1602	gscsacugAfuGfUfUfc ugaaagcucL96	2698	смысловая	21
GAGCUUUCAGAACAU AGUGCCU	1603	gsAfsghuUfuCfAfgaa cAfuCfagugcscsu	2699	антисмысловая	23
CACUGAUGUUCUGAAA GCUCU	1604	csascugaUfgUfUfCfu gaaagcucuL96	2700	смысловая	21
AGAGCUUUCAGAACAU CAGUGCC	1605	asGfsagcUfuUfCfaga aCfaUfcagugscsc	2701	антисмысловая	23
AAAGGCACUGAUGUUC UGAAA	1606	asasaggcAfcUfGfAfu guucugaaaL96	2702	смысловая	21
UUUCAGAACAUAGUG CCUUUCC	1607	usUfsucaGfaAfCfauc aGfuGfccuuuscsc	2703	антисмысловая	23
GAAAGGCACUGAUGUU CUGAA	1608	gsasaaggCfaCfUfGfa uguucugaaL96	2704	смысловая	21
UUCAGAACAUAGUGC CUUUCCG	1609	usUfscagAfaCfAfuca gUfgCfcuuuscscg	2705	антисмысловая	23
GGGAAGGUGGAAGUCU UCCUG	1610	gsghgaagGfuGfGfAfa gucuuccugL96	2706	смысловая	21

CAGGAAGACUCCACC UUCCCUU	1611	csAfsggaAfgAfCfuuc cAfcCfuucccsusu	2707	антисмысловая	23
GGAAGGUGGAAGUCUU CCUGG	1612	gsgsaaggUfgGfAfAfg ucuuccuggL96	2708	смысловая	21
CCAGGAAGACUCCACC CUUCCCU	1613	csCfsaggAfaGfAfcuu cCfaCfcuuccscsu	2709	антисмысловая	23
GGAAGGGAAGGUGGAA GUCUU	1614	gsgsaaggGfaAfGfGfu ggaagucuuL96	2710	смысловая	21
AAGACUCCACCUUCC CUUCCAC	1615	asAfsgacUfuCfCfacc uUfcCfcuuccsasc	2711	антисмысловая	23
UGGAAGGGAAGGUGGA AGUCU	1616	usgsgaagGfgAfAfGfg uggaagucuuL96	2712	смысловая	21
AGACUCCACCUUCCC UUCCACA	1617	asGfsacuUfcCfAfcuu uCfcCfuuccascsa	2713	антисмысловая	23
UGC AAAUCAGUACUU CCAAA	1618	usgscuaaAfuCfAfGfu acuuccaaaL96	2714	смысловая	21
UUUGGAAGUACUGAUU UAGCAUG	1619	usUfsuggAfaGfUfacu gAfuUfuagcasusg	2715	антисмысловая	23
GCUAAAUCAGUACUUC CAAAG	1620	gscsuaaaUfcAfGfUfa cuuccaaaagL96	2716	смысловая	21
CUUUGGAAGUACUGAU UUAGCAU	1621	csUfsuugGfaAfGfuac uGfaUfuuagcsasu	2717	антисмысловая	23
AACAUGC UAAAUCAGU ACUUC	1622	asascaugCfuAfAfAfu caguacuucL96	2718	смысловая	21
GAAGUACUGAUUUAGC AUGUUGU	1623	gsAfsaguAfcUfGfauu uAfgCfauguusgsu	2719	антисмысловая	23
CAACAUGC UAAAUCAG UACUU	1624	csasacauGfcUfAfAfa ucaguacuuL96	2720	смысловая	21
AAGUACUGAUUUAGCA UGUUGUU	1625	asAfsguaCfuGfAfuuu aGfcAfuguugsusu	2721	антисмысловая	23
CCACAACUCAGGAUGA AAAAU	1626	cscsacaaCfuCfAfGfg augaaaaauL96	2722	смысловая	21
AUUUUUCAUCCUGAGU UGUGGCG	1627	asUfsuuUfcAfUfccu gAfgUfugugscsg	2723	антисмысловая	23
CACAACUCAGGAUGAA AAAUU	1628	csascaacUfcAfGfGfa ugaaaaauuL96	2724	смысловая	21
AAUUUUUCAUCCUGAG UUGUGGC	1629	asAfsuuUfuCfAfucc uGfaGfuugugsgsc	2725	антисмысловая	23

GCCGCCACAACUCAGG AUGAA	1630	gscscgccAfcAfAfCfu caggaugaaL96	2726	смысловая	21
UUCAUCCUGAGUUGUG GCGGCAG	1631	usUfscauCfcUfGfagu uGfuGfgcgcsasg	2727	антисмысловая	23
UGCGGCCACAACUCAG GAUGA	1632	usgscgcCfaCfAfAfc ucaggaugaL96	2728	смысловая	21
UCAUCCUGAGUUGUGG CGGCAGU	1633	usCfsaucCfuGfAfguu gUfgGfcggcasgsu	2729	антисмысловая	23
GCAACCGUCUGGAUGA UGUGC	1634	gscsaaccGfuCfUfGfg augaugugcL96	2730	смысловая	21
GCACAUCAUCCAGACG GUUGCCC	1635	gsCfsacaUfcAfUfcca gAfcGfgguugcscsc	2731	антисмысловая	23
CAACCGUCUGGAUGAU GUGCG	1636	csasaccgUfcUfGfGfa ugaugugcgL96	2732	смысловая	21
CGCACAUCAUCCAGAC GGUUGCC	1637	csGfscacAfuCfAfucc aGfaCfpgguugscsc	2733	антисмысловая	23
CUGGGCAACCGUCUGG AUGAU	1638	csusgggcAfaCfCfGfu cuggaugauL96	2734	смысловая	21
AUCAUCCAGACGGUUG CCCAGGU	1639	asUfscauCfcAfGfacg gUfuGfccagsgsu	2735	антисмысловая	23
CCUGGGCAACCGUCUG GAUGA	1640	cscsugggCfaAfCfCfg ucuggaugaL96	2736	смысловая	21
UCAUCCAGACGGUUGC CCAGGUA	1641	usCfsaucCfaGfAfcgg uUfgCfccaggsusa	2737	антисмысловая	23
GCAAAUGAUGAAGAAA CUUUG	1642	gscsaaauGfaUfGfAfa gaaacuugL96	2738	смысловая	21
CAAAGUUUCUUAUCA UUUGCCC	1643	csAfsaagUfuUfCfuuc aUfcAfuugcscsc	2739	антисмысловая	23
CAAAGUAUGAAGAAAC UUUGG	1644	csasaaugAfuGfAfAfg aaacuuggL96	2740	смысловая	21
CCAAAGUUUCUUAUC AUUUGCC	1645	csCfsaaaGfuUfUfcuu cAfuCfauugscsc	2741	антисмысловая	23
UGGGGCAAAUGAUGAA GAAAC	1646	usgsgggcAfaAfUfGfa ugaagaaacL96	2742	смысловая	21
GUUUCUUAUCAUUUG CCCCAGA	1647	gsUfsuucUfuCfAfuca uUfuGfccccasgsa	2743	антисмысловая	23
CUGGGGCAAAUGAUGA AGAAA	1648	csusggggCfaAfAfUfg augaagaaaL96	2744	смысловая	21

UUUCUUCAUCAUUGC CCCAGAC	1649	usUfsucuUfcAfUfc uUfgCfcccagsasc	2745	антисмысловая	23
CCAAGGCUGUGUUUGU GGGGA	1650	cscsaaggCfuGfUfGfu uugugggaL96	2746	смысловая	21
UCCCCACAAACACAGC CUUGGCG	1651	usCfscCfcAfAfaca cAfgCfcuuggscsg	2747	антисмысловая	23
CAAGGCUGUGUUUGUG GGGAG	1652	csasaggcUfgUfGfUfu uguggggagL96	2748	смысловая	21
CUCCCCACAAACACAG CCUUGGC	1653	csUfscCfcCfAfaac aCfAfgccuugsgsc	2749	антисмысловая	23
GGCGCCAAGGCUGUGU UUGUG	1654	gsgscgccAfaGfGfCfu guguuugL96	2750	смысловая	21
CACAAACACAGCCUUG GCGCAA	1655	csAfscaaAfcAfCfagc cUfuGfgcgccsasa	2751	антисмысловая	23
UGGCGCCAAGGCUGUG UUUGU	1656	usgsgcgcCfaAfGfGfc uguguuugL96	2752	смысловая	21
ACAAACACAGCCUUGG CGCCAAG	1657	asCfsaaaCfaCfAfgcc uUfgGfgcgccasag	2753	антисмысловая	23
ACUGCCGCCACAACUC AGGAU	1658	ascsugccGfcCfAfCfa acucaggauL96	2754	смысловая	21
AUCCUGAGUUGUGGCG GCAGUUU	1659	asUfscCuGfaGfUfugu gGfcGfgcagusus	2755	антисмысловая	23
CUGCCGCCACAACUCA GGAUG	1660	csusgccgCfcAfCfAfa cucaggauL96	2756	смысловая	21
CAUCCUGAGUUGUGGC GGCAGUU	1661	csAfsuccUfgAfGfuug uGfgCfggcagsusu	2757	антисмысловая	23
UCAAACUGCCGCCACA ACUCA	1662	uscsaaacUfgCfCfGfc cacaacucaL96	2758	смысловая	21
UGAGUUGUGGCGGCAG UUUGAAU	1663	usGfsaguUfgUfGfgcg gCfaGfuugasasu	2759	антисмысловая	23
UUCAAACUGCCGCCAC AACUC	1664	ususcaaaCfuGfCfCfG ccacaacucL96	2760	смысловая	21
GAGUUGUGGCGGCAGU UUGAAUC	1665	gsAfsguuGfuGfGfgcg cAfgUfuugaasusc	2761	антисмысловая	23
GGGAAGAUAUCAAUG GCUGA	1666	gsgsgaagAfuAfUfCfa aauggcugaL96	2762	смысловая	21
UCAGCCAUUGAUUAUC UUCCCAG	1667	usCfsagcCfaUfUfuga uAfuCfuucccsasg	2763	антисмысловая	23

GGAAGAUUCAAUUGG CUGAG	1668	gsgsaagaUfaUfCfAfa auggcugagL96	2764	смысловая	21
CUCAGCCAUUUGAUAU CUUCCCA	1669	csUfscagCfcAfUfuug aUfaUfcuuccscsa	2765	антисмысловая	23
AGCUGGGAAGAUUCA AAUGG	1670	asgscuggGfaAfGfAfu aucaaauggL96	2766	смысловая	21
CCAUUUGAUUCUUC CAGCUGA	1671	csCfsauuUfgAfUfauc uUfcCfcagcusgsa	2767	антисмысловая	23
CAGCUGGGAAGAUUUC AAAUG	1672	csasgcugGfgAfAfGfa uaucaaaugL96	2768	смысловая	21
CAUUUGAUUCUUC AGCUGAU	1673	csAfsuuuGfaUfAfucu uCfcCfcagcugsasu	2769	антисмысловая	23
AAUCAGUACUCCAAA GUCUA	1674	asasucagUfaCfUfUfc caaagucuaL96	2770	смысловая	21
UAGACUUUGGAAGUAC UGAUUUA	1675	usAfsgacUfuUfGfgaa gUfaCfugauususa	2771	антисмысловая	23
AUCAGUACUCCAAAG UCUAU	1676	asuscaguAfcUfUfCfc aaagucuaL96	2772	смысловая	21
AUAGACUUUGGAAGUA CUGAUUU	1677	asUfsagaCfuUfUfgga aGfuAfcugaususu	2773	антисмысловая	23
GCUAAAUCAGUACUUC CAAAG	1678	gscsuaaaUfcAfGfUfa cuuccaaagL96	2774	смысловая	21
CUUUGGAAGUACUGAU UUAGCAU	1679	csUfsuugGfaAfGfuac uGfaUfuagcsasu	2775	антисмысловая	23
UGCUGAAUACAGUACUU CCAAA	1680	usgscuaaAfuCfAfGfu acuuccaaaL96	2776	смысловая	21
UUUGGAAGUACUGAUU UAGCAUG	1681	usUfsuggAfaGfUfacu gAfuUfuagcasusg	2777	антисмысловая	23
UCAGCAUGCCAAUAUG UGUGG	1682	uscsagcaUfgCfCfAfa uauguguggL96	2778	смысловая	21
CCACACAUUUGGCAU GCUGACC	1683	csCfsacaCfaUfAfuug gCfaUfgcugascsc	2779	антисмысловая	23
CAGCAUGCCAAUAUGU GUGGG	1684	csasgcagGfcCfAfAfu auguguggL96	2780	смысловая	21
CCCACACAUUUGGCA UGCUGAC	1685	csCfscacAfcAfUfauu gGfcAfugcugsasc	2781	антисмысловая	23
AGGGUCAGCAUGCCAA UAUGU	1686	asgsggucAfgCfAfUfg ccaauauguL96	2782	смысловая	21

ACAUUUGGCAUGCUG ACCCUCU	1687	asCfsauaUfuGfGfc gCfuGfaccuscsu	2783	антисмысловая	23
GAGGGUCAGCAUGCCA AUAUG	1688	gsasggguCfaGfCfAfu gccaaauagL96	2784	смысловая	21
CAUAUUGGCAUGCUGA CCCUCUG	1689	csAfsuauUfgGfCfaug cUfgAfccucsusg	2785	антисмысловая	23
GCAUAUGUGGCUAAAG CAAUA	1690	gscsauauGfuGfGfCfu aaagcaauaL96	2786	смысловая	21
UAUUGCUUUAGCCACA UAUGCAG	1691	usAfsuugCfuUfUfagc cAfcAfuauagsasg	2787	антисмысловая	23
CAUAUGUGGCUAAAGC AAUAG	1692	csasuauUfgGfCfUfa aagcaauagL96	2788	смысловая	21
CUAUUGCUUUAGCCAC AUAUGCA	1693	csUfsauuGfcUfUfuag cCfaCfauaugscsa	2789	антисмысловая	23
UGCUGCAUAUGUGGCU AAAGC	1694	usgscugcAfuAfUfGfu ggcuaaagcL96	2790	смысловая	21
GCUUUAGCCACAUAUG CAGCAAG	1695	gsCfsuuuAfgCfCfaca uAfuGfcagcasasg	2791	антисмысловая	23
UUGCUGCAUAUGUGGC UAAAG	1696	ususgcugCfaUfAfUfg uggcuaaagL96	2792	смысловая	21
CUUUAGCCACAUAUGC AGCAAGU	1697	csUfsuuaGfcCfAfcau aUfgCfagcaagsu	2793	антисмысловая	23
AAAUGAUGAAGAAACU UUGGC	1698	asasaugaUfgAfAfGfa aacuuuggcL96	2794	смысловая	21
GCCAAAGUUUCUCAU CAUUUGC	1699	gsCfscaaAfgUfUfucu uCfaUfcuuusgsc	2795	антисмысловая	23
AAUGAUGAAGAAACUU UGGCU	1700	asasugauGfaAfGfAfa acuuuggcL96	2796	смысловая	21
AGCCAAAGUUUCUCA UCAUUUG	1701	asGfsccaAfaGfUfuuc uUfcAfucauusug	2797	антисмысловая	23
GGGCAAUGAUGAAGA AACUU	1702	gsgsgcaaAfuGfAfUfg aagaaacuuL96	2798	смысловая	21
AAGUUUCUCAUCAUU UGCCCCA	1703	asAfsguuUfcUfUfc cAfuUfugccscsa	2799	антисмысловая	23
GGGGCAAUGAUGAAG AAACU	1704	gsgsggcaAfaUfGfAfu gaagaaacuL96	2800	смысловая	21
AGUUUCUCAUCAUUU GCCCCAG	1705	asGfsuuuCfuUfCfauc aUfuUfgcccsasg	2801	антисмысловая	23

