(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202092226 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.18

(22) Дата подачи заявки
2019.03.20

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

(54) КОМПОЗИЦИИ иРНК 17β-ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ТИПА 13 (HSD17B13) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/645,941; 62/770,298; 62/775,590**
(32) **2018.03.21; 2018.11.21; 2018.12.05**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/023079**
(87) **WO 2019/183164 2019.09.26**

(71) Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Хинкл Грегори, Тремблэй Фредерик, Абул-Хусн Наура С., Готтсман Омри, Ли Александер, Чэн Сипин, Синь Юйжун, Громада Джеспер, Дьюэи Фредерик Е., Барас Арис, Шульдинер Алан, Милстейн Стюарт (US)

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

(57) Изобретение относится к композициям двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК), нацеленным на ген HSD17B13, а также к способам ингибирования экспрессии HSD17B13 и способам лечения субъектов, которым окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, таких как субъекты, имеющие HSD17B13-ассоциированное заболевание, расстройство или патологическое состояние, с использованием таких композиций дцРНК.

202092226 A1

202092226 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564437EA/042

КОМПОЗИЦИИ ИРНК 17В-ГИДРОКСИСТЕРОИДДЕГИДРОГЕНАЗЫ ТИПА 13 (HSD17B13) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/645941, поданной 21 марта 2018 г., предварительной заявки на патент США № 62/770298, поданной 21 ноября 2018 г., и предварительной заявки на патент США № 62/775590, поданной 5 декабря 2018 г. Полное содержание каждой из вышеуказанных предварительных патентных заявок включено здесь посредством ссылки.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включен здесь посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 12 марта 2019 г., имеет название 121301-08420_SL.txt и имеет размер 1374047 байт.

Уровень техники

17β-гидроксистероиддегидрогеназа типа 13 (HSD17B13) является членом семейства ферментов 17β-гидроксистероиддегидрогеназ (HSD17B), члены которого выполняют различные функции, включая, например, восстановление или окисление половых гормонов, жирных кислот и желчных кислот in vivo (Moeller and Adamski (2009) Mol. Cell Endocrinol., 301:7). Члены семейства HSD17B различаются по распределению в тканях, субклеточной локализации, каталитическому предпочтению и обладают различной субстратной специфичностью, поскольку они также катализируют превращение других субстратов, помимо стероидов, например липидов и ретиноидов (Marchais-Oberwinkler et al. (2011) J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., 125(1-2):66-82). Было показано, что HSD17B13 усиливает печеночный липогенез в печени нормальных мышей и культивированных гепатоцитах человека (Su et al. (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111:11437).

Гепатоциты, которые образуют паренхиматозную ткань печени, ответственны за мобилизацию липидов для получения энергии и хранения избыточных липидов в форме липидных капель (LD), что делает печень основным органом, ответственным за гомеостаз липидов.

В настоящее время LD признаны в качестве биологически активных органелл, участвующих в метаболизме липидов, мембранном движении и передаче сигналов. LD обычно состоят из ядра нейтральных липидов (таких как триацилглицерины (TG) и сложных эфиров холестерина, окруженных монослоем из фосфолипидов/холестерина). Многочисленные LD-специфические белки ассоциированы с мембраной LD и функционируют, например, для контроля потока молекул в и из LD. Преобладающие гепатоцеллюлярные LD-ассоциированные белки являются членами семейства белков перилипинов, но белки, отличные от перилипинов, такие как индуцируемый гипоксией протеин 2 (HIG2), пататинподобный фосфолипазный домен-содержащий белок 3 (PNPLA3)

и HSD17B13, также были идентифицированы в качестве LD-ассоциированных белков (Carr and Ahima (2016) Exp. Cell Res., 15:187; Su et al. (2014) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111:11437).

Повышенное накопление LD ассоциировано со многими метаболическими заболеваниями и хроническими фиброзно- воспалительными заболеваниями печени, такими как фиброз печени, NASH и NAFLD. HSD17B13 была идентифицирована в качестве одного из наиболее широко экспрессируемых белков LD, специфически локализованных на поверхности LD у людей и мышей с NAFLD. Также было показано, что уровень экспрессии HSD17B13 повышается в печени пациентов и мышей с NAFLD. Сверхэкспрессия HSD17B13 приводила к увеличению количества и размера LD. Сверхэкспрессия HSD17B13 в печени у мышей C57BL/6 достоверно увеличивала липогенез и содержание TG в печени, приводя к фенотипу жировой дистрофии печени.

В настоящее время отсутствует лечение хронических фиброзно- воспалительных заболеваний печени. Текущий протокол ведения субъектов, страдающих хроническим фиброзно-воспалительным заболеванием печени, включает изменение образа жизни и лечение сопутствующих заболеваний, например, гипертонии, гиперлипидемии, диабета, ожирения и т.д. Следовательно, поскольку распространенность хронических фиброзно-воспалительных заболеваний печени прогрессивно возрастала за последние 10 лет и, как ожидается, будет увеличиваться, то в данной области существует потребность в альтернативных способах лечения субъектов, страдающих хроническим фиброзно-воспалительным заболеванием печени.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям иРНК, которые воздействуют на РНК-индуцируемый комплекс сайленсинг (RISC)-опосредованное расщепление РНК-транскриптов гена 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13). Ген HSD17B13 может находиться внутри клетки, например, клетки в организме субъекта, такого как человек. Настоящее изобретение также относится к способам применения композиций иРНК по изобретению для ингибирования экспрессии гена HSD17B13 и/или для лечения субъекта, которому окажет положительное действие ингибирование или снижение экспрессии гена HSD17B13, например, субъекта, страдающего или предрасположенного к развитию заболевания, ассоциированного с HSD17B13, например хронического фиброзно-воспалительного заболевания печени.

Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержи тпо меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9. В некоторых вариантах осуществления средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь

и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где указанная антисмысловая цепь содержит область комплементарности с мРНК, кодирующей HSD17B13, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13. В некоторых вариантах осуществления средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где указанная антисмысловая цепь содержит область, комплементарную мРНК, кодирующей HSD17B13, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13.

В одном варианте осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от любого из нуклеотидов 213-242; 256-287; 361-385; 447-480; 483-529; 489-529; 630-653; 688-711; 752-777; 753-779; 772-806; 781-806; 791-851; 829-858; 870-896; 893-930; 900-930; 910-932; 980-1092; 1101-1158; 1176-1210; 1320-1350; 1335-1373; 1456-1482; 1506-1535; 1558-1588; 1699-1740; 1725-1757; 2182-2210; 2190-2254; 2194-2216; 2240-2373; или 2242-2264 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из любого из нуклеотидов 213-242; 256-287; 361-385; 447-480; 483-529; 489-529; 630-653; 688-711; 752-777; 753-779; 772-806; 781-806; 791-851; 829-858; 870-896; 893-930; 900-930; 910-932; 980-1092; 1101-1158; 1176-1210; 1320-1350; 1335-1373; 1456-1482; 1506-1535; 1558-1588; 1699-1740; 1725-1757; 2182-2210; 2190-2254; 2194-2216; 2240-2373; или 2242-2264 из SEQ ID NO: 1.

В еще одном варианте осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от любого из нуклеотидов 71-93, 101-123, 108-130, 109-131, 112-134, 123-145; 213-235; 220-242, 256-278; 292-314, 293-315, 299-321, 301-323, 324-346, 349-371, 350-372, 351-373, 352-374; 353-375, 355-377, 356-378, 357-379, 361-383; 363-385, 365-387, 402-424, 422-444, 423-445, 427-449, 428-450, 431-453, 447-469, 489-511, 490-512, 507-529, 541- 563, 547-569, 548-570, 585-607, 589-611, 592-614, 593-615, 620-642, 630-652, 631-653, 632-654, 649-671, 676-698, 688-710, 723-745, 728-750, 752-774, 753-775, 755-777, 757-779, 763-785, 764-786, 772-794, 778-800, 780-802, 781-803,791-813, 792-814, 794-816, 795-817, 807-829, 828-850, 829-851; 832-854; 836-858; 838-860; 839-861, 840-862, 832-861; 870-892; 874-896, 894-916; 895-917; 896-918; 897-919; 898-920; 899-921; 900-922; 901-923; 902-924; 906-928;

908-930; 894-930; 910-932; 965-987; 966-988981-1003; 1005-1027; 1006-1028; 1010-1032; 1005-1032; 1052-1074; 1097-1119; 1101-1123; 1102-1124; 1103-1125; 1133-1155; 1135-1157; 1136-1158; 1097-1125; 1133-1158; 1176-1198; 1188-1210; 1243-1265; 1315-13371320-1342; 1322-1344; 1325-1347; 1327-1349; 1328-1350; 1320-1507; 1335-1357; 1336-1358; 1458-1480; 1459-1481; 1460-1482; 1458-1482; 1497-1519; 1498-1520; 1506-1528; 1513-1535; 1565-1587; 1566-1588; 1613-1635; 1614-1636; 1622-1644; 1643-1665; 1699-1721; 1717-1739; 1718-1740; 1724-1746; 1725-1747; 1726-1748; 1727-1749; 1728-1750; 1717-1750; 1737-1759; 1768-1790; 2188-2210; 2190-2212; 2188-2212; 2194-2216; 2195-2217; 2250-2272; 2232-2254; 2240-2262; 2232-2262; 2242-2264; 2245-2267 2249-2271; 2232-2271; 2347-2369; 2351-2373; или 2347-2373 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из любого из нуклеотидов 71-93, 101-123, 108-130, 109-131, 112-134, 123-145; 213-235; 220-242, 256-278; 292-314, 293-315, 299-321, 301-323, 324-346, 349-371, 350-372, 351-373, 352-374; 353-375, 355-377, 356-378, 357-379, 361-383; 363-385, 365-387, 402-424, 422-444, 423-445, 427-449, 428-450, 431-453, 447-469, 489-511, 490-512, 507-529, 541- 563, 547-569, 548-570, 585-607, 589-611, 592-614, 593-615, 620-642, 630-652, 631-653, 632-654, 649-671, 676-698, 688-710, 723-745, 728-750, 752-774, 753-775, 755-777, 757-779, 763-785, 764-786, 772-794, 778-800, 780-802, 781- 803,791-813, 792-814, 794-816, 795-817, 807-829, 828-850, 829-851; 832-854; 836-858; 838-860; 839-861, 840-862, 832-861; 870-892; 874-896, 894-916; 895-917; 896-918; 897-919; 898-920; 899-921; 900-922; 901-923; 902-924; 906-928; 908-930; 894-930; 910-932; 965-987; 966-988981-1003; 1005-1027; 1006-1028; 1010-1032; 1005-1032; 1052-1074; 1097-1119; 1101-1123; 1102-1124; 1103-1125; 1133-1155; 1135-1157; 1136-1158; 1097-1125; 1133-1158; 1176-1198; 1188-1210; 1243-1265; 1315-13371320-1342; 1322-1344; 1325-1347; 1327-1349; 1328-1350; 1320-1507; 1335-1357; 1336-1358; 1458-1480; 1459-1481; 1460-1482; 1458-1482; 1497-1519; 1498-1520; 1506-1528; 1513-1535; 1565-1587; 1566-1588; 1613-1635; 1614-1636; 1622-1644; 1643-1665; 1699-1721; 1717-1739; 1718-1740; 1724-1746; 1725-1747; 1726-1748; 1727-1749; 1728-1750; 1717-1750; 1737-1759; 1768-1790; 2188-2210; 2190-2212; 2188-2212; 2194-2216; 2195-2217; 2250-2272; 2232-2254; 2240-2262; 2232-2262; 2242-2264; 2245-2267 2249-2271; 2232-2271; 2347-2369; 2351-2373; или 2347-2373 из SEQ ID NO: 1.

В еще одном варианте осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от любого из нуклеотидов 108-130; 109-131; 108-131; 112-134; 293-315; 301-323; 293-323; 361-383; 402-424; 423-445; 428-450; 423-450; 428-453; 431-453; 489-511; 490-512; 489-512; 649-671; 753-775; 772-794; 791-813; 792-814; 795-817; 791-817; 829-851; 832-854; 836-858; 829-858; 870-892; 874-896; 870-896; 898-920; 900-922; 902-924; 906-928; 908-930; 902-930; 910-932; 966-988; 1328-1350; или 2194-2216; 2242-2264; или 2249-2271 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из любого из нуклеотидов 108-130; 109-131; 108-131; 112-134; 293-315; 301-323; 293-323; 361-383; 402-424; 423-445; 428-450; 423-450; 428-453; 431-453; 489-511; 490-512; 489-512; 649-671; 753-775; 772-794; 791-813; 792-814; 795-

817; 791-817; 829-851; 832-854; 836-858; 829-858; 870-892; 874-896; 870-896; 898-920; 900-922; 902-924; 906-928; 908-930; 902-930; 910-932; 966-988; 1328-1350; или 2194-2216; 2242-2264; или 2249-2271 из SEQ ID NO: 1. В еще одном варианте осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидов 898-930 SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидов 898-930 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидов 910-932 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидов 910-932 из SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидов 2194-2216 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидов 2194-2216 SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидов 2242-2264 из SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидов 2242-2264 из SEQ ID NO: 1.

В одном варианте осуществления средство на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

В одном варианте осуществления по существу все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию. В еще одном варианте осуществления по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию. В еще одном варианте осуществления по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют модифицированные нуклеотиды, и где смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу. В некоторых

вариантах осуществления средство на основе дцРНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию. В еще одном варианте осуществления все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию. В еще одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В одном варианте осуществления по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминнуклеотида(dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, закрытого нуклеотида, раскрытого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, нуклеотида без основания, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинонуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида, и их комбинаций.

В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов представляют 2’-О-метил- и/или 2’-фтор-модификации.

Область комплементарности может составлять по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину, от 19 до 30 нуклеотидов в длину, от 19 до 25 нуклеотидов в длину; или от 21 до 23 нуклеотидов в длину.

Каждая цепь может составлять не более 30 нуклеотидов в длину, например, каждая цепь независимо составляет 19-30 нуклеотидов в длину; каждая цепь независимо составляет 19-25 нуклеотидов в длину; каждая цепь независимо составляет 21-23 нуклеотида в длину.

дцРНК может содержать по меньшей мере одну цепь, которая включает 3’-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида; или по меньшей мере одну цепь, которая содержит 3’-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

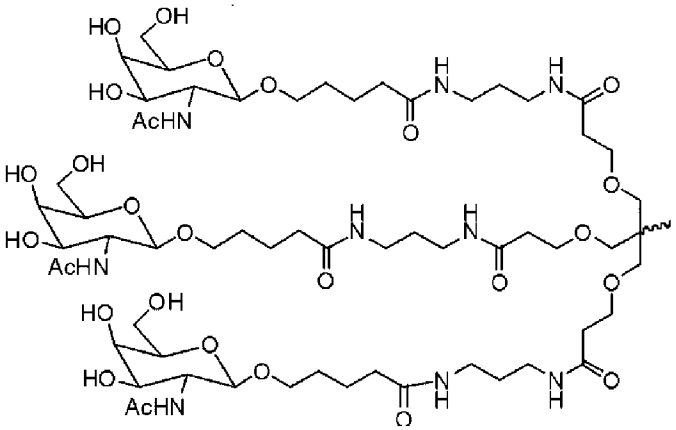
В некоторых вариантах осуществления средство на основе дцРНК дополнительно

содержит лиганд.

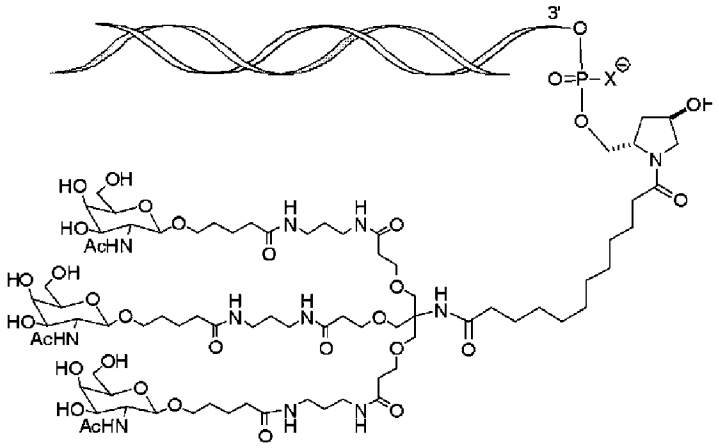
В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи средства на основе дцРНК.

В одном варианте осуществления лиганд представляет производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В одном варианте осуществления лиганд представляет:



В одном варианте осуществления средство на основе дцРНК конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет O или S.

В одном варианте осуществления X представляет O.

В одном варианте осуществления область комплементарности содержит любую из последовательностей антисмысловой цепи, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где указанное средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

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

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

где:

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

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

N_a и N_a' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

N_b и N_b' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

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

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

модификации в N_b отличаются от модификации в Y, и модификации в N_b' отличаются от модификации в Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном варианте i равно 0; j равно 0; i равно 1; j равно 1; оба i и j равны 0; или оба i и j равны 1. В другом варианте k равно 0; l равно 0; k равно 1; l равно 1; оба k и l равны 0; или оба k и l равны 1.

В одном варианте осуществления XXX комплементарен X'X'X', YYY комплементарен Y'Y'Y', и ZZZ комплементарен Z'Z'Z'.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или рядом с ним, например, мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12 и 13 антисмысловой цепи от 5'-конца.

В одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIa):

смысловая: 5' n_p -N_a -Y Y Y -N_a - n_q 3'

антисмысловая: 3' $n_{p'}$-$N_{a'}$- Y'Y'Y'- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5' (IIIa)

В еще одном варианте формула (III) представлена формулой (IIIb):

смысловая: 5' n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a - n_q 3'

антисмыслова 3' $n_{p'}$-$N_{a'}$- Y'Y'Y'-$N_{b'}$-Z'Z'Z'- $N_{a'}$- $n_{q'}$ 5' (IIIb)
я:

где каждый Nb и Nb' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

Еще в одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIc):

смысловая: $5'\ n_p\text{-}N_a\text{-}X\ X\ X\text{-}N_b\text{-}Y\ Y\ Y\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$

антисмысловая: $3'\ n_{p'}\text{-}N_{a'}\text{-}X'X'X'\text{-}N_{b'}\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_{a'}\text{-}n_{q'}\ 5'$ (IIc)

где каждый Nb и Nb' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

В еще одном варианте формула (III) представлена формулой (IIId):

смысловая: $5'\ n_p\text{-}N_a\text{-}X\ X\ X\text{-}N_b\text{-}Y\ Y\ Y\text{-}N_b\text{-}Z\ Z\ Z\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$

антисмысловая: $3'\ n_{p'}\text{-}N_{a'}\text{-}X'X'X'\text{-}N_{b'}\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_{b'}\text{-}Z'Z'Z'\text{-}N_{a'}\text{-}n_{q'}\ 5'$ (IIId)

где Nb и Nb' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, и каждый Na и Na' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Область комплементарности может составлять по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину; от 19 до 30 нуклеотидов в длину, от 19 до 25 нуклеотидов в длину; или от 21 до 23 нуклеотидов в длину.

Каждая цепь может составлять не более 30 нуклеотидов в длину, например, каждая цепь независимо составляет 19-30 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2’-метоксиэтила, 2’-O-алкила, 2’-O-аллила, 2’-C-аллила, 2’-C-аллила, 2’-фтора, 2'-O-метила, 2'-дезокси, 2'-гидроксила и их комбинаций.

В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов представляют 2’-O-метил- или 2’-фтор-модификации.

В одном варианте Y' представляет 2'-O-метил- или 2’-фтор-модифицированный нуклеотид.

В одном варианте осуществления по меньшей мере одна цепь средства на основе дцРНК может содержать 3’-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида; или 3’-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления средство на основе дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В одном варианте фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3’-конце одной цепи. В одном варианте осуществления цепь представляет антисмысловую цепь. В еще одном варианте осуществления цепь является смысловой цепью.

В одном варианте осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5’-конце одной цепи. В одном варианте осуществления цепь представляет антисмысловую цепь. В еще одном варианте

осуществления цепь является смысловой цепью.

В одном варианте осуществления цепь представляет антисмысловую цепь. В еще одном варианте осуществления цепь является смысловой цепью.

В одном варианте осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи.

В одном варианте осуществления пара оснований в положении 1 на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса представляет пару оснований AU.

В одном варианте осуществления p' > 0. В еще одном варианте осуществления p'= 2.

В одном варианте осуществления q'= 0, p=0, q=0, и выступающие нуклеотиды p' комплементарны мРНК-мишени. В еще одном варианте осуществления q'= 0, p=0, q=0, и выступающие нуклеотиды p' не комплементарны мРНК-мишени.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит в целом 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь содержит в целом 23 нуклеотида.

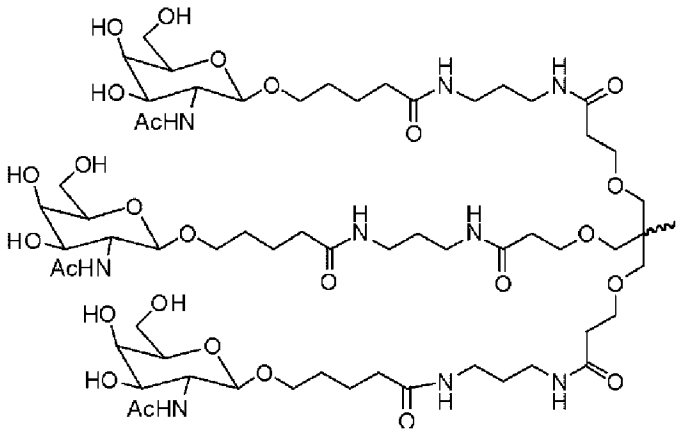
В одном варианте осуществления по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь. В еще одном варианте осуществления все n_p' связаны с соседними нуклеотидами через фосфоротиоатные связи.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

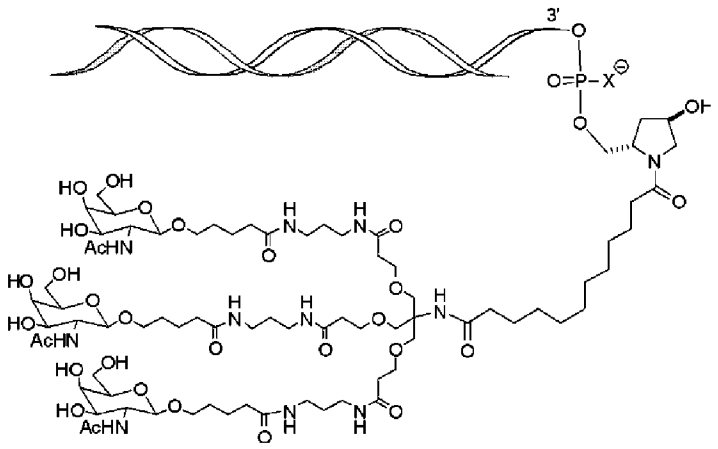
В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи средства на основе дцРНК.

В одном варианте осуществления лиганд представляет одно или более производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления лиганд представляет:



В одном варианте осуществления средство на основе дцРНК конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет O или S.

В одном варианте осуществления X представляет O.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая: $5'\ n_p\text{-}N_a\text{-}(X\ X\ X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\ Y\ Y\text{-}N_b\text{-}(Z\ Z\ Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$

антисмысловая: $3'\ n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III)

где:

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

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

N_a и N_a' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

N_b и N_b' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

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

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации в N_b отличаются от модификации в Y, и модификации в N_b' отличаются от модификации в Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе

двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая: $5'\ n_p\text{-}N_a\text{-}(X\ X\ X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\ Y\ Y\text{-}N_b\text{-}(Z\ Z\ Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$

антсмысловая: $3'\ n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III)

где:

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

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

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

$n_p' > 0$ и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

N_a и N_a' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

N_b и N_b' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации в N_b отличаются от модификации в Y, и модификации в N_b' отличаются от модификации в Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая: $5'\ n_p\text{-}N_a\text{-}(X\ X\ X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\ Y\ Y\text{-}N_b\text{-}(Z\ Z\ Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$

антисмысловая: $3'\ n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III)

где:

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

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

p, q и q'каждый независимо равен 0-6;

$n_p' > 0$ и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

N_a и N_a' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

N_b и N_b' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации в N_b отличаются от модификации в Y, и модификации в N_b' отличаются от модификации в Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая: $5' n_p\text{-}N_a\text{-}(X\,X\,X)_i\text{-}N_b\text{-}Y\,Y\,Y\text{-}N_b\text{-}(Z\,Z\,Z)_j\text{-}N_a\text{-}n_q\ 3'$

антисмысловая: $3' n_p'\text{-}N_a'\text{-}(X'X'X')_k\text{-}N_b'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_b'\text{-}(Z'Z'Z')_l\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (III)

где:

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

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

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

$n_p' > 0$ и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

N_a и N_a' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

N_b и N_b' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации в N_b отличаются от модификации в Y, и модификации в N_b' отличаются от модификации в Y';

где смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая: $5'\ n_p\text{-}N_a\text{-}Y\ Y\ Y\ \text{-}\ N_a\text{-}\ n_q\ 3'$

антисмысловая: $3'\ n_p'\text{-}N_a'\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_a'\text{-}n_q'\ 5'$ (IIIa)

где:

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

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

$n_p' > 0$ и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

N_a и N_a' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

YYY и Y'Y'Y' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-О-метил- и/или 2'-фтор- модификации;

где смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-

гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Средство на основе дцРНК включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи содержат выбранную модификацию из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными через моновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными через моновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

В одном варианте осуществления область комплементарности содержит любую из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13. В одном варианте осуществления средство выбрано из группы, состоящей из AD-288917, AD-288996, AD-413639, AD-413644 и AD-413669. В одном варианте осуществления средство для РНКи является AD-288917. В еще одном варианте осуществления средство представляет AD-288996. В еще одном варианте осуществления средство представляет AD-413639. В одном варианте осуществления средство представляет AD-413644. В еще одном варианте осуществления средство представляет AD-413669.