GAGAUACUAAAGGAAG AAUUC	1706	gsasgauaCfuAfAfAfg gaagaauucL96	2802	смысловая	21
GAAUUCUUCUUUAGU AUCUCGA	1707	gsAfsauuCfuUfCfcuu uAfgUfaucucsgsa	2803	антисмысловая	23
AGAUACUAAAGGAAGA AUUCC	1708	asgsauacUfaAfAfGfg aagaauuccL96	2804	смысловая	21
GGAAUUCUUCUUUAG UAUCUCG	1709	gsGfsaaUfCfUfUfccu uUfaGfuaucuscsg	2805	антисмысловая	23
CCUCGAGAUACUAAAG GAAGA	1710	cscsucgaGfaUfAfCfu aaaggaagaL96	2806	смысловая	21
UCUUCUUUAGUAUCU CGAGGAC	1711	usCfsuucCfuUfUfagu aUfCfCgaggsasc	2807	антисмысловая	23
UCCUCGAGAUACUAAA GGAAG	1712	uscscucgAfgAfUfAfc uaaaggaagL96	2808	смысловая	21
CUUCCUUUAGUAUCUC GAGGACA	1713	csUfsuccUfuUfAfgua uCfuCfCgaggascsa	2809	антисмысловая	23
ACAACUCAGGAUGAAA AAUUU	1714	ascaacuCfaGfGfAfu gaaaaauuuL96	2810	смысловая	21
AAAUUUUUAUCCUGA GUUGUGG	1715	asAfsauuUfuUfCfauc cUfgAfguugusgsg	2811	антисмысловая	23
CAACUCAGGAUGAAAA AUUUU	1716	csasacucAfgGfAfUfg aaaaauuuuL96	2812	смысловая	21
AAAAUUUUUAUCCUG AGUUGUG	1717	asAfsaaUfuUfUfcau cCfuGfaguugsusg	2813	антисмысловая	23
CGCCACAACUCAGGAU GAAAA	1718	csgsccacAfaCfUfCfa ggaugaaaaL96	2814	смысловая	21
UUUUAUCCUGAGUUG UGGCGGC	1719	usUfsuucAfuCfCfuga gUfuGfuggcgsgsc	2815	антисмысловая	23
CCGCCACAACUCAGGA UGAAA	1720	cscsgccaCfaAfCfUfc aggaugaaaL96	2816	смысловая	21
UUUAUCCUGAGUUGU GGCGGCA	1721	usUfsucaUfcCfUfgag uUfgUfgcggsasca	2817	антисмысловая	23
AGGGAAGGUGGAAGUC UUCCU	1722	asgsggaaGfgUfGfGfa agucuuccuL96	2818	смысловая	21
AGGAAGACUUCACCU UCCCUUC	1723	asGfsgaaGfaCfUfucc aCfcUfuccususc	2819	антисмысловая	23
GGGAAGGUGGAAGUCU UCCUG	1724	gsgsgaagGfuGfGfAfa gucuuccugL96	2820	смысловая	21

CAGGAAGACUCCACC UUCCCUU	1725	csAfsggaAfgAfCfuuc cAfcCfuucccsusu	2821	антисмысловая	23
UGGAAGGAAGGUGGA AGUCU	1726	usgsaagGfgAfAfGfg uggaagucL96	2822	смысловая	21
AGACUCCACCUUCCC UUCCACA	1727	asGfsacuUfcCfAfccu uCfcCfuuccascsa	2823	антисмысловая	23
GUGGAAGGAAGGUGG AAGUC	1728	gsusggaGfgGfAfAfG guggaagucL96	2824	смысловая	21
GACUCCACCUUCCCU UCCACAG	1729	gsAfscuuCfcAfCfcuu cCfcUfuccacsasg	2825	антисмысловая	23
GGCGAGCUUGCCACUG UGAGA	1730	gsGscgagCfuUfGfCfc acugugagaL96	2826	смысловая	21
UCUCACAGUGGCAAGC UCGCCGU	1731	usCfsucaCfaGfUfggc aAfgCfucgcsGsu	2827	антисмысловая	23
GCGAGCUUGCCACUGU GAGAG	1732	gsGscgagCfuUfGfCfc cugugagagL96	2828	смысловая	21
CUCUCACAGUGGCAAG CUCGCCG	1733	csUfscucAfcAfGfugg cAfaGfcucgcsGsu	2829	антисмысловая	23
GGACGGCGAGCUUGCC ACUGU	1734	gsGscgagCfuUfGfCfc ugccacugL96	2830	смысловая	21
ACAGUGGCAAGCUCGC CGUCCAC	1735	asCfsaguGfgCfAfagc uCfgCfcguccsasc	2831	антисмысловая	23
UGGACGGCGAGCUUGC CACUG	1736	usGsgacGfgGfAfGfc uugccacugL96	2832	смысловая	21
CAGUGGCAAGCUCGCC GUCCACA	1737	csAfsgugGfgAfAfGcu cGfcCfuguccascsa	2833	антисмысловая	23
AUGUGCGUAACAGAUU CAAAC	1738	asusgugCfuAfAfCfa gauucaaacL96	2834	смысловая	21
GUUUGAAUCUGUUACG CACAUA	1739	gsUfsuugAfaUfCfugu uAfcGfcacauscsa	2835	антисмысловая	23
UGUGCGUAACAGAUUC AAACU	1740	usGsgugUfaAfCfAfG auucaaacuL96	2836	смысловая	21
AGUUUGAAUCUGUUAC GCACAUC	1741	asGfsuuGfaAfUfcug uUfaCfGcacasusc	2837	антисмысловая	23
GAUGAUGCGUAACA GAUUC	1742	gsasugauGfuGfCfGfu aacagauucL96	2838	смысловая	21
GAAUCUGUUACGCACA UCAUCCA	1743	gsAfsaucUfgUfUfacg cAfcAfucaucscsa	2839	антисмысловая	23

GGAUGAUGUGCGUAAC AGAUU	1744	gsgsaugaUfgUfGfCfG uaacagauuL96	2840	смысловая	21
AAUCUGUUACGCACAU CAUCCAG	1745	asAfsucuGfuUfAfcgc aCfaUfcauccsasg	2841	антисмысловая	23
GGGUCAGCAUGCCAAU AUGUG	1746	gsgsgucaGfcAfUfGfc caauaugugL96	2842	смысловая	21
CACAUAUUGGCAUGCU GACCCUC	1747	csAfscauAfuUfGfgca uGfcUfgacccsusc	2843	антисмысловая	23
GGUCAGCAUGCCAAUA UGUGU	1748	gsgsucagCfaUfGfCfc aaauauguguL96	2844	смысловая	21
ACACAUAUUGGCAUGC UGACCCU	1749	asCfsacaUfaUfUfggc aUfgCfugaccscsu	2845	антисмысловая	23
CAGAGGGUCAGCAUGC CAAUA	1750	csasgaggGfuCfAfGfc augccaauaL96	2846	смысловая	21
UAUUGGCAUGCUGACC CUCUGUC	1751	usAfsuugGfcAfUfgcu gAfcCfcucugsusc	2847	антисмысловая	23
ACAGAGGGUCAGCAUG CCAAU	1752	ascsagagGfgUfCfAfg caugccaauL96	2848	смысловая	21
AUUGGCAUGCUGACCC UCUGUCC	1753	asUfsuggCfaUfGfcug aCfcCfucuguscsc	2849	антисмысловая	23
GCUUGAAUGGGAUCUU GGUGU	1754	gscsuugaAfuGfGfGfa ucuugguguL96	2850	смысловая	21
ACACCAAGAUCCEAUU CAAGCCA	1755	asCfsaccAfaGfAfucc cAfuUfcaagcscsa	2851	антисмысловая	23
CUUGAAUGGGAUCUUG GUGUC	1756	csusugaaUfgGfGfAfu cuuggugucL96	2852	смысловая	21
GACACCAAGAUCCEAU UCAAGCC	1757	gsAfsacacCfaAfGfauc cCfaUfcaagscsc	2853	антисмысловая	23
CAUGGCUUGAAUGGGA UCUUG	1758	csasuggcUfuGfAfAfu gggaucuuL96	2854	смысловая	21
CAAGAUCCEAUUCAAG CCAUGUU	1759	csAfsagaUfcCfCfauu cAfaGfccaugususu	2855	антисмысловая	23
ACAUGGCUUGAAUGGG AUCUU	1760	ascsauggCfuUfGfAfa ugggaucuuL96	2856	смысловая	21
AAGAUCCEAUUCAAGC CAUGUUU	1761	asAfsgauCfcCfAfuuc aAfgCfcaugususu	2857	антисмысловая	23
UCAAAUGGCUAGAGAAG ACUGA	1762	uscsaaauGfgCfUfGfa gaagacugaL96	2858	смысловая	21

UCAGUCUUCUCAGCCA UUUGAUA	1763	usCfsaguCfuUfCfuca gCfcAfuugasusa	2859	антисмысловая	23
CAAUUGGCUGAGAAGA CUGAC	1764	csasaaugGfcUfGfAfg aagacugacL96	2860	смысловая	21
GUCAGUCUUCUCAGCC AUUUGAU	1765	gsUfscagUfcUfUfcuc aGfcCfauuugsasu	2861	антисмысловая	23
GAUAUCAAUUGGCUGA GAAGA	1766	gsasuauCfaAfUfGfg cugagaagaL96	2862	смысловая	21
UCUUCUCAGCCAUUUG AUAUCUU	1767	usCfsuucUfcAfGfccca uUfuGfauaucsusu	2863	антисмысловая	23
AGAUAUCAAUUGGCUG AGAAG	1768	asgsauauCfaAfUfGfg gcugagaagL96	2864	смысловая	21
CUUCUCAGCCAUUUGA UAUCUUC	1769	csUfsucuCfaGfCfcac uUfgAfuaucusc	2865	антисмысловая	23
GAAAGUCAUCGACAAG ACAUU	1770	gsasaaguCfaUfCfGfa caagacauuL96	2866	смысловая	21
AAUGUCUUGUCGAUGA CUUUCAC	1771	asAfsuguCfuUfGfucg aUfgAfcuuucsasc	2867	антисмысловая	23
AAAGUCAUCGACAAGA CAUUG	1772	asasagucAfuCfGfAfc aagacauugL96	2868	смысловая	21
CAAUGUCUUGUCGAUG ACUUUCA	1773	csAfsaugUfcUfUfguc gAfuGfacuuuscsa	2869	антисмысловая	23
AUGUGAAAGUCAUCGA CAAGA	1774	asusgugaAfaGfUfCfa ucgacaagaL96	2870	смысловая	21
UCUUGUCGAUGACUUU CACAUUC	1775	usCfsuugUfcGfAfuga cUfuUfcacaususc	2871	антисмысловая	23
AAUGUGAAAGUCAUCG ACAAG	1776	asasugugAfaAfGfUfc aucgacaagL96	2872	смысловая	21
CUUGUCGAUGACUUUC ACAUCUC	1777	csUfsuguCfGfUfGfac uUfuCfacuuuscsu	2873	антисмысловая	23
GGCUAAUUUGUAUCAA UGAUU	1778	gsgscuaaUfuUfGfUfa ucaaugauuL96	2874	смысловая	21
AAUCAUUGAUACAAAU UAGCCGG	1779	asAfsucaUfuGfAfuac aAfaUfuagccsgsg	2875	антисмысловая	23
GCUAUUUGUAUCAAU GAUUA	1780	gscsuaauUfuGfUfAfu caaugauuaL96	2876	смысловая	21
UAAUCAUUGAUACAAA UUAGCCG	1781	usAfsaucAfuUfGfaua cAfaAfuuagcscsg	2877	антисмысловая	23

CCCCGGCUAAUUUGUA UCAAU	1782	cscscggCfuAfAfUfu uguaucaauL96	2878	смысловая	21
AUUGAUACAAAUUAGC CGGGGA	1783	asUfsugaUfaCfAfaau uAfgCfcgggsgsa	2879	антисмысловая	23
CCCCGGCUAAUUUGU AUCAA	1784	cscscggGfcUfAfAfu uuguaucaL96	2880	смысловая	21
UUGAUACAAAUUAGCC GGGGGAG	1785	usUfsgauAfcAfAfaau aGfcCfggggsasg	2881	антисмысловая	23
UGUCGACUUCUGUUUU AGGAC	1786	usgsucgaCfuUfCfUfg uuuaggacL96	2882	смысловая	21
GUCCUAAACAGAAGU CGACAGA	1787	gsUfscuAfaAfAfcag aAfgUfcgacagsa	2883	антисмысловая	23
GUCGACUUCUGUUUUA GGACA	1788	gsuscgaUfuCfUfGfu uuuaggacaL96	2884	смысловая	21
UGUCCUAAACAGAAG UCGACAG	1789	usGfsuccUfaAfAfaca gAfaGfucgacsasg	2885	антисмысловая	23
GAUCUGUCGACUUCUG UUUUA	1790	gsasucugUfcGfAfCfu ucuguuuuL96	2886	смысловая	21
UAAACAGAAGUCGAC AGAUCUG	1791	usAfsaaaCfaGfAfagu cGfaCfagaucsusg	2887	антисмысловая	23
AGAUCUGUCGACUUCU GUUUU	1792	asgsaucuGfuCfGfAfc uucuguuuuL96	2888	смысловая	21
AAAACAGAAGUCGACA GAUCUGU	1793	asAfsaacAfgAfAfguc gAfcAfgaucusgsu	2889	антисмысловая	23
CCGAGAAGUCACCAAG AAGCU	1794	cscsgagaAfgUfCfAfc caagaagcuL96	2890	смысловая	21
AGCUUCUUGGUGACUU CUCGGUC	1795	asGfscuuCfuUfGfgug aCfuUfcucggsusc	2891	антисмысловая	23
CGAGAAGUCACCAAGA AGCUA	1796	csgsagaaGfuCfAfCfc aagaagcuL96	2892	смысловая	21
UAGCUUCUUGGUGACU UCUCGGU	1797	usAfsgcuUfcUfUfggu gAfcUfucgsgsu	2893	антисмысловая	23
AGGACCGAGAAGUCAC CAAGA	1798	asgsgaccGfaGfAfAfg ucaccaagaL96	2894	смысловая	21
UCUUGGUGACUUCUCG GUCCUUG	1799	usCfsuugGfuGfAfcuu cUfcGfguccusug	2895	антисмысловая	23
AAGGACCGAGAAGUCA CCAAG	1800	asasggacCfGfAfAfa gucaccaagL96	2896	смысловая	21