В одном варианте осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь содержат

нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей любого из средств, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13.

Настоящее изобретение также относится к клеткам, векторам и фармацевтическим композициям, которые включают любое из средств на основе дцРНК по изобретению. Средство на основе дцРНК можно формулировать в незабуференном растворе, например, физиологическом растворе или воде, или в забуференном растворе, например, в растворе, содержащем ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления забуференный раствор представляет забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке. Способ включает приведение в контакт клетки со средством на основе дцРНК или фармацевтической композицией по изобретению, тем самым обеспечивая ингибирование экспрессии HSD17B13 в клетке.

Клетка может находиться в организме субъекта, например человека.

В одном варианте осуществления экспрессия HSD17B13 ингибируется по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или ниже уровня детектирования экспрессии HSD17B13.

В одном варианте осуществления субъект-человек страдает заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13. В одном из вариантов осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, ассоциированное с HSD17B13, представляет хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени. В одном варианте осуществления хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени выбрано из группы, состоящей из воспаления печени, фиброза печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), цирроза печени, алкогольного стеатогепатита (ASH), алкогольных болезней печени (ALD), цирроза, ассоциированного с HCV, лекарственно-индуцированного поражения печени и гепатоцеллюлярного некроза.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ ингибирования экспрессии HSD17B13 у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по изобретению, тем самым обеспечивая ингибирование экспрессии HSD17B13 у субъекта.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по изобретению, тем самым обеспечивая лечение субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики по

меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое оказывает положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13. Способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, тем самым обеспечивая профилактику по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое оказывает положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ снижения риска развития хронического заболевания печени у субъекта, страдающего стеатозом. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по изобретению, тем самым обеспечивая снижение риска развития хронического заболевания печени у субъекта, страдающего стеатозом.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ подавления прогрессирования стеатоза в стеатогепатит у субъекта, страдающего стеатозом. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по изобретению, тем самым обеспечивая ингибирование прогрессирования стеатоза в стеатогепатит у субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ ингибирования накопления липидных капель в печени субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по изобретению и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая ингибирование накопления жира в печени субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по настоящему изобретению и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая лечение субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое оказывает положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13. Способ включает введение субъекту терапевтически

эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по изобретению и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая профилактику по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое оказывает положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ снижения риска развития хронического заболевания печени у субъекта, страдающего стеатозом. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по изобретению и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая снижение риска развития хронического заболевания печени у субъекта, страдающего стеатозом.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ подавления прогрессирования стеатоза в стеатогепатит у субъекта, страдающего стеатозом. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции по изобретению и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая ингибирование прогрессирования стеатоза в стеатогепатит у субъекта.

В одном варианте осуществления введение средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции субъекту вызывает снижение ферментативной активности HSD17B13, снижение накопления белка HSD17B13, снижение ферментативной активности PNPLA3, снижение накопления белка PNPLA3 и/или снижение накопления жира и/или увеличения липидных капель в печени субъекта.

В одном варианте осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, ассоциированное с HSD17B13, представляет хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени.

В одном варианте осуществления хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени выбрано из группы, состоящей из воспаления печени, фиброза печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), цирроза печени, алкогольного стеатогепатита (ASH), алкогольных болезней печени (ALD), цирроза, ассоциированного с HCV, лекарственно-индуцированного поражения печени и гепатоцеллюлярного некроза.

В одном варианте осуществления хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени представляет неалкогольный стеатогепатит (NASH).

В одном варианте осуществления субъект страдает ожирением.

В одном варианте осуществления способы и применения по изобретению дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

В одном варианте осуществления средство на основе дцРНК вводят субъекту в дозе

примерно от 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг или примерно от 0,5 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

Средство можно вводить субъекту внутривенно, внутримышечно или подкожно. В одном варианте осуществления средство вводится субъекту подкожно.

В одном варианте осуществления способы и применения по изобретению дополнительно включают определение уровня HSD17B13 у субъекта.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к средству на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность любого из средств, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность любого из средств, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и где средство на основе дцРНК конъюгировано с лигандом.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показано, что HSD17B13 rs72613567:TA ассоциирован со сниженным риском развития фенотипов алкогольной и неалкогольной болезни печени. В частности, на фиг. 1 показано, что HSD17B13 rs72613567:TA ассоциирован с более низким отношением шансов развития различных хронических заболеваний печени, зависимым от частоты аллеля. В частности, эффекты, зависимые от частоты аллеля, наблюдали как для алкогольных, так и для неалкогольных болезней печени, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. Отношения шансов рассчитывали с использованием логистической регрессии с поправкой на возраст, пол, ИМТ и этническую принадлежность, заявленную самими пациентами.

На фиг. 2A представлен график, показывающий эффект однократной дозы AD-288917 у мышей, экспрессирующих HSD17B13 человека.

На фиг. 2B представлен график, показывающий эффект однократной дозы AD-288917 у обезьян Cynomolgus.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям иРНК, которые воздействуют на РНК-индуцируемый комплекс сайленсинг (RISC)-опосредованное расщепление РНК-транскриптов гена 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13). Ген HSD17B13 может находиться внутри клетки, например, клетки в организме субъекта, такого как человек. Настоящее изобретение также относится к способам применения композиций иРНК по изобретению для ингибирования экспрессии гена HSD17B13 и/или для лечения субъекта, который получит положительный эффект в результате ингибирования или снижения экспрессии гена HSD17B13, например, субъекта, который получит положительный эффект в результате подавления воспаления печени, например,

субъекта, страдающего или предрасположенного к развитию заболевания, расстройства или патологического состояния, ассоциированного с HSD17B13, такого как фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD), цирроз печени, алкогольный стеатогепатит (ASH), алкогольные болезни печени (ALD), цирроз, ассоциированный с HCV, лекарственно-индуцированное поражение печени и гепатоцеллюлярный некроз.

иРНК по изобретению, нацеленные на HSD17B13, могут содержать цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область, составляющую примерно 30 нуклеотидов или менее в длину, например 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15- 26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19- 26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида в длину, где эта область по существу комплементарна по меньшей мере участку мРНК-транскрипта гена HSD17B13.

В некоторых вариантах осуществления одна или обе цепи средств на основе двухцепочечной иРНК по настоящему изобретению, составляют до 66 нуклеотидов в длину, например 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида в длину, с областью по меньшей мере из 19 смежных нуклеотидов, которая по существу комплементарна по меньшей мере участку мРНК-транскрипта гена HSD17B13. В некоторых вариантах осуществления такие средства на основе иРНК, имеющие более длинные антисмысловые цепи, могут содержать вторую цепь РНК (смысловую цепь) из 20-60 нуклеотидов в длину, где смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 18-30 смежных нуклеотидов.

Применение средств на основе иРНК, описанных здесь, делает возможной целенаправленную деградацию мРНК гена HSD17B13 у млекопитающих.

В частности, очень низкие дозы иРНК могут специфически и эффективно опосредовать РНК-интерференцию (РНКи), приводя к достоверному ингибированию экспрессии гена HSD17B13. Таким образом, способы и композиции, включающие эти иРНК, пригодны для лечения субъекта, который получит положительный эффект в результате ингибирования или снижения экспрессии гена HSD17B13, например, субъекта, который получит положительный эффект в результате подавления воспаления печени, например, субъекта, страдающего или предрасположенного к развитию заболевания, расстройства или патологического состояния, ассоциированного с HSD17B13, например, субъекта, страдающего или предрасположенного к развитию фиброза печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), цирроза печени, алкогольного стеатогепатита (ASH), алкогольных болезней печени (ALD), цирроза, ассоциированного с HCV, лекарственно-индуцированного поражения печени и гепатоцеллюлярного некроза.

В нижеследующем подробном описании раскрывается, как получить и использовать композиции, содержащие иРНК, для ингибирования экспрессии гена HSD17B13, а также описаны композиции и способы лечения субъектов, страдающих заболеваниями и

расстройствами, на которые окажет положительное действие ингибирование и/или снижение экспрессии этого гена.

I. Определения

Для того, чтобы настоящее изобретение могло быть более понятным, сначала приводится определение некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что, когда перечисляют значение или диапазон значений параметра, следует понимать, что подразумевается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также являются частью настоящего изобретения.

Формы единственного числа используют в настоящем описании для обозначения одного или более одного (т.е. по меньшей мере одного) грамматического объекта такой формы. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента, например, совокупность элементов.

Термин «включая» используют в настоящем описании для обозначения и используют взаимозаменяемо с выражением «включая, не ограничиваясь этим».

Термин «или» используют в настоящем описании для обозначения и используют взаимозаменяемо с термином «и/или», если из контекста явно не следует иное.

Термин «примерно» используется здесь для обозначения в допустимых пределах ошибки для конкретной величины в данной области техники. Например, «примерно» можно понимать как примерно 2 стандартных отклонения от среднего значения. В некоторых вариантах осуществления примерно означает ±10%. В некоторых вариантах осуществления примерно означает ±5%. Когда «примерно» находится перед рядом чисел или диапазонов, то понятно, что «примерно» может изменять каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Термин «HSD17B13», также известный как «17-бета-гидроксистероиддегидрогеназа 13», «член семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз 16C», «короткоцепочечная дегидрогеназа/редуктаза 9», «17-бета-HSD 13», «17β-HSD13», «SDR16C3», «SCDR9», «семейство короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз 16C, член 3», «гидроксистероиддегидрогеназа (17-бета) 13», «17-бета-гидроксистероиддегидрогеназа 13», «17-бета-гидроксистероиддегидрогеназа», «HMFN0376» и «NIIL497», относится к хорошо известному гену, кодирующему белок 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 из любого источника, к которому относятся позвоночные или млекопитающие, включая, не ограничиваясь ими, человека, крупный рогатый скот, курицу, грызуна, мышь, крысу, свинью, овцу, примата, обезьяну и морскую свинку, если не указано иное.

Термин также относится к фрагментам и вариантам нативной HSD17B13, которые сохраняют по меньшей мере одну активность in vivo или in vitro нативной HSD17B13. Термин охватывает полноразмерные непроцессированные формы предшественника HSD17B13, а также зрелые формы, образовавшиеся в результате посттрансляционного расщепления сигнального пептида, и формы, полученные в результате протеолитического процессинга.

Ранее были идентифицированы два варианта гена HSD17B13 человека: вариант A (или транскрипт A) и вариант B (или транскрипт B). Транскрипт A включает все семь экзонов гена HSD17B13, тогда как экзон 2 пропускается в транскрипте B. Нуклеотидную и аминокислотную последовательность варианта A человеческого HSD17B13 можно найти, например, в последовательности под номером для доступа GenBank: NM_178135.4; SEQ ID NO: 1); и нуклеотидную и аминокислотную последовательность варианта B человеческого HSD17B13 можно найти, например, в последовательности под номером для доступа GenBank: NM_001136230.2; SEQ ID NO: 2. Как описано в заявке на патент США № 15/875514, поданной 19 января 2018 г., и заявке PCT: PCT/US2018/014357, поданной 19 января 2018 г. (полное содержание каждой из которых включено здесь посредством ссылки), были идентифицированы шесть дополнительных экспрессируемых транскриптов HSD17B13 (C-H, SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и 22 соответственно). В транскрипте C экзон 6 пропускается по сравнению с транскриптом A. В транскрипте D имеется вставка гуанина 3' экзона 6, что приводит к сдвигу рамки считывания и преждевременному усечению белка в экзоне 7 по сравнению с транскриптом A. В транскрипте E имеет место дополнительный экзон между экзонами 3 и 4 по сравнению с транскриптом A. В транскрипте F, который экспрессируется только в носителях варианта rs72613567 HSD17B13, имеет место считывание от экзона 6 в интрон 6 по сравнению с транскриптом A. В транскрипте G экзон 2 пропускается, и имеется вставка гуанина 3' экзона 6, что приводит к сдвигу рамки считывания и преждевременному усечению белка в экзоне 7 по сравнению с транскриптом A. В транскрипте H имеет место дополнительный экзон между экзонами 3 и 4, и имеется вставка гуанина 3' экзона 6, что приводит к сдвигу рамки считывания и преждевременному усечению белка в экзоне 7 по сравнению с транскриптом A.