CUUGGUGACUUCUCGG UCCUUGU	1801	csUfsuggUfgAfCfuuc uCfgGfuccuusgsu	2897	антисмысловая	23
AAACAUGGCUUGAAUG GGAUC	1802	asasacauGfgCfUfUfg aaugggaucL96	2898	смысловая	21
GAUCCCAUUAAGCCA UGUUUAA	1803	gsAfsuccCfaUfUfcaa gCfcAfuguuusasa	2899	антисмысловая	23
AACAUGGCUUGAAUGG GAUCU	1804	asascaugGfcUfUfGfa augggaucuL96	2900	смысловая	21
AGAUCCAUUAAGCC AUGUUUA	1805	asGfsaucCfcAfUfuca aGfcCfauguususa	2901	антисмысловая	23
UGUUAAACAUGGCUUG AAUGG	1806	usgsuuaaAfcAfUfGfg cuugaauggL96	2902	смысловая	21
CCAUUCAAGCCAUGUU UACAGC	1807	csCfsauuCfaAfGfcca uGfuUfuaacasgsc	2903	антисмысловая	23
CUGUAAACAUGGCUU GAAUG	1808	csusguuaAfaCfAfUfg gcuugaaugL96	2904	смысловая	21
CAUUCAAGCCAUGUUU AACAGCC	1809	csAfsuucAfaGfCfcu gUfuUfaacagscsc	2905	антисмысловая	23
GACUUGCUGCAUAUGU GGCUA	1810	gsascuugCfuGfCfAf auguggcuaL96	2906	смысловая	21
UAGCCACAUUGCAGC AAGUCCA	1811	usAfsgccAfcAfUfaug cAfgCfaaguscscsa	2907	антисмысловая	23
ACUUGCUGCAUAUGUG GCUAA	1812	ascsuugCfGfCfAfUfa uguggcuuaL96	2908	смысловая	21
UUAGCCACAUUGCAG CAAGUCC	1813	usUfsagcCfaCfAfua gCfaGfcaaguscs	2909	антисмысловая	23
AGUGGACUUGCUGCAU AUGUG	1814	asgsuggaCfuUfGfCfu gcuaugugL96	2910	смысловая	21
CACAUUGCAGCAAGU CCACUGU	1815	csAfscauAfUGfCfagc aAfgUfccacusgsu	2911	антисмысловая	23
CAGUGGACUUGCUGCA UAUGU	1816	csasguggAfcUfUfGfc ugcauauL96	2912	смысловая	21
ACAUAUGCAGCAAGUC CACUGUC	1817	asCfsauaUfgCfAfgca aGfuCfcacugsusc	2913	антисмысловая	23
UAAAUAGUACUCCA AAGUC	1818	usasaauCfGfUfAfCfu uccaaagucL96	2914	смысловая	21
GACUUUGGAAGUACUG AUUUAGC	1819	gsAfscuuUfgGfAfagu aCfuGfauuugasgsc	2915	антисмысловая	23

AAAUAGUACUCCAA AGUCU	1820	asasaucGfuAfCfUfu ccaagucuL96	2916	смысловая	21
AGACUUUGGAAGUACU GAUUUAG	1821	asGfsacuUfuGfGfaag uAfcUfgauuusasg	2917	антисмысловая	23
AUGC AAAUCAGUACU UCCAA	1822	asusgcuaAfaUfCfAfg uacuuccaaL96	2918	смысловая	21
UUGGAAGUACUGAUUU AGCAUGU	1823	usUfsggaAfgUfAfcug aUfuUfagcausgsu	2919	антисмысловая	23
CAUGC AAAUCAGUAC UUCCA	1824	csasugcuAfaUfCfAfa guacuuccaL96	2920	смысловая	21
UGGAAGUACUGAUUUA GCAUGUU	1825	usGfsgaaGfuAfCfuga uUfuAfgcaugsusu	2921	антисмысловая	23
UCCUCAAUUGAAGAAG UGGCG	1826	uscsucaAfuUfGfAfa gaaguggcgL96	2922	смысловая	21
CGCCACUUCUCAAUU GAGGAGG	1827	csGfscCaCfuUfCfuuc aAfuUfgaggasgsg	2923	антисмысловая	23
CCUCAAUUGAAGAAGU GGCGG	1828	cscsucaAfuUfGfAfa aaguggcgL96	2924	смысловая	21
CCGCCACUUCUCAAU UGAGGAG	1829	csCfsgccAfcUfUfcuu cAfaUfugaggsasg	2925	антисмысловая	23
CACCUCCUCAAUUGAA GAAGU	1830	csasccucCfuCfAfa ugaagaaguL96	2926	смысловая	21
ACUUCUCAAUUGAGG AGGUGGC	1831	asCfsuucUfuCfAfa gAfgGfaggugsgsc	2927	антисмысловая	23
CCACCUCCUCAAUUGA AGAAG	1832	csasaccuCfcUfCfAfa uugaagaagL96	2928	смысловая	21
CUUCUCAAUUGAGGA GGUGGCC	1833	csUfsucuUfcAfaFuug aGfgAfggugsgsc	2929	антисмысловая	23
CAAGAUGUCCUCGAGA UACUA	1834	csasagauGfuCfCfUfc gagauacuaL96	2930	смысловая	21
UAGUAUCUCGAGGACA UCUUGAA	1835	usAfsguaUfcUfCfag gAfcAfucuugsasa	2931	антисмысловая	23
AAGAUGUCCUCGAGAU ACUAA	1836	asasgaugUfcCfUfCf agauacuaaL96	2932	смысловая	21
UUAGUAUCUCGAGGAC AUCUUGA	1837	usUfsaguAfuCfUfcga gGfaCfaucusgsa	2933	антисмысловая	23
UGUUC AAGAUGUCCUC GAGAU	1838	usgsuucAfgAfuGf ccucgagauL96	2934	смысловая	21

AUCUCGAGGACAUCUU GAACACC	1839	asUfscucGfaGfGfaca uCfuUfgaacascsc	2935	антисмысловая	23
GUGUUCAAGAUUCCU CGAGA	1840	gsusguucAfaGfAfUfg uccucgagaL96	2936	смысловая	21
UCUCGAGGACAUCUUG AACACCU	1841	usCfsucgAfgGfAfcau cUfuGfaacacscsu	2937	антисмысловая	23
ACAUGCUGAAAUCAGUA CUUCC	1842	ascsaugcUfaAfAfUfc aguacuuccL96	2938	смысловая	21
GGAAGUACUGAUUUAG CAUGUUG	1843	gsGfsaagUfaCfUfgau uUfaGfcaugusug	2939	антисмысловая	23
CAUGCUGAAAUCAGUAC UUCCA	1844	csasugcuAfaAfUfCfa guacuuccaL96	2940	смысловая	21
UGGAAGUACUGAUUUUA GCAUGUU	1845	usGfsgaaGfuAfCfuga uUfuAfgcaugsusu	2941	антисмысловая	23
AACAACAUGCUGAAAUC AGUAC	1846	asascaacAfuGfCfUfa aaucaguacL96	2942	смысловая	21
GUACUGAUUUAGCAUG UUGUUCA	1847	gsUfsacuGfaUfUfuag cAfuGfuuguuscsc	2943	антисмысловая	23
GAACAACAUGCUGAAU CAGUA	1848	gsasacaaCfaUfGfCfu aaucaguaL96	2944	смысловая	21
UACUGAUUUAGCAUGU UGUUCAU	1849	usAfsucgAfuUfUfagc aUfgUfuguucsasu	2945	антисмысловая	23
GAAAGGCACUGAUGUU CUGAA	1850	gsasaaggCfaCfUfGfa uguucugaaL96	2946	смысловая	21
UUCAGAACAUCAUGUC CUUUCG	1851	usUfscagAfaCfAfuca gUfgCfcuuucscsg	2947	антисмысловая	23
AAAGGCACUGAUGUUC UGAAA	1852	asasaggcAfcUfGfAfu guucugaaaL96	2948	смысловая	21
UUUCAGAACAUCAUGU CCUUUC	1853	usUfsucaGfaAfCfauc aGfuGfccuuuscsc	2949	антисмысловая	23
UGCGGAAAGGCACUGA UGUUC	1854	usgscggaAfaGfGfCfa cugauguucL96	2950	смысловая	21
GAACAUCAGUGCCUUU CCGCACA	1855	gsAfsacaUfcAfGfugc cUfuUfccgcascsa	2951	антисмысловая	23
GUGCGGAAAGGCACUG AUGUU	1856	gsusgaggAfaAfGfGfc acugauguuL96	2952	смысловая	21
AACAUCAGUGCCUUUC CGCACAC	1857	asAfscauCfaGfUfgcc uUfuCfcgcacsasc	2953	антисмысловая	23

GUCAGCAUGCCAAUUAU GUGUG	1858	gsuscagcAfuGfCfCfa auaugugugL96	2954	смысловая	21
CACACAUAUUGGCAUG CUGACCC	1859	csAfsacAfuAfUfugg cAfuGfcugacscsc	2955	антисмысловая	23
UCAGCAUGCCAAUUAUG UGUGG	1860	uscsagcaUfgCfCfAfa uauguguggL96	2956	смысловая	21
CCACACAUAUUGGCAU GCUGACC	1861	csCfsacaCfaUfAfuug gCfaUfgcugascsc	2957	антисмысловая	23
GAGGGUCAGCAUGCCA AUAUG	1862	gsasggguCfaGfCfAfu gccaaauugL96	2958	смысловая	21
CAUAUUGGCAUGCUGA CCCUCUG	1863	csAfsuauUfgGfCfaug cUfgAfccucsusg	2959	антисмысловая	23
AGAGGGUCAGCAUGCC AAUAU	1864	asgsagggUfcAfGfCfa ugccaauauL96	2960	смысловая	21
AUAUUGGCAUGCUGAC CCUCUGU	1865	asUfsauuGfgCfAfugc uGfaCfccucsgsu	2961	антисмысловая	23
GAUGCUCGGAAUGUU GCUGA	1866	gsasugcuCfcGfGfAfa uguugcugaL96	2962	смысловая	21
UCAGCAACAUAUCCGGA GCAUCCU	1867	usCfsagcAfaCfAfuuc cGfgAfgcaucscsu	2963	антисмысловая	23
AUGCUCGGAAUGUUG CUGAA	1868	asusgcucCfgGfAfAfu guugcugaaL96	2964	смысловая	21
UUCAGCAACAUAUCCGG AGCAUCC	1869	usUfscagCfaAfCfauu cCfgGfagcauscsc	2965	антисмысловая	23
CAAGGAUGCUCGGAA UGUUG	1870	csasaggaUfgCfUfCfc ggaauguugL96	2966	смысловая	21
CAACAUAUCCGAGCAU CCUUGGA	1871	csAfsacaUfuCfCfpga gCfaUfccuugsgsa	2967	антисмысловая	23
CCAAGGAUGCUCGGAA AUGUU	1872	cscsaaggAfuGfCfUfc cggaauuuL96	2968	смысловая	21
AACAUAUCCGAGCAUC CUUGGAU	1873	asAfscauUfcCfGfgag cAfuCfcuuggsasu	2969	антисмысловая	23
GCGUAACAGAUUCAA CUGCC	1874	gscsguaaCfaGfAfUfu caaacugccL96	2970	смысловая	21
GGCAGUUUGAAUCUGU UACGCAC	1875	gsGfscagUfuUfGfaau cUfgUfuacgsasc	2971	антисмысловая	23
CGUAACAGAUUCAAAC UGCCG	1876	csgsuaacAfgAfUfUfc aaacugccgL96	2972	смысловая	21

CGGCAGUUUGAAUCUG UUACGCA	1877	csGfsgcaGfuUfUfgaa uCfuGfuucgscsa	2973	антисмысловая	23
AUGUGCGUACAGAUU CAAC	1878	asusgugcGfuAfAfCfa gauucaaacL96	2974	смысловая	21
GUUUGAAUCUGUUACG CACAUCA	1879	gsUfsuugAfaUfCfugu uAfcGfcacauscsa	2975	антисмысловая	23
GAUGUGCGUACAGAU UCAA	1880	gsasugugCfGfAfAfC agaucaaaaL96	2976	смысловая	21
UUUGAAUCUGUUACGC ACAUCAU	1881	usUfsugaAfuCfUfguu aCfGcfacauscasu	2977	антисмысловая	23
AGAGAAGAUGGGCUAC AAGGC	1882	asgsagaaGfaUfGfGfg cuacaaggcL96	2978	смысловая	21
GCCUUGUAGCCCAUCU UCUCUGC	1883	gsCfscuuGfuAfGfccc aUfcUfucucugsc	2979	антисмысловая	23
GAGAAGAUGGGCUACA AGGCC	1884	gsasgaagAfuGfGfGfc uacaaggccL96	2980	смысловая	21
GGCCUUGUAGCCCAUC UUCUCUG	1885	gsGfscuuUfgUfAfgcc cAfuCfuucucsusg	2981	антисмысловая	23
AGGCAGAGAAGAUGGG CUACA	1886	asgsgcagAfgAfAfGfa ugggcuacaL96	2982	смысловая	21
UGUAGCCCAUCUUCUC UGCCUGC	1887	usGfsuagCfcCfAfucu uCfuCfugccugsc	2983	антисмысловая	23
CAGGCAGAGAAGAUGG GCUAC	1888	csasggcaGfaGfAfAfg augggcuacL96	2984	смысловая	21
GUAGCCCAUCUUCUCU GCCUGCC	1889	gsUfsagcCfcAfUfcuu cUfcUfgccugscsc	2985	антисмысловая	23

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат, способный ингибировать экспрессию HAO1 в клетке, который содержит двухнитевое средство RNAi, содержащее смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, причем указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей:

GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA,
GAAAGUCAUCGACAAGACAUU или
GACUUUCAUCCUGGAAAUUA, и

указанная антисмысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей:

UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG,
AAUGUCUUGUCGAUGACUUUCAC или
UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA,

причем практически все нуклеотиды указанной смысловой нити и практически все нуклеотиды указанной антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами, и

причем указанная смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными через разветвленный бивалентный или тривалентный линкер на 3'-конце.

2. Конъюгат по п.1, в котором все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити являются модифицированными нуклеотидами.

3. Конъюгат по п.1, в котором указанная смысловая нить и указанная антисмысловая нить содержат участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в табл. 2.

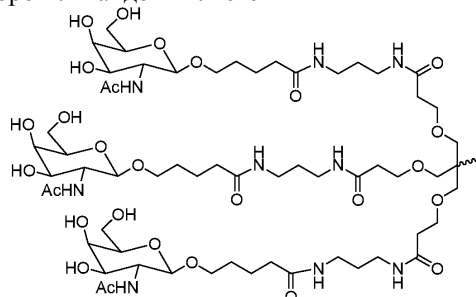
4. Конъюгат по любому из пп.1-3, причем по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокситиминового (dT) нуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, лишённого азотистого основания нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, нуклеотида, содержащего

го 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, и концевого нуклеотида, связанного с холестерилловым производным или бис-дециламидной группой додекановой кислоты.

5. Конъюгат по п.1, в котором по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступ, состоящий по меньшей мере из одного нуклеотида.

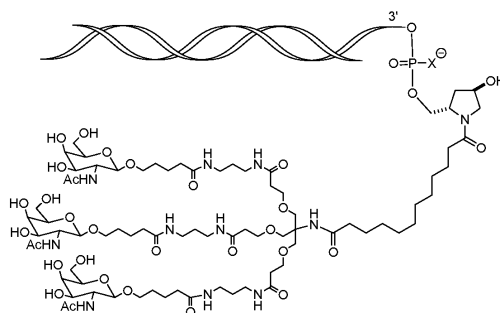
6. Конъюгат по п.1, в котором по меньшей мере одна нить содержит 3'-выступ, состоящий по меньшей мере из двух нуклеотидов.

7. Конъюгат по п.1, в котором лигандом является



8. Конъюгат по п.1, в котором лиганд присоединен к 3'-концу смысловой нити.

9. Конъюгат по п.8, в котором средство RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S.

10. Конъюгат по п.1, в котором указанное средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

11. Конъюгат по п.10, в котором фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной нити.

12. Конъюгат по п.10, в котором указанное средство RNAi содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей.

13. Конъюгат по п.12, в котором антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая нить содержит по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

14. Конъюгат по п.1, в котором парой оснований в положении 1 от 5'-конца антисмысловой нити дуплекса является пара оснований AU.

15. Конъюгат по п.1, в котором средство RNAi выбрано из группы, состоящей из AD-62994, AD-62933, AD-65585 и AD-62944.

16. Конъюгат, способный ингибировать экспрессию HAO1 в клетке, который содержит двухнитевое средство RNAi, содержащее смысловую нить и антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, причем указанная смысловая нить содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей:

GAAUGUGAAAGUCAUCGACAA,
GAAAGUCAUCGACAAGACAUU или
GACUUUCAUCCUGGAAAUUAU, и

указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей:

UUGUCGAUGACUUUCACAUUCUG,
AAUGUCUUGUCGAUGACUUUCAC или
UAUAUUUCCAGGAUGAAAGUCCA,

причем практически все нуклеотиды указанной смысловой нити содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

причем указанная смысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

причем практически все нуклеотиды указанной антисмысловой нити содержат модификацию, вы-

бранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации,

причем указанная антисмысловая нить содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и

причем указанная смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

17. Конъюгат по п.16, где все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити содержат модификацию.

18. Средство RNAi, выбранное из группы средств RNAi, приведенных в табл. 1 или 2.

19. Средство RNAi по п.16, где средство RNAi выбрано из группы, состоящей из AD-62994, AD-62933, AD-65585 и AD-62944.

20. Способ лечения индивида с расстройством, связанным с HAO1, включающий подкожное введение индивиду терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из пп.1-17, благодаря чему осуществляется лечение индивида.

21. Способ по п.20, в котором все нуклеотиды указанной смысловой нити и все нуклеотиды указанной антисмысловой нити содержат модификацию.

22. Способ по п.20, в котором индивидом является человек.

23. Способ по п.22, в котором у человека имеется PH1.

24. Способ по п.20, в котором двухнитевое средство RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 0,01 до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг.

25. Способ по п.24, в котором двухнитевое средство RNAi вводят в дозе, составляющей приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 1,0 мг/кг или приблизительно 3,0 мг/кг.

26. Способ по п.24, в котором двухнитевое средство RNAi вводят в дозе, составляющей от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/кг.

27. Способ по п.24, в котором двухнитевое средство RNAi вводят подкожно.

28. Способ по п.24, в котором двухнитевое средство RNAi вводят внутривенно.

29. Способ по п.24, в котором указанное средство RNAi вводят двумя или более дозами.

30. Способ по п.29, в котором указанное средство RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза приблизительно каждые 12 ч, одного раза приблизительно каждые 24 ч, одного раза приблизительно каждые 48 ч, одного раза приблизительно каждые 72 ч и одного раза приблизительно каждые 96 ч.

31. Способ по п.29, в котором указанное средство RNAi вводят один раз в неделю в течение периода длительностью до 2 недель, до 3 недель, до 4 недель, до 5 недель или дольше.

(SEQ ID NO:1).

>gi|11184232|ref|NM_017545.2| оксидаза 1 гидроксикислот Homo sapiens (гликолат-оксидаза) (HAO1), мРНК

CTGGGATAGCAATAACCTGTGAAAAATGCTCCCGCGCTAATTTGTATCAATGATTATGAACAACATGCTA
AATCAGTACTTCCAAAGTCTATATATGACTATTACAGGTCTGGGGCAAATGATGAAGAACTTTGGCTGA
TAATATTGCAGCATTTTCCAGATGGAAGCTGTATCCAGGATGCTCCGGAATGTTGCTGAAACAGATCTG
TCGACTTCTGTTTTAGGACAGAGGGTCAGCATGCCAATATGTGTGGGGGTACGGCCATGCAGCGCATGG
CTCATGTGGACGGCGAGCTTGCCACTGTGAGAGCCTGTCTAGTCCCTGGGAACGGGCATGATGTTGAGTTC
CTGGGCCACCTCCTCAATTGAAGAAGTGGCGGAAGCTGGTCTGAGGCACTTCGTGGCTGCAACTGTAT
ATCTACAAGGACCGAGAAGTCAACAAGAAGCTAGTGCAGGAGGAGAGATGGGCTACAAGGCCATAT
TTGTGACAGTGGACACACCTTACCTGGGCAACCGTCTGGATGATGTGCGTAACAGATTCAACTGCCGCC
ACAACCTCAGGATGAAAAATTTGAAACCACTACTTTATCATTTTCTCCTGAGGAAAAATTTGGAGACGAC
AGTGGACTTGTGTCATATGTGGCTAAAGCAATAGACCCATCTATCAGCTGGGAAGATATCAATGGCTGA
GAAGACTGACATCATTTGCCAATTGTGCAAAAGGGCATTTTGAGAGGTGATGATGCCAGGGAGGCTGTAA
ACATGGCTTGAATGGGATCTTGGTGTGCAATCATGGGGCTCGACAACCTCGATGGGGTGGCAGCCACTATT
GATGTTCTGCCAGAAATTTGGAGGCTGTGGAAGGGAAGGTGGAAGTCTTCCTGGACGGGGGTGTGCGGA
AAGGCACTGATGTTCTGAAAGCTCTGGCTCTTGGCGCAAGGCTGTGTTTGTGGGGAGACCAATCGTTTG
GGGCTTAGCTTTCCAGGGGGAGAAAGGTGTTCAAGATGTCTCGAGATACTAAAGGAAGAAATCCGGTTG
GCCATGGCTCTGAGTGGGTGCCAGAAATGTGAAAGTCATCGACAAGACATTGGTGAGGAAAAATCCTTTGG
CCGTTTCCAAGATCTGACAGTGCACAATATTTCCCATCTGTATATTTTTTTTTCAGCATGTATTACTTG
ACAAAGAGACACTGTGCAGAGGGTGACCACAGTCTGTAATTCCTCAATACAAAGGGTGTGCTTCT
TTTCCAAACAAATAGCAATCCCTTTTATTTCATTGCTTTTGAATTTTCAATGGGTGTCTAGGAACCTTT
TAGAAGAAATGGACTTTTCATCTCGAAATATATTAAGTGTAAAAAGAAACATTGAAATGTGTTTAG
ACAACGTCATCCCTTGGCAGGCTAAAGTGTCTATCTTTAGTAAATTTGAGGTTAGCAACACATAAGGT
GAAAGATAATGATCTCATTTGTTTATTAACCTGTATTCTGTTTACATGTCTTTAAACAGTGGTTCTTAA
ATTGTAAGCTCAGGTTCAAAGTGTGGTAATGCCTGATTCACAACCTTTGAGAAGGTAGCACTGGAGAGAA
TTGGAATGGGTGGCGGTAATTTGGTGATACTTTTGAATGTAGATTCCCAATCAGATCTTTAGTGTCTGA
ATATATCCAAATGTTTTAGGATGTATGTTACTTCTTAGAGAGAAATAAAGCATTTTGGGAAGAAAT

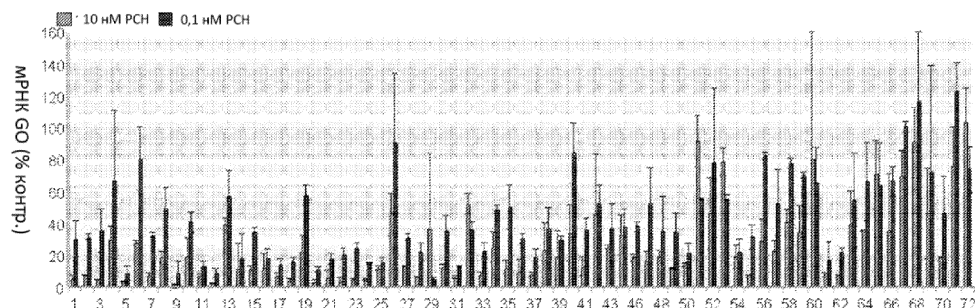
Фиг. 1

(SEQ ID NO:2)

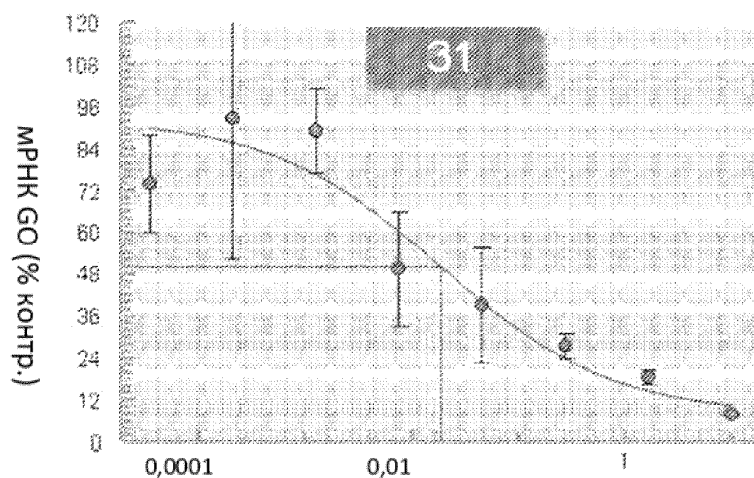
>gi|133893166|ref|NM_010403.2| оксидаза 1 гидроксикислот *Mus musculus*, печень (HAO1), мРНК

GGTTGCCCTACCCCTGCCACAATGTTGCCTCGACTGGTCTGCATCAGTGATTGAACAGCATGTCCGATC
 AGTGCCTTCAGAAGTCAGTGTATGACTATTACAGGTCTGGGGCAAATGATCAGGAGACGTTAGCTGATAAC
 ATCCAAGCATTTTCTAGATGGAAGCTCTATCCACGGATGCTTCGCAACGTTGCTGATATCGATCTGTCAA
 CTTCTGTTTTAGGACAGAGAGTCAGCATGCCAATATGTGTTGGGGCTACTGCCATGCAGTGCATGGCTCA
 CGTGGACGGGGAGCTGGCCACTGTGCGAGCCTGTGAGACCATGGGAACCTGGCATGATGCTGAGTTCTTGG
 GCTACCTCCTCAATAGAAGAAGTGGCAGAAGCTGGCCAGAGGCACTTCGCTGGATGCAACTGTACATCT
 ACAAAGACCGTGAGATCAGCAGACAGATAGTGAAGCGAGCTGAGAAGCAGGGTTACAAGGCCATATTTGT
 GACTGTGGACACCCCTTACCTGGGCAACCGCATTGATGACGTGCGGAACAGGTTCAAGCTGCCACCACAA
 CTCAGGATGAAAACTTTGAAACCAATGATTGGCATTCTCTCCTAAGGGAAATTTGGAGACAACAGTG
 GACTTGTGTAATATGTGGCACAAGCTATAGACCCATCTCTCAGCTGGGATGATATTACATGGCTCAGACG
 ATTGACATCACTGCCTATTGTTGTAAAGGGCATTGTGAGAGGTGATGATGCCAAGGAAGCTGTTAAACAT
 GGTGTGGATGGGACTTTGGTGTGCAATCATGGGCGCGACAACCTGGATGGGGTGCCAGCTACTATTGATG
 TCCTGCCAGAGATTGTTGAGGCTGTGGAAGGGAAGGTAGAAGTCTTCTGGATGGGGGAGTAAGGAAAGG
 TACTGATGTTCTCAAAGCTCTGGCCCTAGGAGCCAAGGCCGTTTGTGGGAAGACCCATCATCTGGGGC
 TTGGCTTTCCAGGGGGAGAAAGGTTTCAAGATGTCTCGAGATATTGAAGGAAGAAATCCGACTGGCCA
 TGGCTCTGAGTGGGTGCCAGAATGTGGAAGTCATCGACAAGACATTGGTGAGGAAAAATCCTTTGGCTGT
 TTCCAAGATCTGACAGTGCACAATATTTCCCATCTGTATTATTTTTTCCAGCGTGGATTACTTGACA
 AAGAGACACTGTGACAGGGGTGACCACAGACTGTAACCTCCCACTTCTATACAAAGGGTGTGCTTCTTT
 CCAACAAATAGCCACCCCTTTTCTTCATTGCTTTTGACTTTTCAATGGGTGTCTTAGGAACCTTCTAG
 AAAGAAATGGACTTGCATCTCGAAATATATTAAGTGTAAAAAGAAACATTGAAATGTGTTTGGGCA
 ACGTCATCCCTGGCAGGCTAAAGTGTGGGGAACAAAGATATCCTCTGGTGAGATTGCAGGTAGCATG
 CTGAAGTGAAGATACTGACCTCAGTTCATTAACCTGTCTTCTGTTTAGATTTCCTTAAGACAGTGGC
 TCTTACAGTTTGCCTTTGGCTTTGAAATGCTGGAATGCCAGAGAAACATGAGGTTTGGATTGCCATG
 TTGAGAAATAGCACCCAGGTAGAATTGAAATGGATGGTGGTAATTTGTGATTTTTTTCTAGAAACTTTT
 CATTTTTTAAACCCCTATTTTTTGAAGGTAGATTTTAGCTATATATCACACGTCTGAATATGTCTGGA
 TGTTTTGTGGCACTATTGCATTGAAAGGGATGTGTCTAGTCCAGTTGGGACCACATGGAGCTATTTTT
 ACTTTTGAACTTTGTCTCCTCATTCTATTTAAATAAGTGTGACTTCCTAATTCCTCTGAATCTTT
 TTTGATTTTCTCACTTTTCTCATTATAGTCACATTCAGTGTAAAGTACATATTTGTGGGGTCCGTGA
 TGAATAAAGATTTGAAATTTCTGTTTCAAGGAAGGCCAAAAAAGTCTTTCCCTTTTATCACA