Также был идентифицирован один дополнительный транскрипт HSD17B13, который экспрессируется на низких уровнях (F', SEQ ID NO: 23). Как и транскрипт F, транскрипт F' также включает считывание от экзона 6 в интрон 6 по сравнению с транскриптом A, но, в отличие от транскрипта F, считывание не включает вставленный тимин, присутствующий в гене варианта HSD17B13 rs72613567. Нуклеотидные положения экзонов в генах HSD17B13 для каждого транскрипта представлены ниже.

SEQ ID NO: 15 представляет собой нуклеотидную последовательность геномной последовательности HSD17B13 дикого типа (сборка генома человека GRCh38), и SEQ ID NO: 16 представляет нуклеотидную последовательность варианта геномной последовательности HSD17B13 (сборка генома человека GRCh38; rs72613567-вставка T в chr4:87310241-87310240): вставка T в положение 12666.

Нуклеотидные положения в SEQ ID NO: 15 для экзонов транскриптов HSD17B13, более распространенных у субъектов, гомозиготных по гену HSD17B13 дикого типа

	Транскрипт A	**Транскрипт B**	**Транскрипт E**	**Транскрипт F'**
Экзон 1	1-275	1-275	1-275	1-275

Экзон 2	4471-4578	пропущен	4471-4578	4471-4578
Экзон 3	5684-5815	5684-5815	5684-5815	5684-5815
Экзон 3'	отсутствует	отсутствует	6210-6281	отсутствует
Экзон 4	7308-7414	7308-7414	7308-7414	7308-7414
Экзон 5	8947-9084	8947-9084	8947-9084	8947-9084
Экзон 6	12548-12664	12548-12664	12548-12664	12548-13501*
Экзон 7	17599-19118	17599-19118	17599-19118	пропущен

*Включает считывание с экзона 6 в интрон 6; считывание=положения 12665-13501

Нуклеотидные положения в SEQ ID NO: 16 для экзонов транскриптов HSD17B13, более распространенных у субъектов, гомозиготных по варианту гена rs72613567 HSD17B13 (вставка T в положение 12666)

	Транскрипт C	**Транскрипт D**	**Транскрипт F**	**Транскрипт G**	**Транскрипт H**
Экзон 1	1-275	1-275	1-275	1-275	1-275
Экзон 2	4471-4578	4471-4578	4471-4578	пропущен	4471-4578
Экзон 3	5684-5815	5684-5815	5684-5815	5684-5815	5684-5815
Экзон 3'	отсутствует	отсутствует	отсутствует	отсутствует	6210-6281
Экзон 4	7308-7414	7308-7414	7308-7414	7308-7414	7308-7414
Экзон 5	8947-9084	8947-9084	8947-9084	8947-9084	8947-9084
Экзон 6	пропущен	12548-12665^	12548-13502*	12548-12665^	12548-12665^
Экзон 7	17600-19119	17600-19119	пропущен	17600-19119	17600-19119

^Включает дополнительный остаток 12665 на 3'-конце по сравнению с транскриптом A

* Включает считывание с экзона 6 в интрон 6; считывание=положения 12665-13502

Существует два варианта гена HSD17B13 мыши; нуклеотидная и аминокислотная последовательность мышиной Hsd17b13, вариант транскрипта 1, может быть найдена, например, в последовательности под номером для доступа GenBank: NM_001163486.1; SEQ ID NO: 3); и нуклеотидную и аминокислотную последовательность мышиного Hsd17b13, вариант транскрипта 2, можно найти, например, в последовательности под номером для доступа GenBank: NM_198030.2; SEQ ID NO: 4). Нуклеотидная и аминокислотная последовательность гена крысиной Hsd17b13 может быть найдена, например, в последовательности под номером для доступа GenBank: NM_001009684.1; SEQ ID NO: 5). Нуклеотидная и аминокислотная последовательность гена Macaca mulatta HSD17B13 может быть найдена, например, в последовательности под номером для доступа GenBank: XM_015138766.1; SEQ ID NO: 6). Нуклеотидную и аминокислотную последовательность гена HSD17B13 Macaca fascicularis можно найти, например, в последовательности под

номером для доступа GenBank: XM_005555367.2; SEQ ID NO: 7).

Дополнительные примеры последовательностей мРНК HSD17B13 легко доступны с использованием общедоступных баз данных, например, GenBank, UniProt и OMIM.

Как здесь используется, термин «HSD17B13» также относится к конкретному полипептиду, экспрессированному в клетке, посредством встречающихся в природе вариаций последовательности ДНК гена HSD17B13, таких как однонуклеотидный полиморфизм в гене HSD17B13. Были идентифицированы многочисленные SNP в гене HSD17B13, которые можно найти, например, в NCBI dbSNP (см., например, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp).

Как здесь используется, термин «последовательность-мишень» относится к смежному участку нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образуемой во время транскрипции гена HSD17B13, включая мРНК, которая представляет собой продукт процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления участок-мишень последовательности является по меньшей мере достаточно длинным для того, чтобы служить в качестве субстрата для иРНК-направленного расщепления в этом участке нуклеотидной последовательности или рядом с ним молекулы мРНК, образуемой во время транскрипции гена HSD17B13.

Последовательность-мишень гена HSD17B13 может составлять примерно 9-36 нуклеотидов в длину, например, примерно 15-30 нуклеотидов в длину. Например, последовательность-мишень может составлять примерно 15-30 нуклеотидов, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18 -22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21 , 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21 -29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов в длину. Также подразумевается, что диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным диапазонам и длинам, являются частью настоящего изобретения.

Как используется в настоящем описании, термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которую описывают последовательностью, указанную с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждый из «G», «C», «A», «T» и «U» обычно означает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания соответственно. Однако следует понимать, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или замещающему фрагменту (см., например, таблицу 1). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими группами без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такую замещающую группу. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве своего основания, может образовывать пару с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды,

содержащие урацил, гуанин или аденин, можно заменить в нуклеотидных последовательностях дцРНК по изобретению, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида может быть замещен гуанином и урацилом, соответственно, с образованием воббл-пары оснований G-U с мРНК-мишенью. Последовательности, содержащие такие группы заместителей, пригодны для композиций и способов по изобретению.

Как здесь используется, термины «иРНК», «средство для РНКи», «средство на основе иРНК», «средство для РНК-интерференции», взаимозаменяемо относятся к средству, которое содержит РНК, как этот термин определен в данном документе, и которое опосредует направленное расщепление РНК транскрипт через путь РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). иРНК направляет последовательность-специфическую деградацию мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (РНКи). иРНК модулирует, например, ингибирует экспрессию гена HSD17B13 в клетке, например, клетке в организме субъекта, такого как субъект, относящийся к млекопитающим.

В одном варианте осуществления средство на основе иРНК по изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени HSD17B13, для направления расщепления РНК-мишени. Не желая связываться теорией, полагается, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, расщепляется на миРНК эндонуклеазой типа III, известной как Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev., 15: 485). Dicer, рибонуклеаза III-подобный фермент, процессирует дцРНК в короткие интерферирующие РНК из 19-23 пар оснований с характерными 3'-выступами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) Nature, 409: 363). Затем миРНК встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), где одна или более геликаз раскручивают дуплекс миРНК, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, et al., (2001) Cell, 107:309). После связывания с соответствующей мРНК-мишенью одна или более эндонуклеаз внутри RISC расщепляют мишень, индуцируя сайленсинг (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev., 15:188). Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к одноцепочечной РНК (sssiRNA), генерируемой в клетке, и которая способствует образованию комплекса RISC для обеспечения сайленсинга гена-мишени, т. е. гена HSD17B13. Соответственно, термин «миРНК» также используется в данном документе для обозначения РНКи, как описано выше.

В еще одном варианте осуществления средство для РНКи может представлять одноцепочечное средство для РНКи, которое вводят в клетку или организм для ингибирования мРНК-мишени. Одноцепочечные средства для РНКи (ssRNAi) связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет мРНК-мишень. Одноцепочечные миРНК обычно состоят из 15-30 нуклеотидов и химически модифицированы. Конструирование и тестирование одноцепочечных средств для РНКи описаны в патенте США № 8101348 и в публикации Lima et al., (2012) Cell, 150:883-894, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки. Любая из

антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных в данном документе, может использоваться в качестве одноцепочечной миРНК, как описано в данном документе, или как химически модифицированная способами, описанными в публикации Lima et al., (2012) Cell, 150:883-894.

В еще одном варианте осуществления «иРНК» для применения в композициях и способах по изобретению представляет собой двухцепочечную РНК и упоминается здесь как «двухцепочечное средство для РНКи», «молекула двухцепочечной РНК (дцРНК)», «средство на основе дцРНК» или «дцРНК». Термин «дцРНК» относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющему дуплексную структуру, включающую две антипараллельные и, по существу, комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, упоминаемые как имеющие «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию по отношению к РНК-мишени, т.е. гену HSD17B13. В некоторых вариантах осуществления изобретения двухцепочечная РНК (дцРНК) «запускает» деградацию РНК-мишени, например, мРНК, посредством посттранскрипционного механизма сайленсинга гена, называемого здесь РНК-интерференцией или РНКи.

В общем, большинство нуклеотидов каждой цепи молекулы дцРНК представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно здесь описано, каждая или обе цепи могут также включать один или более нерибонуклеотидов, например дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как здесь используется, «средство для РНКи» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство для РНКи может включать существенные модификации нескольких нуклеотидов. Как здесь используется, термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированную сахарную группу, модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное азотистое основание. Таким образом, термин «модифицированный нуклеотид» включает замены, добавления или делеции, например, функциональной группы или атома, межнуклеозидных связей, сахарных групп или азотистых оснований. Модификации, подходящие для применения в средствах по изобретению, включают все типы модификаций, раскрытые здесь или известные в данной области. Любые такие модификации, используемые в молекуле типа миРНК, охватываются «средством для РНКи» для целей данного описания и формулы изобретения.

Дуплексная область может быть любой длины, которая обеспечивает возможность специфической деградации желаемой РНК-мишени по пути RISC, и может находиться в диапазоне примерно от 9 до 36 пар оснований в длину, например, примерно 15-30 пар оснований в длину, например, примерно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований в длину, например, примерно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18- 23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21- 30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований в длину. Подразумевается, что диапазоны и длины,

промежуточные по отношению к перечисленным диапазонам и длинам, также являются частью настоящего изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут представлять собой различные участки одной более крупной молекулы РНК, или они могут представлять собой отдельные молекулы РНК. Когда две цепи представляют собой одну более крупную молекулу и, таким образом, являются связанными непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, соединительную цепь РНК обозначают как «шпилечная петля». Петля шпилька может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления шпилечная петля может содержать, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренных нуклеотидов.

Когда две по существу комплементарные цепи дцРНК находятся в отдельных молекулах РНК, то эти молекулы необязательно, но могут быть ковалентно связанными. Когда две цепи ковалентно связаны посредством другой непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, то соединительную структуру обозначают как «линкер». Цепи РНК могут содержать одинаковое или различное число нуклеотидов. Максимальное число пар оснований представляет число нуклеотидов в наиболее короткой цепи дцРНК минус любые выступы, которые находятся в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре РНКи может содержать один или более нуклеотидных выступов.

В одном варианте осуществления средство для РНКи по изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой содержит менее 30 нуклеотидов, например 17-27, 19-27, 17-25, 19-25 или 19-23, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например последовательностью мРНК-мишени HSD17B13, для направления расщепление РНК-мишени. В еще одном варианте осуществления средство для РНКи по изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, с последовательностью мРНК-мишени HSD17B13, для направления расщепление РНК-мишени. В одном варианте осуществления смысловая цепь составляет 21 нуклеотид в длину. В еще одном варианте осуществления антисмысловая цепь составляет 23 нуклеотида в длину.

Как здесь используется, термин «нуклеотидный выступ» относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выступает из дуплексной структуры иРНК, например, дцРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи дцРНК простирается за пределы 5'-конца другой цепи или наоборот, то имеет место нуклеотидный выступ. дцРНК может содержать выступ по меньшей мере из одного нуклеотида, альтернативно выступ может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из нуклеотидного/нуклеозидного аналога, включая

дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) могут находиться в смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа могут находиться на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах любой антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В одном варианте осуществления смысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В еще одном варианте осуществления один или более нуклеотидов в выступе заменены на нуклеозидтиофосфат.

В некоторых вариантах осуществления выступ на смысловой цепи или антисмысловой цепи, или на обеих, может иметь большие длины, превышающие 10 нуклеотидов, например 10-30 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ находится на смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ присутствует на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления расширенный выступ присутствует на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ находится на антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ присутствует на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления расширенный выступ присутствует на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов в удлиненном выступе заменены на нуклеозидтиофосфат.

Как здесь используется, термины «тупой» или «тупой конец» по отношению к дцРНК, означает, что отсутствуют неспаренные нуклеотиды или нуклеотидные аналоги на данном конце дцРНК, т.е. он не является нуклеотидным выступом. Один или оба конца дцРНК могут быть тупыми. Когда оба конца дцРНК являются тупыми, то говорят, что дцРНК содержит тупые концы. Для ясности дцРНК с «тупым концом» представляет собой дцРНК, которая является тупой по обоим концам, т.е. не содержит нуклеотидных выступов на любом конце молекулы. Наиболее часто такая молекула является двухцепочечной на протяжении всей длины.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи иРНК, например, дцРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна последовательности-мишени, например, мРНК HSD17B13.

Как здесь используется, термин «область комплементарности» относится к области в антисмысловой цепи, которая по существу является комплементарным последовательности, например, последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности HSD17B13, как здесь определено. Когда область комплементарности не является полностью комплементарной последовательности-мишени, то ошибочные спаривания могут находиться во внешних или концевых участках молекулы. Как правило,

наиболее допустимые ошибочные спаривания находятся в концевых участках, например, в 5, 4, 3 или 2 нуклеотидах 5'- и/или 3'-конца иРНК.

Термин «смысловая цепь» или «цепь-пассажир» в контексте настоящего описания относится к цепи иРНК, которая включает область, которая по существу комплементарна области антисмысловой цепи, как этот термин определен в данном документе.

Как здесь используется, термин «область расщепления» относится к области, которая располагается непосредственно рядом с сайтом расщепления. Сайт расщепления представляет сайт на мишене, в котором происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит три основания на каждом конце и непосредственно рядом с сайтом расщепления. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит два основания на каждом конце и непосредственно рядом с сайтом расщепления. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления специфически находится в сайте, связанном с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, и область расщепления включает нуклеотиды 11, 12 и 13.

В данном контексте, если не указано иное, то термин «комплементарный», когда он используется для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия могут, например, представлять жесткие условия, где жесткие условия могут включать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ ЭДТА, 50°C или 70°C в течение 12-16 ч с последующим промыванием (см., например, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можно применять другие условия, такие как соответствующие физиологическим условиям, какие могут встречаться внутри организма. Специалист в данной области может определить ряд условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с окончательным применением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в иРНК, например, в дцРНК, как здесь описано, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности можно обозначить здесь как «полностью комплементарные» относительно друг друга. Однако когда первую последовательность обозначают здесь как «по существу комплементарная» по отношению ко второй последовательности, то две последовательности могут быть полностью комплементарными, или они могут образовывать при гибридизации одну или более, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 ошибочно спаренных пар оснований, для дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя способность гибридизоваться в условиях, наиболее

соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии гена по пути RISC. Однако когда конструируют два олигонуклеотида для образования при гибридизации одного или более одноцепочечных выступов, то такие выступы не следует рассматривать как ошибочные спаривания в отношении определения комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая является полностью комплементарной более короткому олигонуклеотиду, можно также обозначать как «полностью комплементарная» для описываемых в настоящем описании целей.

Как здесь используется, «комплементарные» последовательности также могут содержать или быть образованными полностью из не-уотсон-криковских пар оснований и/или пар оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, при условии выполнения вышеуказанных требований в отношении их способности гибридизоваться. Такие не-уотсон-криковские пары оснований в качестве неограничивающих примеров включают G:U неоднозначное или хугстиновское спаривание оснований.

Термины «комплементарный», «полностью комплементарный» и «по существу комплементарный» в настоящем описании можно использовать в отношении соответствия пар между смысловой цепью и антисмысловой цепью дцРНК, или между антисмысловой цепью средства иРНК и последовательностью-мишенью, как будет понятно из контекста их применения.

Как здесь используется, полинуклеотид, который является «по существу комплементарным по меньшей мере части» матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который является по существу комплементарным смежному участку представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей HSD17B13). Например, полинуклеотид является комплементарным по меньшей мере части мРНК HSD17B13, если последовательность является по существу комплементарной непрерывающемуся участку мРНК, кодирующей HSD17B13.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой цепи, раскрытые здесь, полностью комплементарны последовательности-мишени HSD17B13. В еще одних вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой цепи, раскрытые здесь, по существу комплементарны последовательности-мишени HSD17B13 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или фрагменту SEQ ID NO: 1, например, комплементарна примерно на 85%, примерно на 86%, примерно на 87%, примерно на 88%, примерно на 89%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98% или примерно на 99%.

В одном варианте осуществления средство для РНКи по изобретению включает

смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен последовательности-мишени HSD17B13, и где полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или фрагменту любой из SEQ ID NO: 8, например, комлементарна примерно на 85%, примерно на 86%, примерно на 87%, примерно на 88%, примерно на 89%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98% или примерно на 99%.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению содержит антисмысловую цепь, которая по существу комплементарна последовательности-мишени HSD17B13 и включает непрерывную нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентной области нуклеотидной последовательности любой из смысловых цепей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, или фрагменту любой из смысловых цепей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, например, комплементарна примерно на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% или комплементарна на 100%.

Как здесь используется, термин «ингибирование» используют взаимозаменяемо со «снижением», «сайленсингом», «понижением регуляции», «подавлением» и другими аналогичными терминами, и он включает любой уровень ингибирования.

Выражение «ингибирование экспрессии HSD17B13», как используют в настоящем описании, включает ингибирование экспрессии любого гена HSD17B13 (такого как, например, гена HSD17B13 мыши, гена HSD17B13 крысы, гена HSD17B13 обезьяны или гена HSD17B13 человека), а также вариантов или мутантов гена HSD17B13, который кодирует белок HSD17B13.

«Ингибирование экспрессии гена HSD17B13» включает любой уровень ингибирования гена HSD17B13, например по меньшей мере частичное ингибирование экспрессии гена HSD17B13, например, ингибирование по меньшей мере примерно на 20%. В некоторых вариантах осуществления ингибирование составляет по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85%, по меньшей мере примерно 90%, по меньшей мере примерно 91%, по меньшей мере примерно 92%, по меньшей мере примерно 93%, по меньшей мере примерно 94%, по меньшей мере примерно 95%, по меньшей мере примерно 96%, по меньшей мере примерно 97%, по меньшей мере примерно 98% или по меньшей мере примерно 99%.

Экспрессию гена HSD17B13 можно оценить на основании уровня любой

переменной, связанной с экспрессией гена HSD17B13, например, уровня мРНК HSD17B13 или уровня белка HSD17B13. Экспрессия гена HSD17B13 также можно оценить опосредованно, например, на основании уровней циркулирующей аланинаминотрансферазы (ALT) или ферментативной активности HSD17B13 в образце ткани, таком как образец печени. Ингибирование можно оценить по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять любой тип контрольного уровня, который используется в данной области, например, исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный для аналогичного субъекта, клетки или образца, который не подвергался обработке или обрабатывался контролем (например, обрабатывался только контрольным буфером или неактивным агентом, который используется в качестве контроля).

В одном вариантов осуществления по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена HSD17B13 оценивают по снижению количества мРНК HSD17B13, которую можно выделить из или детектировать в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибируется ген HSD17B13, и которую обрабатывали или которые обрабатывали таким образом, что экспрессия гена HSD17B13 ингибирована по сравнению со второй клеткой или группой клеток по существу идентичной первой клетка или группе клеток, но которую не обрабатывали или которые не обрабатывали таким образом (контрольные клетки).

Степень ингибирования может быть выражена следующей формулой:

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

Как здесь используется, выражение «приведение клетки в контакт со средством для РНКи», таким как дцРНК, включает приведение клетки в контакт любыми возможными способами. Приведение клетки в контакт со средством для РНКи включает приведение клетки в контакт in vitro с иРНК или приведение клетки в контакт in vivo с иРНК. Приведение в контакт можно проводить непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, средство для РНКи можно приводить в физический контакт с клеткой индивидуальным проведением способа или, альтернативно, средство для РНКи можно приводить в состояние, которое обеспечивает или способствует тому, что оно затем вступает в контакт с клеткой.

Приведение клетки в контакт in vitro можно проводить, например, посредством инкубации клетки со средством для РНКи. Приведение клетки в контакт in vivo можно проводить, например, посредством инъекции средства для РНКи в ткань или рядом с ней, где локализована клетка, или посредством инъекции средства для РНКи в другую область, например, кровоток или подкожное пространство, таким образом, чтобы средство затем попало в ткань, где локализована клетка, с которой необходимо контактировать. Например, средство для РНКи может содержать лиганд и/или являться связанным с ним, например,

GalNAc3, который направляет средство для РНКи к представляющему интерес участку, например, печени. Также возможными являются комбинации in vitro и in vivo способов приведения в контакт. Например, клетку также можно приводить в контакт in vitro со средством для РНКи, а затем трансплантировать субъекту.

В одном из вариантов осуществления приведение клетки в контакт с иРНК включает «введение» или «доставку иРНК в клетку» посредством облегчения или проведения захвата или поглощения клеткой. Поглощение или захват иРНК может происходить через диффузионные или активные клеточные процессы без содействия или посредством вспомогательных средств или устройств. Введение иРНК в клетку можно проводить in vitro и/или in vivo. Например, для введения in vivo иРНК можно инъецировать в область ткани или вводить системно. Доставку in vivo также можно проводить посредством системы доставки на основе бета-глюкана, такой как системы, описанные в патентах США № 5032401 и 5607677 и публикации патентной заявки США № 2005/0281781, содержание которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки. Введение in vitro в клетки включает известные в данной области способы, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в настоящем описании ниже и/или являются известными в данной области.

Термин «липидная наночастица» или «LNP» означает везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например иРНК или плазмида, с которой транскрибируется иРНК. LNP описаны, например, в патентах США № 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, содержание которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

Как здесь используется, термин «субъект» означает животное, такое как млекопитающее, включая примата (такого как человек, примата, отличного от человека, например, обезьяну и шимпанзе), животного, отличного от примата (такого как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк, морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птицу (например, утку или гуся).

В одном из вариантов осуществления субъект представляет собой человека, такого как человек, которого лечат или оценивают на предмет заболевания, расстройства или патологического состояния, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13; человек, подверженный риску развития заболевания, расстройства или патологического состояния, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13; человек, страдающий заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13; и/или человек, которого лечат от заболевания, расстройства или патологического состояния, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, как здесь описано.

В одном варианте осуществления субъект является гетерозиготным по гену, кодирующему вариант пататиноподобный фосфолипазный домен-содержащего белка 3

(PNPLA3) I148V. В еще одном варианте осуществления субъект является гомозиготным по гену, кодирующему вариант PNPLA3 I148M. В одном варианте осуществления субъект является гетерозиготным по гену, кодирующему вариант пататиноподобный фосфолипазный домен-содержащего белка 3 (PNPLA3) I144M. В еще одном варианте осуществления субъект является гомозиготным по гену, кодирующему вариант PNPLA3 I144M. В одном варианте осуществления субъект является гомозиготным по гену, кодирующему функциональный белок HSD17B13. В еще одном варианте осуществления субъект является гетерозиготным по гену, кодирующему функциональный белок HSD17B13. В еще одном варианте осуществления субъект является гетерозиготным по гену, кодирующему функциональный белок HSD17B13, и гену, кодирующему вариант HSD17B13 с потерей функции. В еще одном варианте осуществления субъект не является носителем варианта HSD17B13 rs72613567, например HSD17B13 rs72613567:TA.

Как здесь используются, термины «лечение» или «проводить лечение» относятся к положительному или желаемому результату, включая, не ограничиваясь этим, облегчение или ослабление одного или более симптомов, ассоциированных с экспрессией гена HSD17B13 и/или продукцией белка HSD17B13, например, HSD17B13-ассоциированное заболевание, такое как хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени, например, воспаление печени, фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD), цирроз печени, алкогольный стеатогепатит (ASH), алкогольные болезни печени (ALD), цирроз, ассоциированный с HCV, лекарственно-индуцированное поражение печени, гепатоцеллюлярный некроз и/или гепатоцеллюлярная карцинома. «Лечение» также может означать пролонгирование выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствии лечения.

Термин «более низкий» в контексте заболевания, ассоциированного с HSD17B13, относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или более. В некоторых вариантах осуществления снижение составляет по меньшей мере 20%. «Более низкий» в контексте уровня HSD17B13 у субъекта предпочтительно означает достижение уровня, принятого в диапазоне нормы у субъекта без такого расстройства.