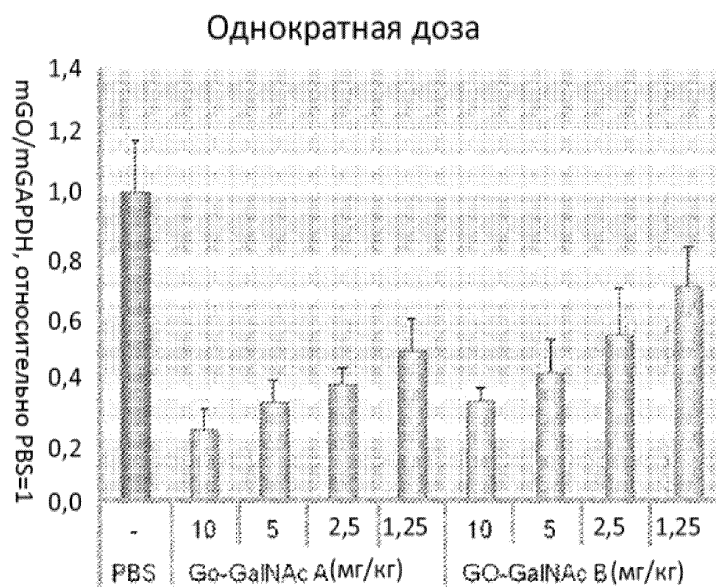
Фиг. 2



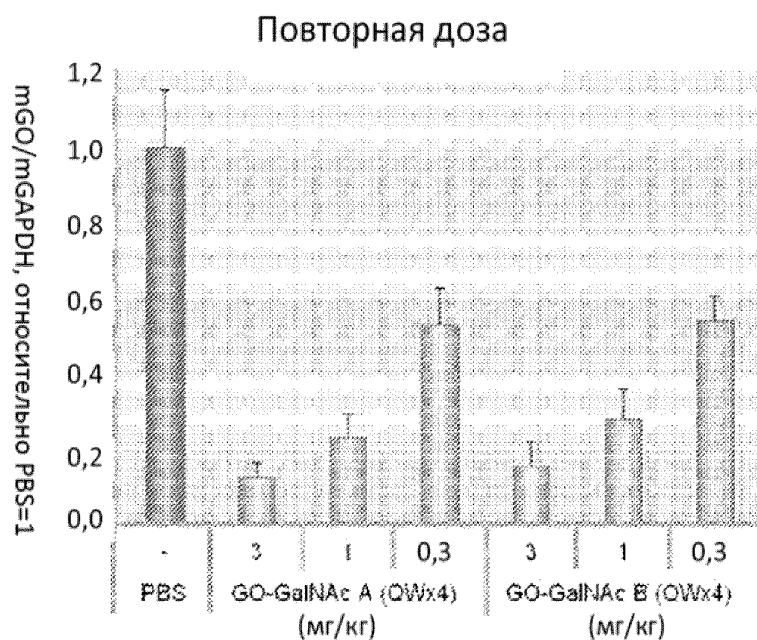
Фиг. 3А



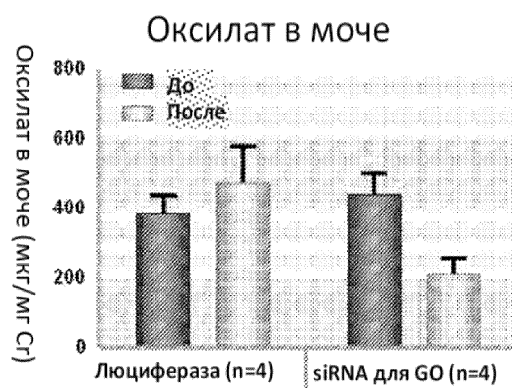
Фиг. 3В



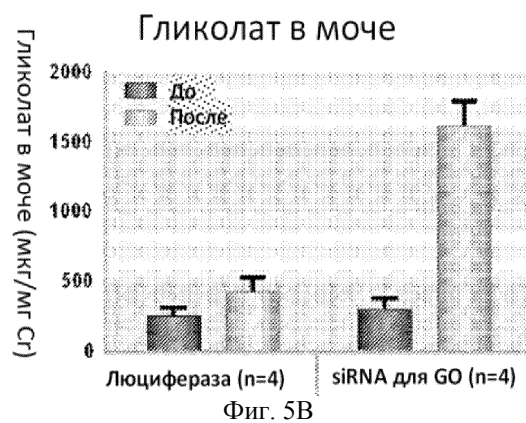
Фиг. 4А



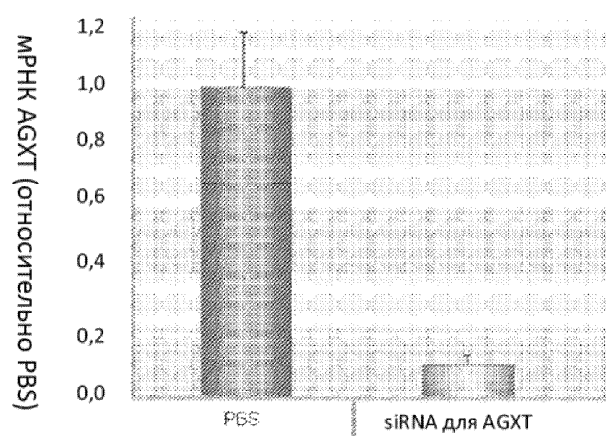
Фиг. 4В



Фиг. 5А

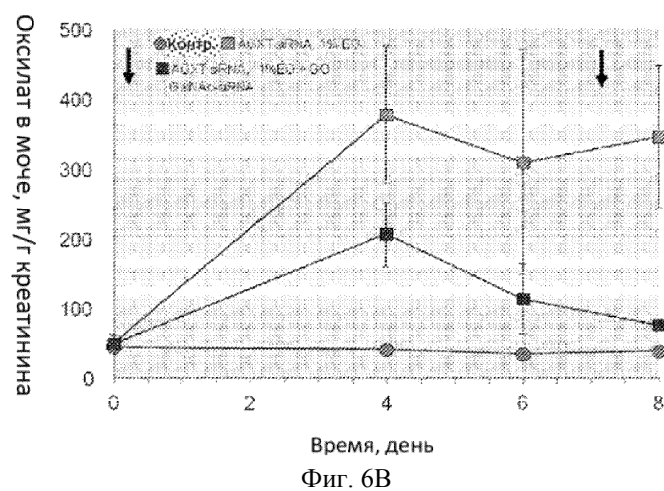


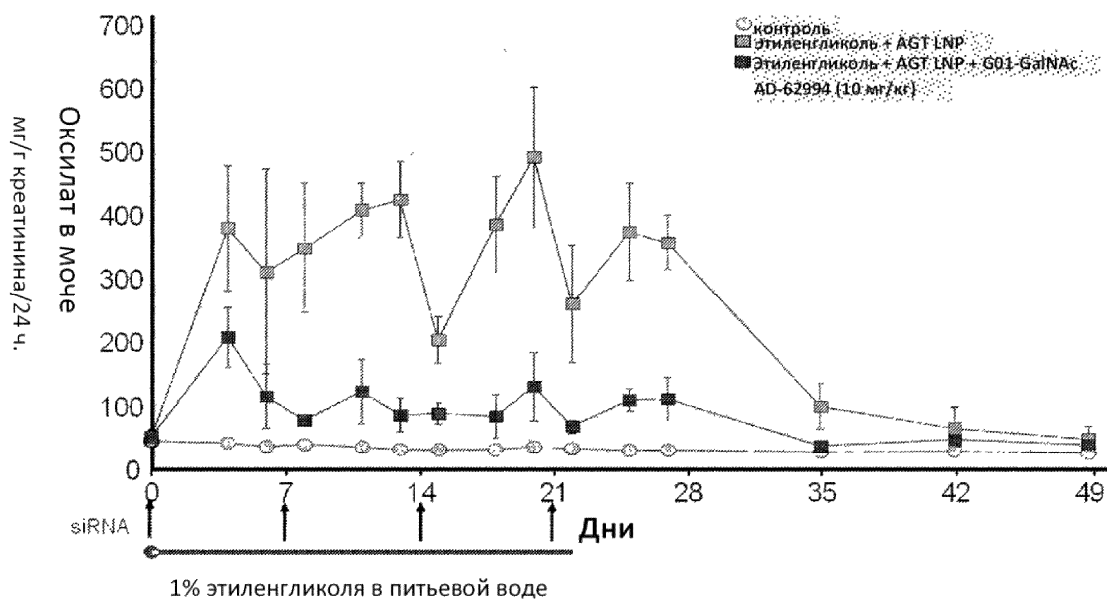
Нокдаун AGXT в печени



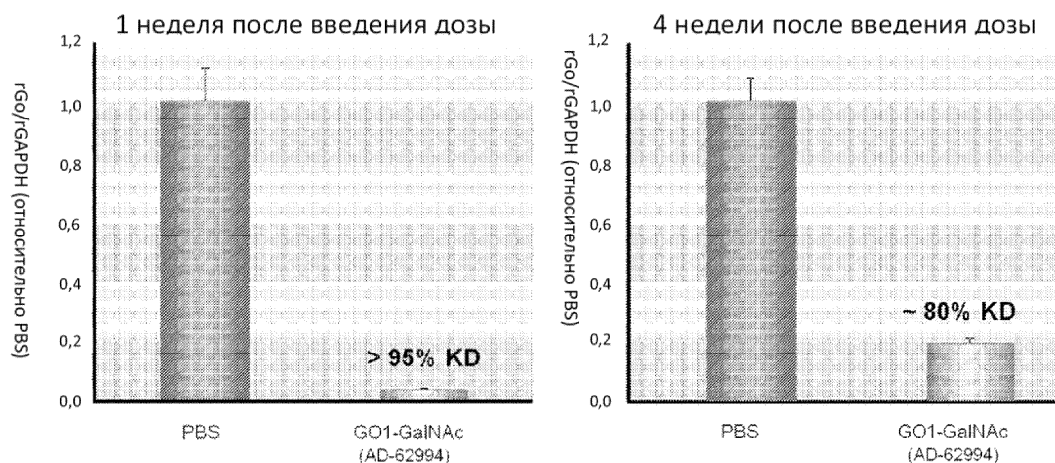
Фиг. 6A

Оксилат в моче





Фиг. 6С



Фиг. 6D

(SEQ ID NO:3)

ATTCTTCCCAAAATGCTTTATTTCTCTCTAAGAAGTAACATACATCCTAAACATTTGGATATATTGAGACACTAAAGA
TGTGATTGGAATCTACATTCAAAGAAGTATCACCATTACCGCCACCCATTCCAATTCTCTCCAGTGCTACCTTCTCAA
AGTTGTGAATCAGGCATTACCAACACTTTGAACCTGAGCTTACAATTTAAGAACCAGTGTTTTAAAGACATGTAACAGA
ATACAGGTTAATAAACAATGAGATCATTATCTTTTACCTTAGTGTTGCTACCTCCAATTTTACTAAAGGATACAGCAC
TTTAGCCTGCGAGGGATGACGTTGTCTAAACACATTTTCAATGTTTTCTTTTTAACAGTTAATATATTTCCAGGATGAA
AGTCCATTTCTTTAAAGGTTCTTAGGACACCCATTGAAAAGTCAAAAGCAATGAAATAAAAGGGATTGCTATTTTGT
TGGAAAAGAACGACACCCCTTTGTATTGAAGTGGGGAATTACAGACTGTGGTCACCCCTGTCACAGTGTCTCTTTGTCAAG
TAATACATGCTGAAAAAATAATACAGATGGGAAAAATATTGTCACTGTGATCTTGGAACGGCCAAAGGATTTTTC
CTCACCATTGCTTTGTCGATGACTTTCACATTTGGCACCCTCAGAGCCATGGCCAACCGAATTTCTCTTTAGTAT
CTCGAGGACATCTTGAACACCTTTCTCCCCCTGGAAAGCTAAGCCCCAAACGATTGGTCTCCCCACAAACAGCCTTGG
CGCCAAAGCCAGAGCTTTTCAACATCAGTGCCTTTCCGACACCCCGTCCAGGAAGACTTCCACCTTCCCTTCCCA
GCCTCCACATTTCTGGCAGAATCAATAGTGGCTGGCACCCTCAGATTGTCGAGCCCATGATTCGACACCAAGAT
CCCATTCAAGCCATGTTTAAACAGCTCCCTGGCATCATCCTCTCAAAATGCCCTTTGCAACAATTGGCAATGATGTCA
GTCTTCTCAGCCATTGATATCTTCCAGCTGATAGATGGGTCTATTGCTTTAGCCACATATGCAGCAAGTCCACTGTG
TCTCCAAATTTCTCAGGAGAAATGATAAGTACTGGTTTCAAAATTTTTCATCTGAGTTGTGGCGGCGAGTTTGA
TCTGTTACGCACATCATCCAGAGCTTTGCCCAGGTAAGTGTGTCCTGTCACAAATATGGCCTTTGAGCCCATCTCT
CTGCCCTGCCGCACTAGCTTCTTGGTGACTTCTCGGTCTTGTAGATATACAGTTGCAGCCAAACGAAGTGCCTCAGGACCA
GCTTCCGCCACTTCTCAATTGAGGAGGTGGCCAGGAATCAACATCATGCCCGTTCCAGGGACTGACAGGCTCTCAC
AGTGGCAAGCTCGCCGTCCACATGAGCCATGCGCTGCATGGCCGTAGCCCCACACATATTGGCATGCTGACCCCTGTGC
CTAAACAGAGTCCAGAGATCTGTTTCAGCAACATTCGGAGCATCTTGGATACAGCTTCCATCTGGAAATGCTGCA
ATATTATCAGCCAAAGTTTCTTTCATTTGCCCCAGACCTGTAATAGTCATATATAGACTTTGGAAGTACTGATTTAGC
ATGTTGTTTATAATCATTGATACAAATTAGCCGGGGAGCATTTCACAGGTTATTGCTATCCAG