Как здесь используются, термины «профилактика» или «предупреждение», когда они используются в отношении заболевания, расстройства или патологического состояния, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13, относятся к снижению вероятности того, что у субъекта разовьется симптом, ассоциированный с таким заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, например, симптом экспрессии гена HSD17B13, таким как воспаление печени, фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), неалкогольная жировая болезнь печени

(NAFLD), цирроз печени, алкогольный стеатогепатит (ASH), алкогольные болезни печени (ALD), цирроз, ассоциированный с HCV, лекарственно-индуцированное поражение печени, гепатоцеллюлярный некроз и/или гепатоцеллюлярная карцинома. Профилактика развития заболевания, расстройства или патологического состояния или уменьшение развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, расстройством или паологическим состоянием (например по меньшей мере примерно на 10% по шкале клинической оценки, принятой для этого заболевания или расстройства), или проявление отсроченных симптомов (например, снижения накопления липидов в печени и/или увеличения липидных капель в печени), отсроченных (например, на сутки, недели, месяцы или годы), считается эффективной профилактикой.

В данном контексте термин «заболевание, ассоциированное с HSD17B13», означает заболевание или расстройство, которое вызвано или связано с экспрессией гена HSD17B13 или продукцией белка HSD17B13. Термин «заболевание, ассоциированное с HSD17B13» включает заболевание, расстройство или патологическое состояние на которое окажет положительное действие снижение экспрессии гена или активности белка HSD17B13.

В одном варианте осуществления «HSD17B13-ассоциированное заболевание» представляет собой хроническое фибровозно-воспалительное заболевание печени. «Хроническое фиброзно- воспалительное заболевание печени» представляет любое заболевание, расстройство или патологическое состояние, ассоциированнон с хроническим воспалением и/или фиброзом печени. Примеры хронического фиброзно-воспалительного заболевания печени включают, например, воспаление печени, фиброз печени, неалкогольный стеатогепатит (NASH), неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD), цирроз печени, алкогольный стеатогепатит (ASH), алкогольные болезни печени (ALD), цирроз, ассоциированный с HCV, лекарственно-индуцированное поражение печени, гепатоцеллюлярный некроз и/или гепатоцеллюлярную карциному.

Как здесь используется, термин «терапевтически эффективное количество» включает количество средства РНКи, которое при введении субъекту, страдающему HSD17B13-ассоциированным заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, является достаточным для эффективного лечения заболевания (например, уменьшения, улучшения состояния или поддержания существующего заболевания, или один или нескольких симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может изменяться в зависимости от средства для РНКи, того как вводят средство, заболевания и его тяжести и истории, возраста, массы тела, семейного анамнеза, набора генов, типов предшествовавших или сопутствующих видов лечения при их наличии и других индивидуальных характеристик подлежащего лечению субъекта.

Как здесь используется, термин «профилактически эффективное количество» включает количество средства для иРНК, которое при введении субъекту, страдающему HSD17B13-ассоциированным заболеванием, расстройством или патологическим нарушением, является достаточным для профилактики или улучшения состояния заболевания, или одного или нескольких симптомов заболевания. Улучшение состояния

заболевания включает замедление течения заболевания или снижение тяжести развивающегося позднее заболевания. «Профилактически эффективное количество» может изменяться в зависимости от иРНК, того как вводят средство, степени риска заболевания и истории, возраста, массы тела, семейного анамнеза, набора генов, типов предшествовавших или сопутствующих видов лечения при их наличии и других индивидуальных характеристик подлежащего лечению пациента.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество средства для РНКи, которое оказывает некоторое желаемое локальное или системное действие при целесообразном соотношении польза/риск, применимом к любому лечению. иРНК, применяемую в способах по настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для получения целесообразного соотношения польза/риск, применимого для такого лечения.

Выражение «фармацевтически приемлемый» используется здесь для обозначения таких соединений, веществ, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки зрения являются пригодными для использования при контактировании с тканями людей-субъектов и животных-субъектов без проявления излишней токсичности, раздражающего действия, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения в соответствии с целесообразным соотношением польза/риск.

Как здесь используется, выражение «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, облегчающее получение средство (например, смазочное средство, тальк, стеарат магния, кальция или цинка или стеариновая кислота), или инкапсулирующее растворитель вещество, участвующее в переносе или транспортировке целевого соединения из одного органа или части организма в другой орган или часть организма. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле того, чтобы быть совместимым с другими ингредиентами состава и не являться вредным для подлежащего лечению субъекта. Некоторые примеры веществ, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза, (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал, (3) целлюлозу и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы, (4) порошкообразный трагакант, (5) солод, (6) желатин, (7) смазочные вещества, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк, (8) эксципиенты, такие как масло-какао и воска для суппозиториев, (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, сезамовое масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло, (10) гликоли, такие как пропиленгликоль, (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль, (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат, (13) агар, (14) буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия, (15) альгиновую кислоту, (16) апирогенную воду, (17) изотонический физиологический раствор, (18) раствор Рингера, (19) этиловый спирт, (20) pH забуференные растворы, (21) сложные

полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды; (22) наполнители, так как полипептиды и аминокислоты, (23) компонент сыворотки, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, применяемые в фармацевтических составах.

Как здесь используется, термин «образец» включает набор аналогичных жидкостей, клеток или тканей, отобранных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, находящихся в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, цереброспинальную жидкость, глазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т.п. Образцы ткани могут включать образцы из тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы можно получить из конкретных органов, областей органов, или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы можно получать из печени (например, всей печени или определенных сегментов печени или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления «образец, отобранный у субъекта» относится к крови или плазме, полученной у субъекта.

II. иРНК по изобретению

В данном документе описаны иРНК, которые ингибируют экспрессию гена-мишени. В одном варианте иРНК ингибируют экспрессию гена HSD17B13. В одном варианте осуществления средство на основе иРНК включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена HSD17B13 в клетке, такой как клетка печени, такая как клетка печени в организме субъекта, например, млекопитающего, такого как человека, страдающего хроническим фиброзным воспалительным заболеванием, расстройством или патологическим состоянием печени, например заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным, например, с накоплением и/или увеличением липидных капель в печени и/или фиброзом печени.

дцРНК содержит антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна по меньшей мере участку мРНК, образованной при экспрессии гена HSD17B13. Область комплементарности составляет примерно 30 нуклеотидов в длину или менее (например, составляет примерно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов в длину или менее). При контактировании с клеткой, экспрессирующей ген-мишень, иРНК ингибирует экспрессию гена-мишени (например, гена-мишени человека, примата, животного, отличного от примата, или птицы) по меньшей мере, примерно на 10%, как определено например, ПЦР или способом на основе разветвленной ДНК (bDNA), или способом на основе белков, таким как иммунофлуоресценый анализ, с использованием, например, вестерн-блоттинга или способов проточной цитометрии.

дцРНК содержит две цепи РНК, которые являются комплементарными и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будут использовать дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) содержит область комплементарности, которая по существу является комплементарной и, как правило,

полностью комплементарной последовательности-мишени. Последовательность-мишень можно получить из последовательности мРНК, образованной во время экспрессии гена HSD17B13. Другая цепь (смысловая цепь) содержит область, которая является комплементарной антисмысловой цепи, таким образом, что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано здесь в других местах настоящего описания, и как известно в данной области, комплементарные последовательности дцРНК также могут содержаться как самокомплементарные участки одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не находиться в отдельных олигонуклеотидах.

Как правило, дуплексная структура имеет составляет от 15 до 30 пар оснований в длину, например в диапазоне 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18 -23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21 -30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований в длину. Подразумевается, что диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным диапазонам и длинам, также являются частью настоящего изобретения.

Аналогичным образом, область комплементарности-мишени последовательности составляет от 15 до 30 нуклеотидов в длину, например, в диапазоне 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18- 24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20- 21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов в длину. Подразумевается, что диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным диапазонам и длинам, также являются частью настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи дцРНК каждая независимо составляет примерно от 15 до примерно 30 нуклеотидов в длину или примерно от 25 до примерно 30 нуклеотидов в длину, например, каждая цепь независимо составляет 15-29, 15-28, 15 -27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29 , 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19 -27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26 , 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21 -23, или 21-22 нуклеотида в длину. В некоторых вариантах осуществления дцРНК составляет примерно от 15 до примерно 23 нуклеотидов в длину или примерно от 25 до примерно 30 нуклеотидов в длину. Как правило, дцРНК является достаточно длинной, чтобы служить субстратом для фермента Dicer. Например, в данной области хорошо известно, что дцРНК длиной более 21-23 нуклеотидов могут служить субстратами для Dicer. Специалист с обычной квалификацией в данной области также понимает, что область РНК, являющаяся мишенью для расщепления, чаще всего представляет участок более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях «часть»

мРНК-мишени представляет собой смежную последовательность мРНК-мишени достаточной длины для того, чтобы быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т.е. расщепления по пути RISC).

Специалист в данной области также понимает, что дуплексная область является первичным функциональным участком дцРНК, например, дуплексной областью примерно от 9 до 36 пар оснований, например, примерно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11- 34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15- 31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18- 20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления при условии, что она подвергается процессированию до функционального дуплекса, например, 15-30 пар оснований, который направляет расщепление желаемой РНК, молекула РНК или комплекс молекул РНК, содержащих дуплексную область более 30 пар оснований, представляет собой дцРНК. Таким образом, как понятно специалисту в данной области, в одном варианте осуществления мкРНК представляет дцРНК. В еще одном варианте осуществления дцРНК не является природной мкРНК. В еще одном варианте осуществления средство на основе иРНК, пригодное для направления экспрессии HSD17B13, не образуется в клетке-мишени посредством расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, описанная здесь, может дополнительно содержать один или более одноцепочечных нуклеотидных выступов, например, из 1, 2, 3 или 4 нуклеотида. дцРНК, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступ, могут обладать неожиданно превосходными ингибирующими свойствами по сравнению с их аналогами с тупым концом. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/ нуклеозид. Выступ(ы) может находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа может присутствовать на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах антисмысловой или смысловой цепи дцРНК.

дцРНК можно синтезировать стандартными известными в данной области способами, как дополнительно обсуждается ниже, например, с использованием автоматического синтезатора ДНК, такого как коммерчески доступные, например, от Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Соединения иРНК по изобретению можно получать двухстадийным способом. Сначала раздельно получают индивидуальные цепи молекулы двухцепочечной РНК. Затем соединяют цепи компонентов. Индивидуальные цепи соединения миРНК можно получить с использованием жидкофазного или твердофазного органического синтеза или обоих. Органический синтез обеспечивает такое преимущество, что можно легко получить

олигонуклеотидные цепи, содержащие неприродные или модифицированные нуклеотиды. Одноцепочечные олигонуклеотиды по изобретению можно получить с использованием жидкофазного или твердофазного органического синтеза или обоих.

В одном аспекте дцРНК по изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Последовательность смысловой цепи выбрана из группы последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, и соответствующая нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи смысловой цепи выбрана из группы последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, при этом одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, полученной при экспрессии гена HSD17B13. Таким образом, в данном аспекте дцРНК будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описан как смысловая цепь (цепь-пассажир) в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, и второй олигонуклеотид описан как соответствующая антисмысловая цепь (направляющая цепь) смысловой цепи в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13. В одном варианте осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК находятся в отдельных олигонуклеотидах. В еще одном варианте осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК находятся в одном олигонуклеотиде.

Следует понимать, что, хотя последовательности в таблицах 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13 описаны как модифицированные, немодифицированные, неконъюгированные и/или конъюгированные последовательности, РНК в иРНК по изобретению, например дцРНК по изобретению, может содержать любую из последовательностей, указанных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, который не модифицирован, не конъюгирован и/или модифицирован, и/или конъюгирован иначе, чем описано здесь.

Специалистам в данной области хорошо известно, что дцРНК с дуплексной структурой примерно из 20-23 пар оснований, например, 21 пары оснований, признаны как особенно эффективные для индукции РНК-интерференции (Elbashir et al. (2001) EMBO J., 20:6877-6888). Однако было установлено, что другие более короткие или длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) RNA, 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat. Biotech, 23:222-226). В вариантах осуществления, описанных выше, за счет природы олигонуклеотидных последовательностей, обеспеченных здесь, дцРНК, описанные здесь, могут содержать по меньшей мере одну цепь длиной минимум в 21 нуклеотид. Можно с полным основанием ожидать, что более короткие дуплексы минус только несколько нуклеотидов на одном или обоих концах, могут являться аналогичным образом эффективными по сравнению с дцРНК, описанными выше. Таким образом, предполагается, что дцРНК, содержащие последовательность по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей, обеспеченных здесь, и отличающихся по своей способности ингибировать экспрессию гена HSD17B13 не более, чем приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25

или 30% ингибирования от дцРНК, содержащей полную последовательность, входят в объем настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, приведенные в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, идентифицируют сайт(ы) в транскрипте HSD17B13, который чувствителен к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно включает иРНК, которые нацелены на этот сайт(ы). В данном контексте говорят, что иРНК нацелена на определенный сайт РНК-транскрипта, если иРНК способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такая иРНК обычно будет включать по меньшей мере примерно 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных здесь, связанных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, смежной с выбранной последовательностью в гене.

Несмотря на то, что длина последовательности-мишени, как правило, составляет примерно 15-30 нуклеотидов, имеется широкая вариация пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для направленного расщепления любой конкретной РНК-мишени. Различные пакеты программного обеспечения и руководства, указанные в настоящем описании, обеспечивают руководство по идентификации оптимальных последовательностей-мишеней для любого конкретного гена-мишени, и также можно использовать эмпирический подход, в котором «окно» или «маску» заданного размера (в качестве неограничивающего примера 21 нуклеотид) буквально или в переносном смысле (включая, например, компьютерное моделирование) помещают на последовательность РНК-мишени для идентификации последовательностей в диапазоне размера, который может служить в качестве последовательностей-мишеней. Передвигая постепенно «окно» последовательности на один нуклеотид выше или ниже начального положения последовательности-мишени, можно идентифицировать следующую потенциальную последовательность-мишень, до тех пор, пока полный набор последовательностей не будет идентифицирован для данного выбранного размера мишени. Таким способом в сочетании с общим синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с использованием анализов, описанных здесь или известных в данной области) для идентификации таких последовательностей, которые оптимально функционируют, можно идентифицировать такие последовательности РНК которые, при воздействии средства для иРНК, опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии гена-мишени. Таким образом, несмотря на то, что последовательности, идентифицированные здесь, представляют эффективные последовательности-мишени, предусматривается, что можно получить дополнительную оптимизацию эффективности ингибирования посредством постепенной «прогулки по окну» на один нуклеотид выше или ниже данных последовательностей для идентификации последовательностей с эквивалентными или лучшими характеристиками ингибирования.

Кроме того, предусматривается, что для любой последовательности, идентифицированной здесь, можно получать дополнительную оптимизацию посредством

систематического добавления или удаления нуклеотидов с получением более длинных или более коротких последовательностей, и тестируя эти полученные последовательности «прогулкой по окну» большего или меньшего размера выше или ниже РНК-мишени из этой точки. Кроме того, сочетание такого подхода получения новых мишеней-кандидатов с тестированием эффективности иРНК на основе этих последовательностей-мишеней в анализе ингибирования, как известно в данной области и/или как здесь описано, может привести к дополнительным улучшениям эффективности ингибирования. Более того, такие оптимизированные последовательности можно корректировать, например, введением модифицированных нуклеотидов, как здесь описано или как известно в данной области, добавлением или изменениями в выступе или другими модификациями, как известно в данной области и/или обсуждается здесь, для дополнительной оптимизации молекулы в качестве ингибитора экспрессии (например, повышения стабильности в сыворотке крови или периода полувыведения из кровотока, повышения термостабильности, увеличения трансмембранной доставки, направленной доставки к конкретному положению или типу клеток, повышения взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, повышения выделения из эндосом).

иРНК, описанная здесь, может содержать одно или более ошибочных спариваний с последовательностью-мишенью. В одном из вариантов осуществления иРНК, описанная здесь, содержит не более 3 ошибочных спариваний. Если антисмысловая цепь иРНК содержит ошибочные спаривания с последовательностью-мишенью, то предпочтительно, чтобы область ошибочного спаривания не располагалась в центре области комплементарности. Если антисмысловая цепь иРНК содержит ошибочные спаривания с последовательностью-мишенью, то предпочтительно, чтобы ошибочное спаривание ограничивалось последними 5 нуклеотидами в 5’- или 3’-конце области комплементарности. Например, для средства для иРНК длиной 23 нуклеотида цепь, которая является комплементарной участку гена HSD17B13, как правило, не содержит какого-либо ошибочного спаривания в центральных 13 нуклеотидах. Способы, описанные здесь или известные в данной области, можно использовать для определения, является ли иРНК, содержащая ошибочное спаривание с последовательностью-мишенью, эффективной для ингибирования экспрессии гена HSD17B13. Рассмотрение фактора эффективности иРНК с ошибочными спариваниями для ингибирования экспрессии гена HSD17B13 является важным, в частности, если известно, что конкретная область комплементарности в гене HSD17B13 содержит полиморфные варианты последовательности в популяции.

III. Модифицированные иРНК по изобретению

В одном варианте осуществления РНК в иРНК по изобретению, например, дцРНК, является немодифицированной и не содержит, например, химических модификаций и/или конъюгаций, известных в данной области и описанных здесь. В еще одном варианте осуществления РНК в иРНК по настоящему изобретению, например дцРНК, химически модифицируют для повышения стабильности или других полезных характеристик. В некоторых вариантах осуществления изобретения по существу все нуклеотиды иРНК по

изобретению модифицированы. В еще одном варианте осуществления изобретения все нуклеотиды иРНК по изобретению модифицированы. иРНК по настоящему изобретению, в которых «по существу все нуклеотиды модифицированы», в значительной степени, но не полностью модифицированы и могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

В некоторых аспектах изобретения по существу все нуклеотиды иРНК по изобретению модифицированы, и средства на основе иРНК содержат не более 10 нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификации (например, не более 9 2'-фтор-модификаций, не более 8 2'-фтор-модификаций, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, нет более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификаций). Например, в некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит не более 4 нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификации (например, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификации). В еще одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит не более 6 нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификации (например, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификации).

В еще одних аспектах изобретения все нуклеотиды иРНК по изобретению модифицированы, и средства на основе иРНК содержат не более 10 нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификации (например, не более 9 2'-фтор-модификаций, не более не более 8 2'-фтор-модификаций, не более 7 2'-фтор-модификаций, не более 6 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 5 2'-фтор-модификаций, не более 4 2'-фтор-модификаций, не более 3 2'-фтор-модификаций или не более 2 2'-фтор-модификации).

В одном варианте осуществления двухцепочечное средство для РНКи по изобретению дополнительно содержит 5’-фосфат или миметик 5’-фосфата в 5’-нуклеотиде антисмысловой цепи. В еще одном варианте осуществления двухцепочечное средство для РНКи дополнительно содержит миметик 5’-фосфата в 5’-нуклеотиде антисмысловой цепи. В конкретном варианте осуществления миметик 5’-фосфата представляет собой 5’-винилфосфат (5’-VP).

Нуклеиновые кислоты по изобретению можно синтезировать и/или модифицировать известными в данной области способами, такими как способы, описанные в монографии «Current protocols in nucleic acid chemistry», Beaucage S.L. et al., (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, которая, таким образом, в полном объеме включена здесь посредством ссылки. Модификации включают, например, модификации концов, например, модификации 5’-конца (фосфорилирование, конъюгацию, инвертированные связи) или модификации 3’-конца (конъюгацию, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.д.); модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пару с широким

рядом партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями) или конъюгированные основания; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара, и/или модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений иРНК, пригодных в вариантах осуществления, описанных здесь, включают, не ограничиваясь этим, РНК, содержащие модифицированные остовы или неприродные межнуклеозидные связи. РНК, содержащие модифицированные остовы, включают наряду с другими такие, которые не содержат атом фосфора в остове. Для целей настоящего изобретения, и как иногда указывается в данной области, модифицированные РНК, которые не содержат атом фосфора в своем межнуклеозидном остове, также можно считать олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иРНК содержит атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метил и другие алкильные фосфонаты, включая 3'-алкиленовые фосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидат, включая 3'-амин-фосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их 2'-5'-связанные аналоги, и аналоги, имеющие обратную полярность, где соседние пары нуклеозидных единиц связаны 3'-5' с 5'-3' или 2'-5' с 5'-2'. Также включены различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты дцРНК по изобретению находятся в форме свободной кислоты. В еще одном варианте осуществления изобретения агенты дцРНК по изобретению находятся в форме соли. В одном варианте осуществления агенты дцРНК по изобретению находятся в форме натриевой соли. В некоторых вариантах осуществления, когда агенты дцРНК по изобретению находятся в форме натриевой соли, то ионы натрия присутствуют в агенте в качестве противоионов по существу для всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиотатных групп, присутствующих в агенте. Агенты, в которых по существу все фосфодиэфирные и/или фосфоротиоатные связи имеют противоион натрия, включают не более 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирных и/или фосфоротиоатных связей без противоиона натрия. В некоторых вариантах осуществления, когда агенты дцРНК по изобретению находятся в форме натриевой соли, то ионы натрия присутствуют в агенте в качестве противоионов для всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиотатных групп, присутствующих в агенте.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение вышеуказанных фосфорсодержащих связей, включают, не ограничиваясь этим, патенты США № 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029; и

патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

Модифицированные остовы РНК, которые не содержат атом фосфора, обладают остовами, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, или одной или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Они включают остовы, содержащие связи морфолино (частично образованные из фрагмента сахара нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; содержащие алкен остовы; сульфаматные остовы; метилениминовые и метиленгидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы и другие, содержащие смешанные компонентные части N, O, S и CH2.

Репрезентативные патенты США, которые описывают получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают, не ограничиваясь этим, патенты США № 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

В еще одних вариантах осуществления предусматривают применение подходящих миметиков РНК в иРНК, в которых сахар и межнуклеозидную связь, т.е. остов нуклеотидных звеньев, заменяют новыми группами. Основные звенья сохраняют для гибридизации с соответствующим соединением нуклеиновой кислоты-мишени. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, для которого было показано, что он обладает превосходной способностью к гибридизации, обозначают как пептидная нуклеиновая кислота (ПНК). В соединениях ПНК остов РНК с сахаром заменяют остовом, содержащим амид, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Азотистые основания сохраняют, и они являются связанными прямо или опосредованно с аза-атомами азота амидного фрагмента остова. Репрезентативные патенты США, в которых описано получение соединений ПНК, включают, не ограничиваясь этим, патенты США № 5539082, 5714331 и 5719262, содержание каждого из которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки. Дополнительные соединения ПНК, пригодные для применения в иРНК по изобретению, описаны, например, в публикации Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, описанные в изобретении, включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, и в частности -CH2-NH-O-CH2-, -CH2-N(CH3)-O-CH2-, известным как метилен(метилимино) или MMI остов, -CH2-O-N(CH3)-CH2-, -CH2N(CH3)-N(CH3)CH2- и -O-N(CH3)-CH2-CH2-, [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как -O-P-O-CH2-], и амидные остовы, описанные в вышеуказанном патенте США № 5602240. В некоторых вариантах

осуществления РНК, описанные здесь, содержат морфолиновые остовы, описанные в вышеуказанном патенте США № 5034506.

Модифицированные олигонуклеотиды могут также содержать один или более замещенных групп сахара. иРНК, например, дцРНК, содержат один из следующих заместителей в положении 2': OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где указанные алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенный или незамещенный C1-C10 алкил или C2-C10 алкенил и алкинил. Примерные подходящие модификации включают O[(CH2)nO]mCH3, O(CH2)nOCH3, O(CH2)nNH2, O(CH2)nCH3, O(CH2)nONH2, где n и m могут иметь значения от 1 до примерно 10. В еще одних вариантах осуществления дцРНК содержат один из следующих заместителей в положении 2': C1-C10 низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминоалкиламино, полиалкиламино, замещенный силил, РНК расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических свойств иРНК, или группу для улучшения фармакодинамических свойств иРНК, и другие заместители, обладающие сходными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH2CH2OCH3, также известную как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-MOE), т.е. алкоксиалкоксигруппу. Еще одна примерная модификация включает 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группу O(CH2)2ON(CH3)2, также известную как 2'-DMAOE, как описано в приведенных ниже примерах, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известную в данной области как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O-CH2-O-CH2-N(CH2)2. Другие примеры модификаций включают: 5'-Me-2'-F-нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (как R-, так и S-изомеры в данных трех группах); 2'-алкоксиалкил и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси(2'-OCH3), 2'-аминопропокси(2'-OCH2CH2CH2NH2) и 2'-фтор(2'-F). Аналогичные модификации также можно провести в других положениях иРНК, в частности, в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. иРНК также могут включать миметики сахаров, например, циклобутильные группы вместо пентофуранозильного сахара. Примеры патентов США, в которых описано получение таких модифицированных сахарных структур, включают, не ограничиваясь этим, 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 общее с настоящей заявкой владельца. Содержание каждого из указанных патентов в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

иРНК по изобретению также могут содержать модифицированные или замещенные азотистые основания (обычно называемые в данной области техники просто

«основаниями»). В контексте настоящей заявки «немодифицированные» или «природные» азотистые основания включают пуриновые основания, аденин (A) и гуанин (O), и пиримидиновые основания, тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные азотистые основания включают другие синтетические и природные азотистые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-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 и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные азотистые основания включают описанные в патенте США № 3687808, описанные в монографии «Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine», Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; описанные в «The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering», pages 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, описанные Englisch et al., (1991) Angewandte Chemie, International Edition, 30:613, описанные Sanghvi, Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из этих азотистых оснований являются пригодными, в частности, для повышения связывающей способности олигомерных соединений, обеспеченных в настоящем изобретении. Такие включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины, в том числе 2-аминопропиладенин, 5- пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. 5-метилцитозиновые замещения, как было показано, повышают стабильность дуплексов нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi Y.S., Crooke S.T., Lebleu B., eds, «Antisense Research and Applications», CRC Press, Boca Raton, 1993, pp.276-278), и представляют иллюстративные замены оснований, еще более конкретно в комбинации с 2'-O-метоксиэтил-модификациями сахаров.