Фиг. 7

(SEQ ID NO:7)

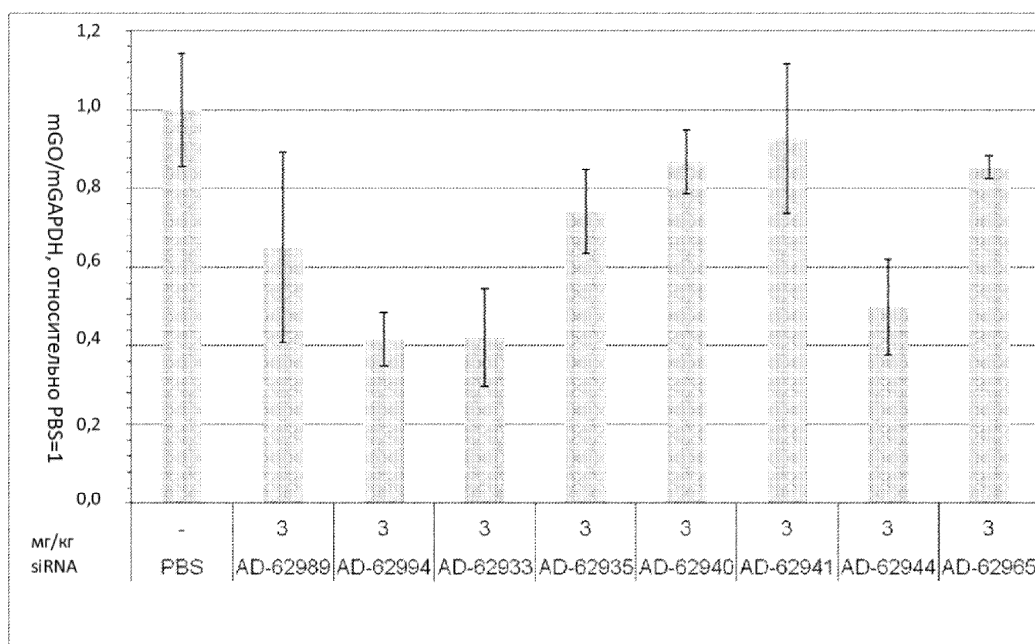
TATCCTTCCCAAAAAAGCTTTATTTCTCTCTGATTAAGAAGTAACATATATCTCTAAACATTGGATATATTCAGACACTAAAGATGTGATTGGAA
 AGCTGCATTCAAAGAAGTATCACCAGTTACTGCCATCCATTCCAATTCTATCCAGGGCTACCTTCTCAATGTTGTCAATCAGGCATTTCCAATGCTT
 TGAACCTGAGCTTACAAATTTAAGAACCACTGTTTTAAAGACATCTAAACAGAAATACAGGTTAATAAAACATGAGATCATATCTTTCCACCTTAGTG
 TTTGTACCTCCAATTTTACTAAAGGATACAGTACTTTAGCCTGCCAGAGGATGACGTTGTCTAAACACATTTTCAATGTTTTCTTTTAAACAGTTA
 ATATATTTCCAGGATGAAAGTCCATTTCTTTCTAAAAGGTTCTTAGGACACCCATTGAAAAGTCAAAAGCAATGAACATAAAGGATTGCTATTTTG
 TTGAAAAGAACGACATCCTTTGTATTGAAGTGGGGAATTACAGACTGTGGTCACCTCTGCACAGTGTCTTTTGTCAAGTAATACATGTGAAAA
 AAAAAATATACAGATGGGAAAAATTGTGCACTGTCAGATCTGGAAACGGCCAAAGGATTTTCTCACCATGTCTTGTGATGACTTTACATT
 CTGGCACCCTCAAAAGCCATGGCCAACCGGAATTCTTCTTTAGTATCTCAAGGACATCTTGAACACCTTTCTCCCTGGAAAGCTAAGCCCCAA
 ATGATTGGTCTCCCAACACACAGCCTTGGCGCAAGAGCCAGAGCTTTTCAGAACATCAGTGCCTTTCCGCACACCCCGTCCAGGAAGACTTCCA
 CCTTCCCTTCCAGGCTCCCAATTTCTGGCAGAACATCAATAGTGGTGGCAGCCCATCGAGTTGTGAGGCCCATGATTTCGACACCAAGATCCC
 ATTCAAGCCATGTTTAAACAGCCTCCCTGGCATCATCCTCTCAAAATGCCCTTTGCAACAATTGGCAATGACGTGCTTCTCAGCCATTTGATA
 TCTTCCAGCTGATAGATGGGTCTATCGCTTTAGCCACATATGCAGCAAGTCCACTGTCTATCTCAAAATTTTCTCAGGAGAAATGATAAAGTAC
 TGGTTTCAAAATTTTTCATCTGAGTTGTGGTGGCAGCTTGAATCTGTTACGTACATCATCAAGACGGTTGCCAGGTAAGTGTGTCCACTGTGAC
 AAATATGGCTTGTAGCCGCTCTTCTGTGCTGTGCAACAGCTTCTTGGTGAATCTCGGTCTTATAGATATACAGTTTAAACCAACGAAGTGGC
 TCAGGACAGCTTCTGCCACTTCTCAATTGAGGAGGTGGCCAGGAAGTCAACATCATGCCCGTTCCAGGAGTGCAGGCTCGCAGAGTGGCAA
 GCTCCGCCATCCCATGAGCCATGCGCTGCATGGCGTGGCCGCCACGCATATTGGCATGTGACCCCTCTGTCTTAAACAGAAAGTCGACAGATCTG
 TTCAGCAACATTCGGAGCATCTTGGATACAGCTTCCATCTGGAATAATGCTGCAACATTATCGGCCAAAGTTTCTTATCATTTTGTCTCAGACCTA
 TAATAGTCATATAGACTTTGGAAGTACTGATTAGCATGTTGTTTATAATCATTTGATACAAATTAGCCGGGGGAGCATTTTTCAGAGTTATTGTT
 ATCCAGATGGAGTTTGTGGGTTTTTTTAAATGATTGCTTTCTACATCTCTCAC

Фиг. 11

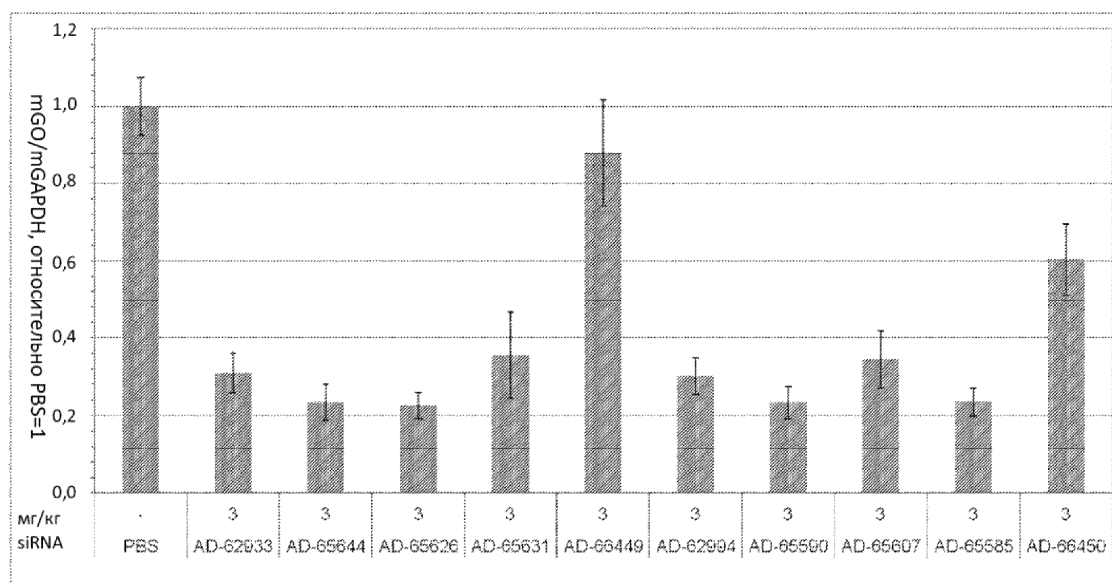
(SEQ ID NO:8)

TTTCTGGACAAGAAATTTAAAGCTTTATTCACCATGGACCCCAAAAATATATACTTGACACTGAATGTGACTATAAATGAGAAGTGAGAAAAATAA
 AAATGATTCAAGGGGAATTAGGAAGTCAACACTTACTTTAAAATGGGAATGAAGAGACAGAGTTCAAAAATAAAATAACTTTGCTAGGTCCCAAGT
 GGACTAGACACATTCTTTCAAACACAGTGAAGTGGCCAAAAACAGCCAGACATATTCAGACATGCGATATATAGCTAGAAATCCACCTTCAAAGAA
 ATAGGGTGTAAAAAATGAAAGTCTCTAGAAAAATCACAAATACCAACCATCCGTTTCAATTTCTATCGGGTGTCTATTTCTCAACACGGCAATC
 CAAACCCCATGTTTCTCGGCATTTCGGCATTTCAAAGCCAGCGCACACTGTAAAGGCCACTGTCTTAAGGAAATCTAAACAGAAGACAGGTT
 AATAAACAGTGAAGTCAAGTCTTTTACTTCGGCATGCTACCTCCAATCTCACCAGAGGATATCTTTTGTCCCTCACTTTAGCTTGCAGGGG
 ATGACGTTGCCAAACACATTTTCAATGTTTCTTTTAAACAGTTAATATATTTCCAGGATGCAAGTCCATTTCTTCTAGAAGGTTCTAGGACA
 CCCATTGAAAGTCAAAAGCAATGAAGGAGAAGGGTGGCTATTTGTTGAAAAGAACGACACCTTTGTTGTTGAAGTGGGAGTTACAGTCTGT
 GGTCAACCTCTGCACAGTGTCTTTGTCAAGTAATCCATGCTGGAAAAAATAATACAGATGGGAAAAATATTGTGCACTGTGAGATCTTTGAAAC
 AGCCAAAGGATTTTCTCACCATGTCTTGTGATGACTTTCACATTTGGCACCCTCAGAGCCATGGCCAGCCGGAACCTTCTCTTCACTAT
 CTCGAGGACATCTTGAACACCTTTCTCCCTTGGAAAGCCAAAGCCAGATGATGGGTCTCCCAACAAAACAGCTCTGGCTCCAGGGCCAGAGC
 TTTGAGAACATCGGTGCTTTCTGACTCCCCCATCCAGGAAGACTTCTACCTTCCCTTCCACAGCCTCAACGATCTCTGGCAGGCAATCAATAGT
 AGCTGGCACCCTCCAGTTGTGCTGCCCCATGATTCGACACTAAGATCCCATCCACACCATGTTTAAACAGCTTCTGGGCATCATCCTCTCAA
 AATTCCTTTTACAAACATGGGCAAGTGAAGTCAACCGTCTGAGCGCTTAAATATCATCCAGCTGAGAGATGGGTCTATGGCTTGTGCCACATATTC
 AGCAAGGCCACTGTTGTCTCCAAAATTCCTTTAGGAGAAAAATGCCAAATCGTTGGTTTCAAAGTTTTTCTATCTGAGCTGTGGTGGTACTTGAA
 CCTGTTCCGCACATCATCGAAGCGATTTCCAGGTAAGGGGTGCCACAGTCACAAAATATGGCCTTGTAAACCATCTGCTCAGCCCTTCTCACTAG
 CTGACTGCTGACCTCAGATCTTTGTAGATGTAGAGTTGCATCCAGCGAAGTGCCTCCGGGCCAGCCTCTGCCACCTCTTCTATTGAGGAAGTGGC
 CCAGGAACCTCAACATCATGCCAGTTCCTATGGTCTGACAGGCTCGAACAGTGGCCAGCTCCCCATCCATGAGCCATGCACTGCTATAGCCGTAGC
 CCCAACGCAATTTGGCATGCTCACTCTGTCTTAAACAGAAAGTGCAGAGTTCGATATCAGCAACGTTGCGCAGCATCCGTGGATAGAGCTTCCA
 CTATAGTAGTCAGAAAGCCATGAGACTCTTCTGCTCGGTAGAACTTGGAGGTCAACAGTCTACTATGCTCAGAACTCTAGAATTTCCAAA
 GCCAGCAAGGCAGTAT

Фиг. 12

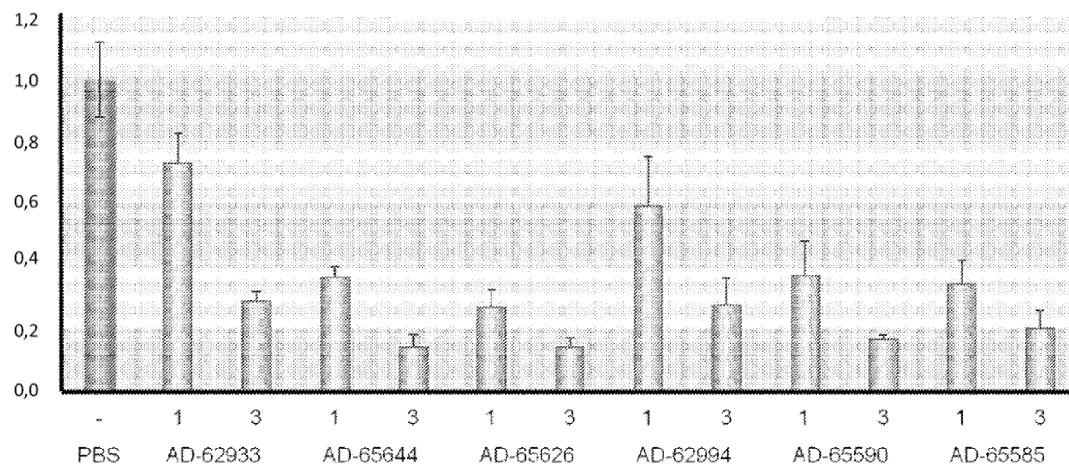


Фиг. 13

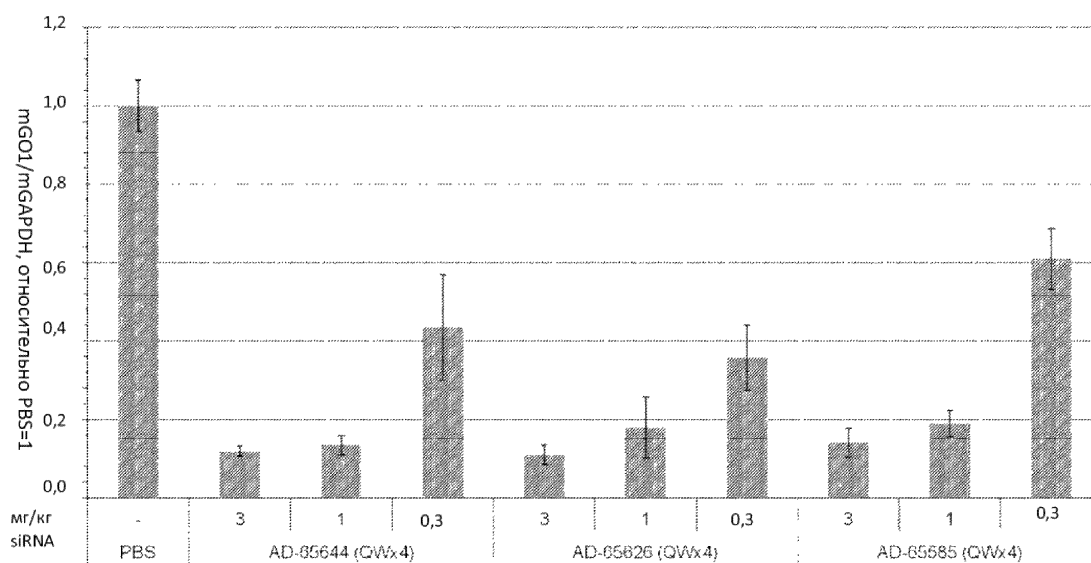


Фиг. 14

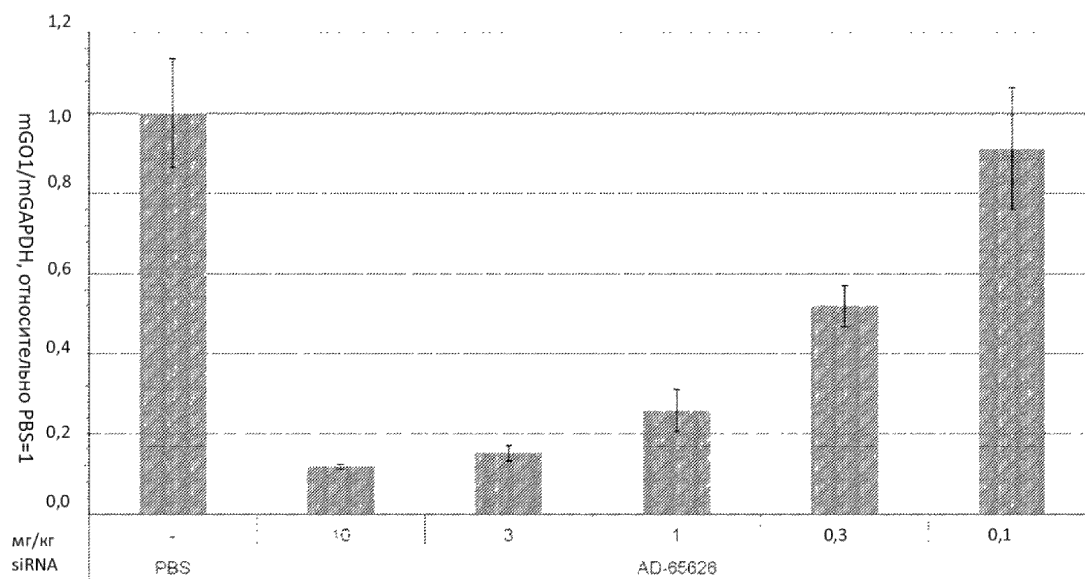
Однократная доза, 10-й день



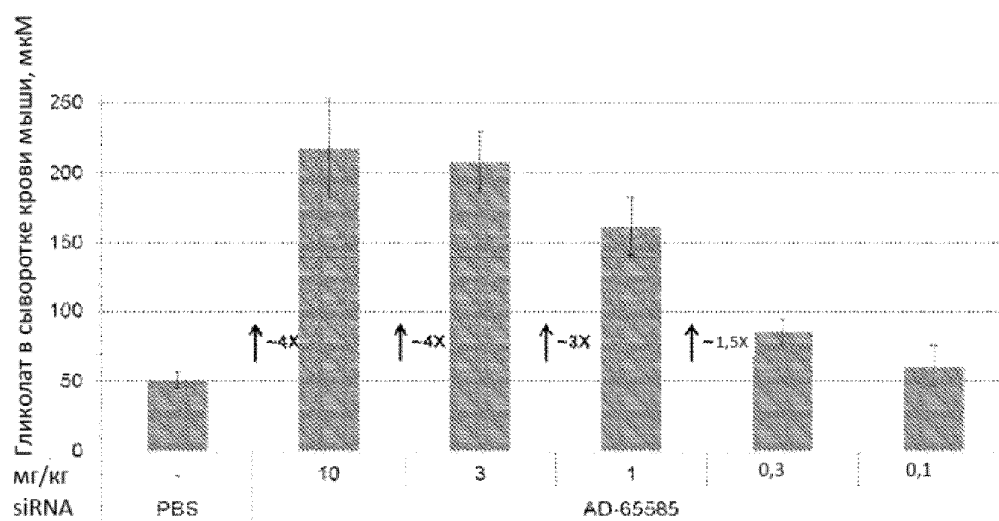
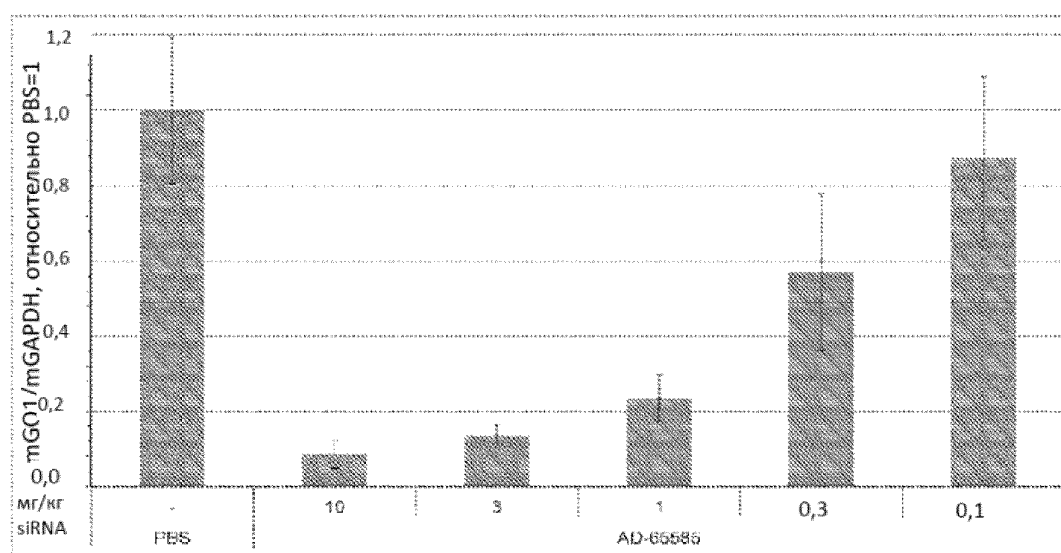
Фиг. 15



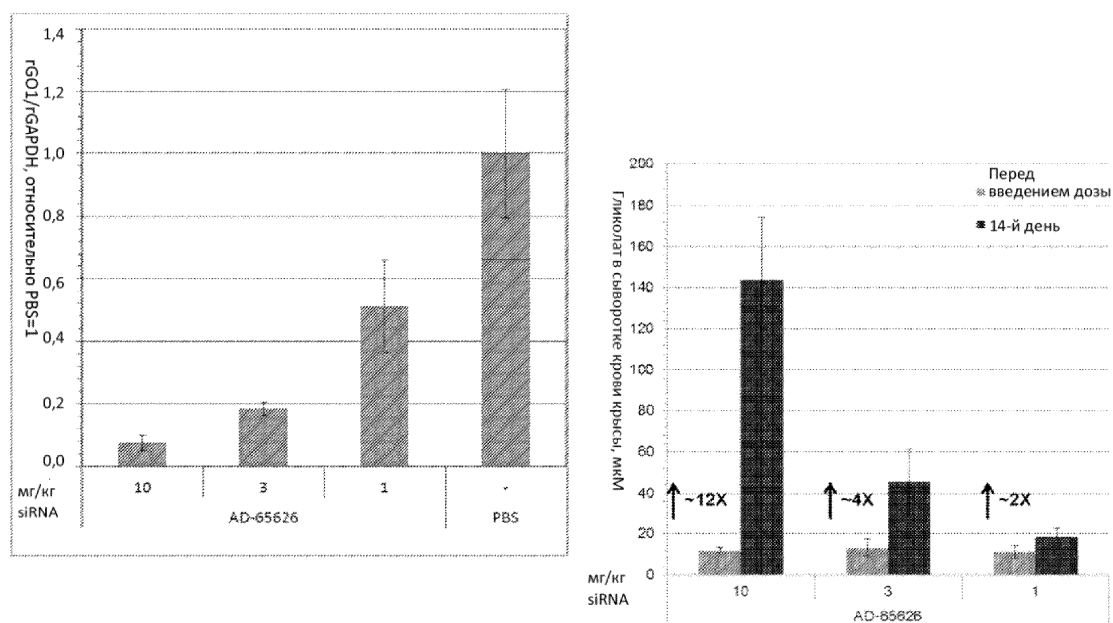
Фиг. 16



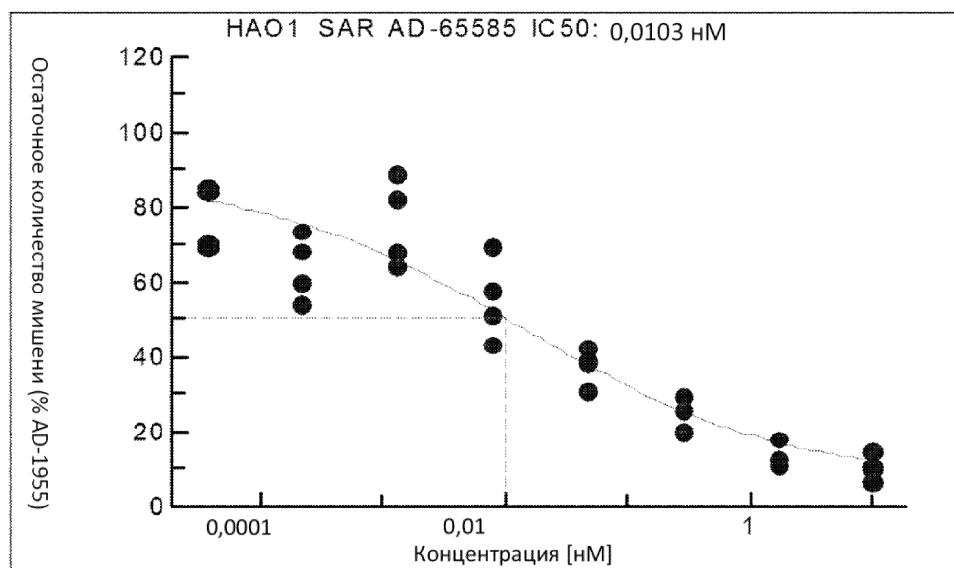
Фиг. 17



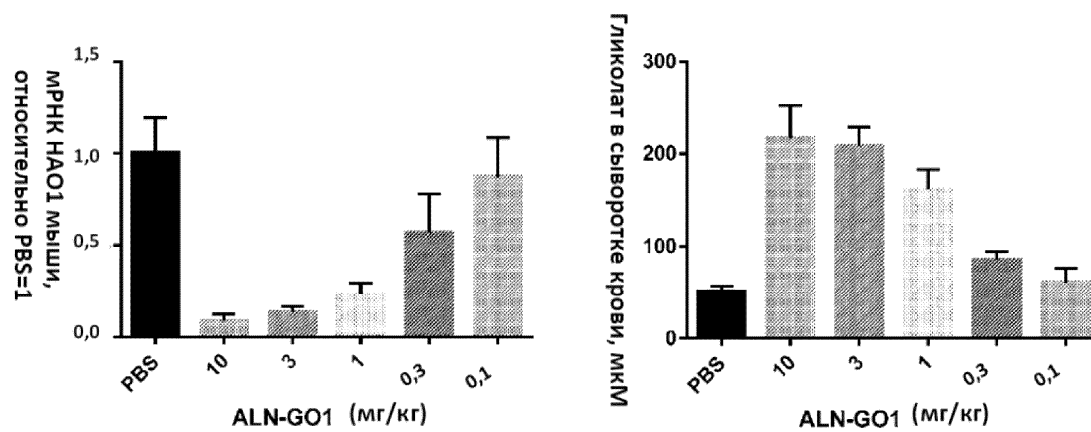
Фиг. 18



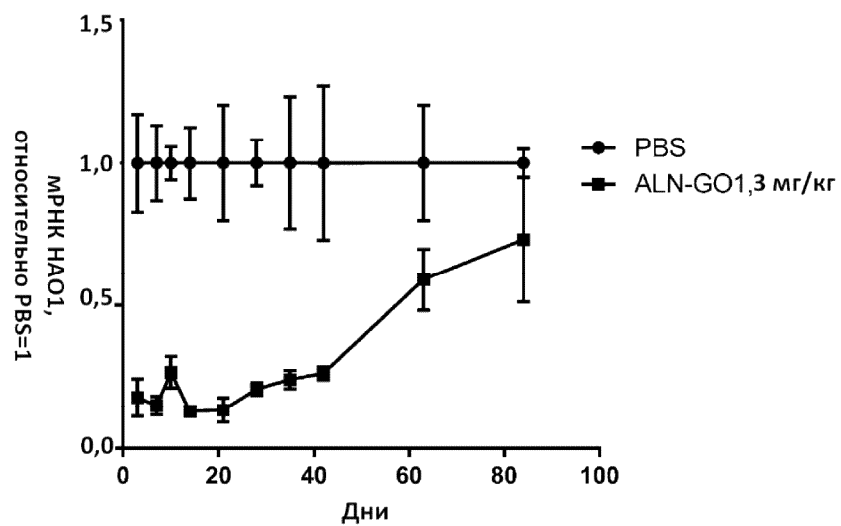
Фиг. 19



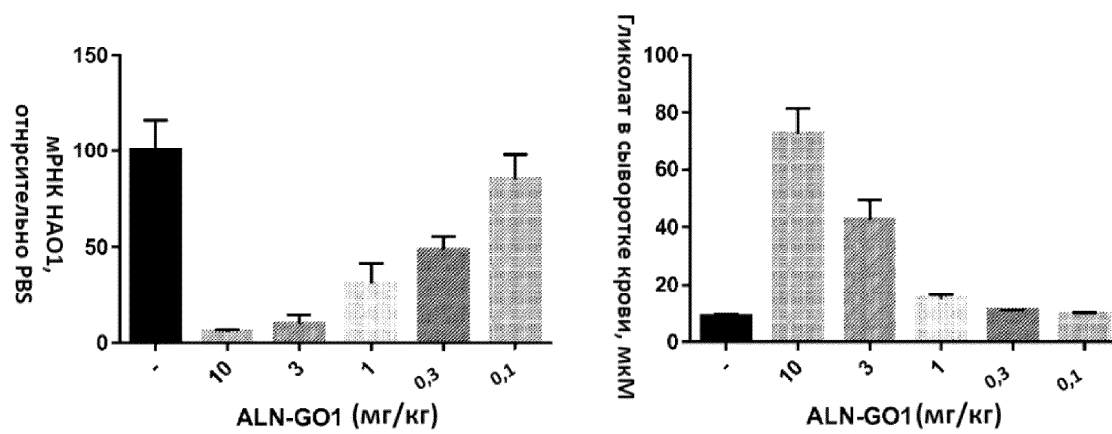
Фиг. 20



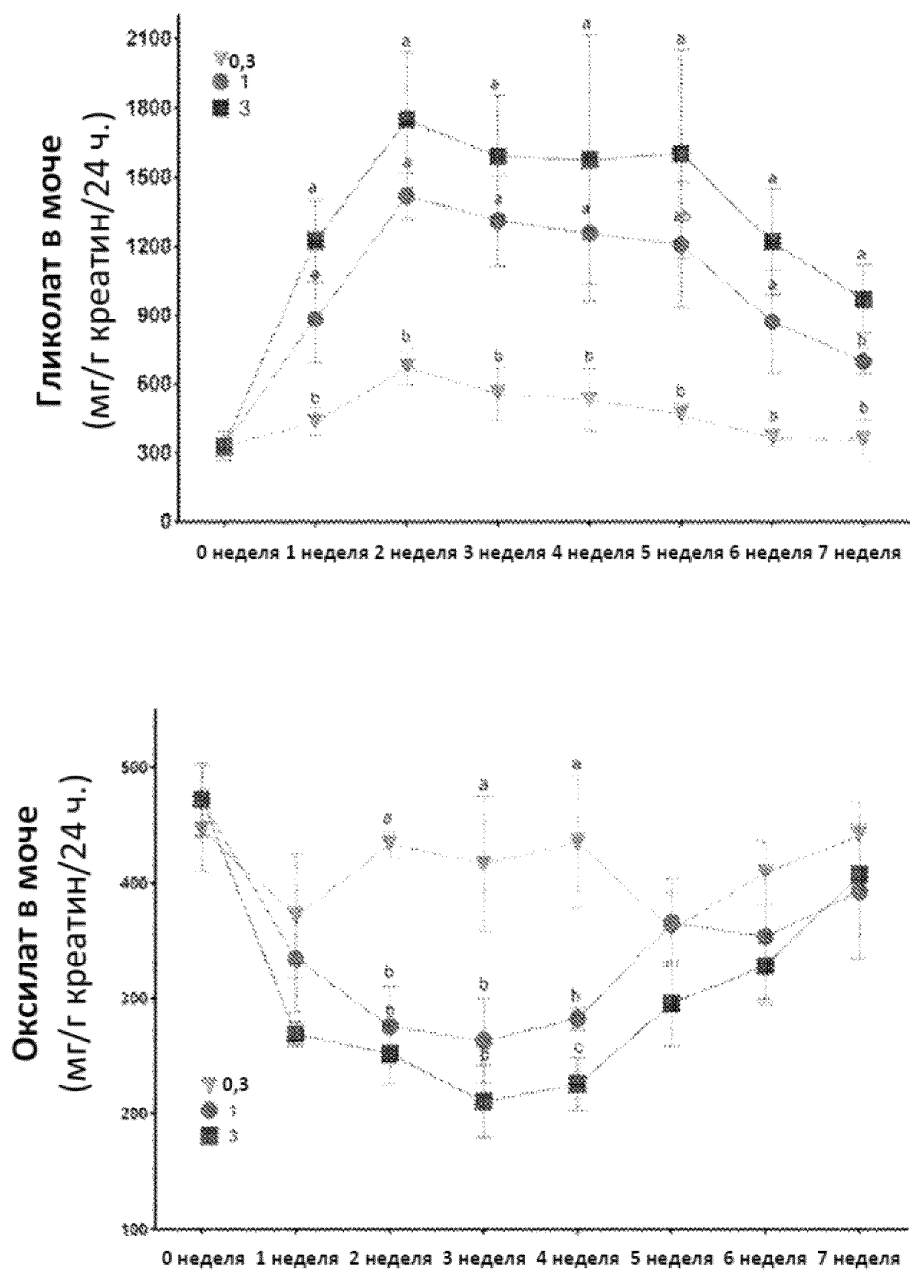
Фиг. 21



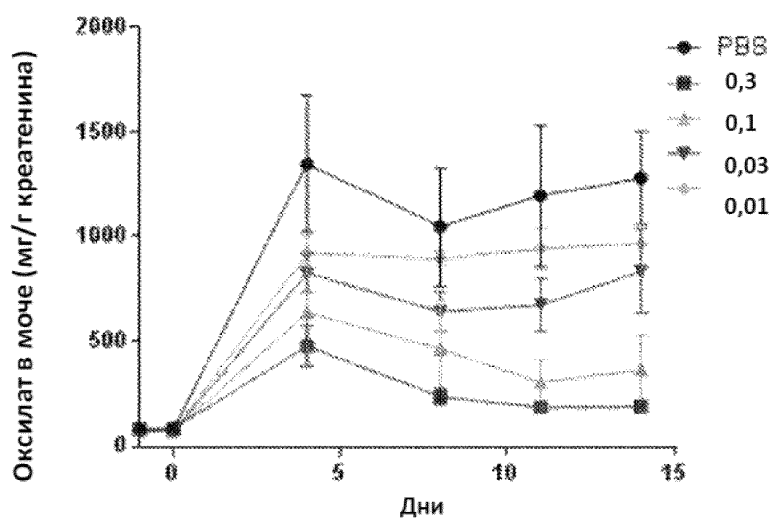
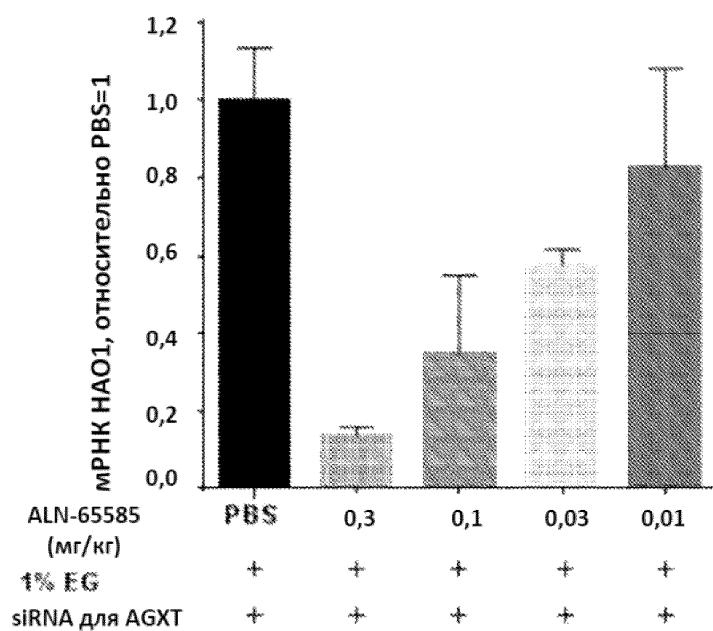
Фиг. 22



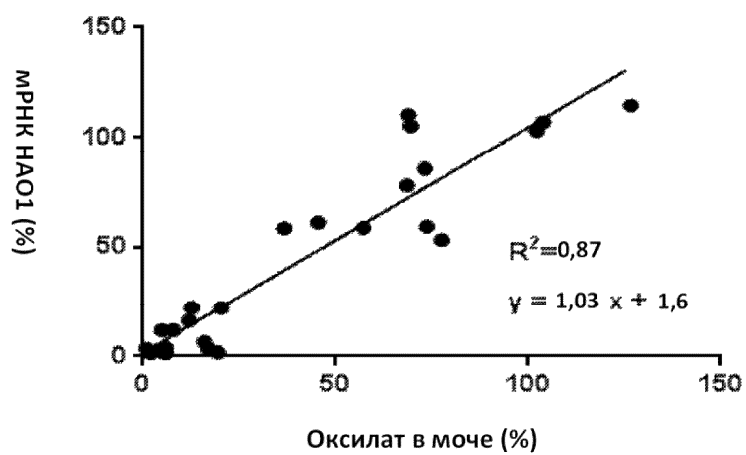
Фиг. 23



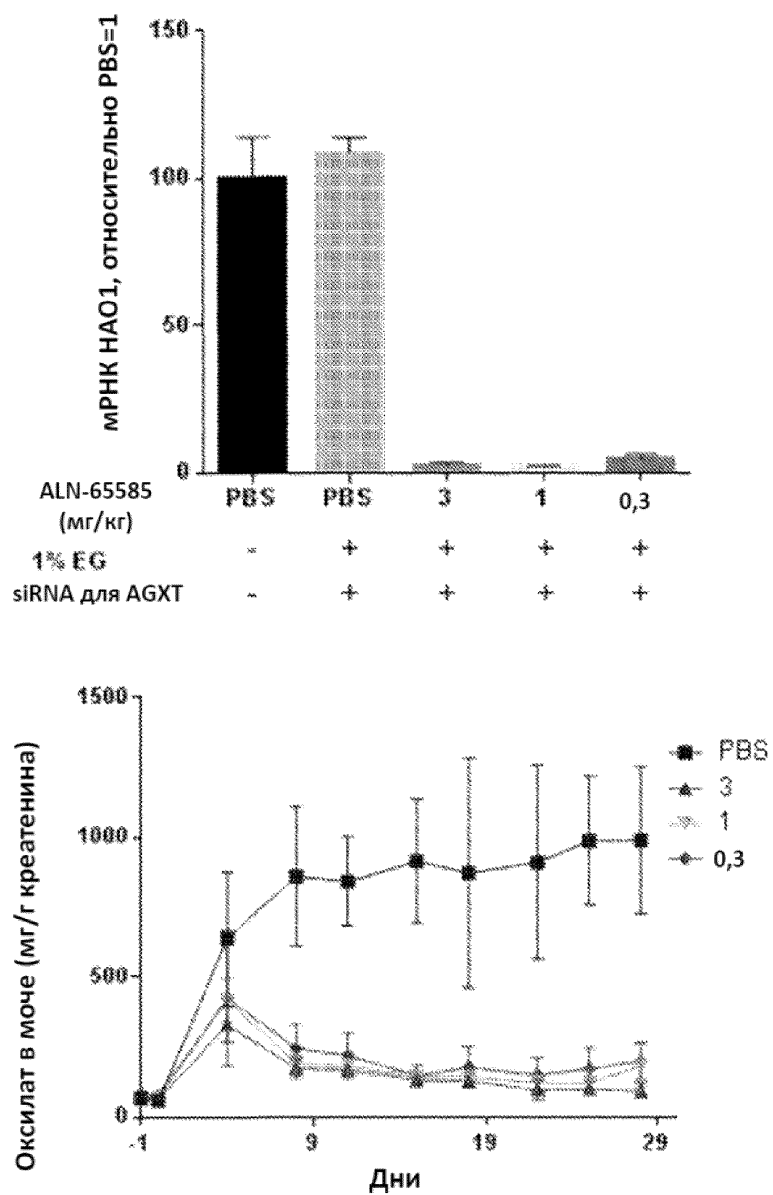
Фиг. 24



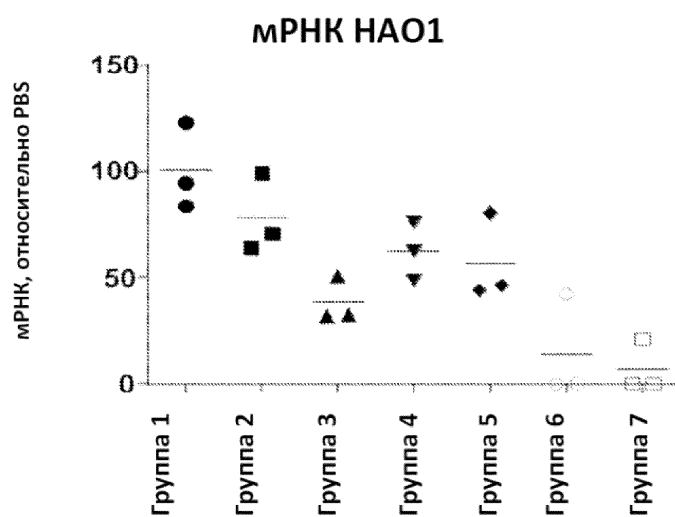
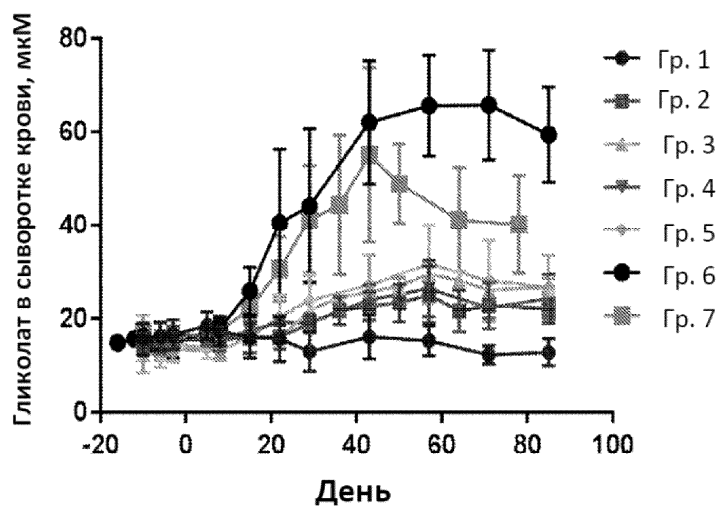
Фиг. 25А



Фиг. 25В



Фиг. 26



Фиг. 27