Репрезентативные примеры патентов США, в которых описано получение вышеуказанных модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований, включают, не ограничиваясь эим, патенты США № 3687808, 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5596091; 5614617; 5750692 и 5681941, каждый из которых в полном объеме включен здесь посредством ссылки.

иРНК по изобретению также можно модифицировать для включения одной или более закрытых нуклеиновых кислот (LNA). Закрытая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий модифицированную группу рибозы, в которой группа рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Такая структура эффективно «закрывает» рибозу в 3'-эндо-структурной конформации. Было показано, что добавление закрытых нуклеиновых кислот к миРНК повышает стабильность

миРНК 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).

иРНК по изобретению также можно модифицировать для включения одной или более бициклических сахарных групп. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное посредством образования мостиковой связи двух атомов. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет нуклеозид, содержащий группу сахара, включающую мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, тем самым образуя бициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах осуществления мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство по изобретению может включать одну или более закрытых нуклеиновых кислот (LNA). Закрытая нуклеиновая кислота представляет нуклеотид, содержащий модифицированную группу рибозы, в которой группа рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет нуклеотид, содержащий бициклическую сахарную группу, содержащую мостик 4'-CH2-O-2'. Такая структура эффективно «закрывает» рибозу в 3'-эндо-структурной конформации. Было показано, что добавление закрытых нуклеиновых кислот к миРНК повышает стабильность миРНК 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). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах по изобретению включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотидные средства по изобретению включают один или более бициклических нуклеозидов, содержащих 4'- с 2' мостик. Примеры таких бициклических нуклеозидов с 4' с 2' мостиком включают, не ограничиваясь этим, 4′-(CH2)-O-2′ (LNA); 4′-(CH2)-S-2′; 4′-(CH2)2-O-2′ (ENA); 4′-CH(CH3)-O-2′ (также называемый «конформационно ограниченный этилом» или «cEt») и 4′-CH(CH2OCH3)-O-2′ (и их аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH3)(CH3)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH2-N(OCH3)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH2-O-N(CH3)-2' (см., например, публикацию патента США № 2004/0171570); 4'-CH2-N(R)-O-2', где R представляет H, C1-C12 алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH2-C(H)(CH3)-2' (см., например, публикацию Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); и 4'-CH2-C(=CH2)-2' (и их аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеуказанных ссылок включено здесь посредством ссылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и патентные публикации США, которые описывают получение закрытых нуклеотидов нуклеиновых кислот, включают, не ограничиваясь этим, следующие: патенты США № 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133, 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457;

8022,193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; заявки на патент США 2008/0039618 и 2009/0012281, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

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

иРНК по изобретению также можно модифицировать для включения одного или более конформационно ограниченных этилом нуклеотидов. Как здесь используется, термин «конформационно ограниченный этилом нуклеотид» или «cEt» означает закрытую нуклеиновую кислоту, содержащую бициклическую сахарную группу, содержащую 4'-CH(CH3)-0-2'мостик. В одном варианте осуществления конформационно ограниченный этилом нуклеотид находится в S-конформации, называемой здесь «S-cEt».

иРНК по изобретению может также включать один или более «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим атомы C2' и C4' углерода рибозы или атомы C3 и C5' углерода рибозы. CRN «закрывает» рибозное кольцо в стабильной конформации и увеличивает аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину, чтобы поместить кислород в оптимальное положение для стабильности и аффинности, что приводит к меньшей «складчатости» рибозного кольца.

Репрезентативные публикации, в которых описано получение некоторых из вышеуказанных CRN, включают, не ограничиваясь этим, публикацию заявки на патент США № 2013/0190383; и публикацию PCT WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых включено здесь посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют нуклеотиды UNA (раскрытая нуклеиновая кислота). UNA представляет раскрытую ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой была удалена любая из связей сахара, образуя незамкнутый «сахарный» остаток. В одном примере UNA также включает мономер, у которого удалены связи между C1'-C4' (т.е. ковалентная связь углерод-кислород-углерод между C1' и C4' атомами углерода). В другом примере удалена связь C2'-C3' (т.е. ковалентная углерод-углерод связь между C2' и C3' атомами углерода) сахара (см. Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) и Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039, включенные здесь посредством ссылки).

Репрезентативные патентные публикации США, в которых описано получение UNA, включают, не ограничиваясь этим, патент США № 8314227; и публикации заявок на патент США № 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, содержание каждого из которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации концов молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Hyp-C6-NHAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Hyp-C6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол) (Hyp-NHAc), тимидин-2'-0-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Hyp-C6-амино), 2-

докозаноил-уридин-3''-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и другие. Описание этой модификации можно найти в публикации PCT № WO 2011/005861.

Другие модификации иРНК по изобретению включают 5'-фосфатный или 5'-фосфатный миметик, например, 5'-концевой фосфатный или фосфатный миметик в антисмысловой цепи средства для РНКи. Подходящие миметики фосфата раскрыты, например, в публикации заявки на патент США № 2012/0157511, содержание которой в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

В некоторых конкретных вариантах осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению представляет средство, который ингибирует экспрессию гена HSD17B13, которое выбрано из группы средств, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13. Любое из этих средств может дополнительно содержать лиганд.

А. Модифицированные иРНК, содержащие мотивы по изобретению

В некоторых аспектах изобретения двухцепочечные средства для РНКи по изобретению включают средства с химическими модификациями, описанными, например, в WO 2013/075035, поданной 16 ноября 2012 г., полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

Следовательно, изобретение относится к двухцепочечным средствам для РНКи, способным ингибировать экспрессию гена-мишени (т.е. гена HSD17B13) in vivo. Средство для РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь средства на для РНКи может составлять от 12 до 30 нуклеотидов в длину. Например, каждая цепь может составлять 14-30 нуклеотидов в длину, 17-30 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 нуклеотидов в длину, 19-21 нуклеотидов в длину, 21-25 нуклеотидов в длину или 21-23 нуклеотида в длину. В одном варианте осуществления смысловая цепь составляет 21 нуклеотид в длину. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь составляет 23 нуклеотида в длину.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь обычно образуют дуплексную двухцепочечную РНК («дцРНК»), также называемую здесь «средством для РНКи». Дуплексная область средства для РНКи может составлять 12-30 пар нуклеотидов в длину. Например, дуплексная область 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 пар 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 дуплексная область выбрана из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления средство для РНКи может содержать одну или более выступающих областей и/или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. 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 результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом смещения двух цепей одинаковой длины. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с мРНК-мишенью, или он может быть комплементарным последовательностям генов, на которые нацелено средство, или может представлять другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием шпильки или другими линкерами без оснований.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающей области средства для РНКи может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая, не ограничиваясь этим, модифицированный 2'-сахар, такой как 2-F, 2'-O-метил, тимидин (T), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Teo), 2'-O-метоксиэтиладенозин (Aeo), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации. Например, TT может быть последовательностью выступа для любого конца любой цепи. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с мРНК-мишенью, или он может быть комплементарным последовательностям генов, на которые нацелено средство, или может представлять другую последовательность.

5’- или 3’-выступы смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей средства для РНКи могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающая область(и) содержит два нуклеотида с фосфоротиоатом между двумя нуклеотидами, где два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. В одном варианте осуществления выступ находится на 3’-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. В одном варианте осуществления такой 3’-выступ находится в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления такой 3’-выступ находится в смысловой цепи.

Средство для РНКи может содержать только один выступ, который может усиливать активность интерференции РНКи, не влияя на ее общую стабильность. Например, одноцепочечный выступ может располагаться на 3'-конце смысловой цепи или, альтернативно на 3'-конце антисмысловой цепи. РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5’-конце антисмысловой цепи (или 3’-конце смысловой цепи), или наоборот. Как правило, антисмысловая цепь РНКи имеет нуклеотидный выступ на 3’-конце, и тупой 5’-конец. Не желая связываться теорией, асимметричный тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи и выступ на 3’-конце антисмысловой цепи способствуют вовлечению направляющей цепи в процесс RISC.

В одном варианте осуществления средство для РНКи представляет олигонуклеотид с двумя тупыми концами длиной 19 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2’-O-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5’-конца.

В еще одном варианте осуществления средство для РНКи представляет

олигонуклеотид с двумя тупыми концами длиной 20 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще одном варианте осуществления средство для РНКи представляет олигонуклеотид с двумя тупыми концами длиной 21 нуклеотид, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления средство для РНКи содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для РНКи тупой, и другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

Когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, то могут быть две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов представляют выступающие нуклеотиды, и третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления средство для РНКи дополнительно содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи средства для РНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 3'-фтором, например, чередующимся мотивом. Необязательно, средство для РНКи дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAc3).

В одном варианте осуществления средство для РНКи содержит смысловую и антисмысловую цепь, где смысловая цепь составляет 25-30 нуклеотидных остатков в длину, где начиная с положений от 1 до 23 5'-концевого нуклеотида (положение 1) первой цепи содержится по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь составляет 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи, с образованием дуплекса; где, по меньшей мере мере, 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и не более чем 6

последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя одноцепочечный 3'-выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя одноцепочечный 5'-выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи представляют собой пары оснований с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выровнены для максимальной комплементарности, тем самым образуя по существу дуплексную область между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является достаточно комплементарной РНК-мишени по меньшей мере на протяжении 19 рибонуклеотидов с антисмысловой цепи для снижения экспрессии гена-мишени при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или рядом с ним.

В одном варианте осуществления средство для РНКи содержит смысловые и антисмысловые цепи, где средство для РНКи содержит первую цепь, имеющую длину, составляющую по меньшей мере 25 и не более 29 нуклеотидов, и вторую цепь, имеющую длину, которая составляет не более 30 нуклеотидов по меньшей мере с одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи образуют тупой конец, и вторая цепь на 1-4 нуклеотида длиннее на своем 3'-конце, чем первая цепь, где участок дуплексной области составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину, и вторая цепь является достаточно комплементарной для мРНК-мишени по меньшей мере на протяжении 19 нуклеотидов в длину второй цепи для снижения экспрессии гена-мишени, когда средство для РНКи вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление средства для РНКи ферментом Dicer предпочтительно приводит к миРНК, включающей 3'-конец второй цепи, тем самым снижая экспрессию гена-мишени у млекопитающего. Необязательно, средство для РНКи дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства для РНКи содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой цепи.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь средства для РНКи может также содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится на сайте расщепления в антисмысловой цепи или рядом с ним.

В средстве для РНКи, имеющего дуплексную область длиной 17-23 нуклеотидов, сайт расщепления антисмысловой цепи обычно находится примерно в положениях 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут находиться

в положениях 9, 10, 11; положениях 10, 11, 12; положениях 11, 12, 13; положениях 12, 13, 14; или в положениях 13, 14, 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца антисмысловой цепи, или нумерация начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также может изменяться в зависимости от длины дуплексной области РНКи от 5'-конца.

Смысловая цепь средства для РНКи может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи; и антисмысловая цепь может иметь по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи или рядом с ним. Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс дцРНК, то смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, чтобы один мотив из трех нуклеотидов в смысловой цепи и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой цепи имел по меньшей мере одно перекрытие нуклеотидов, т.е. по меньшей мере, один из трех нуклеотидов мотива в смысловой цепи образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой цепи. Альтернативно по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться или все три нуклеотида могут перекрываться.

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства для РНКи может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может находиться в сайте расщепления цепи или рядом с ним, и другие мотивы могут представлять крыльевые модификации. Термин «крыльевая модификация» в данном документе относится к мотиву, располагающемуся в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления той же цепи или рядом с ним. Крыльевая модификация прилегает к первому мотиву, или разделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. Когда мотивы непосредственно примыкают друг к другу, то тогда химический состав мотивов отличается друг от друга, и когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, то химический состав может быть одинаковым или различным. Могут иметь место две и более крыльевых модификации. Например, когда присутствуют две крыльевые модификации, то каждая крыльевая модификация может находиться на одном конце относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления или рядом с ним, или по обе стороны от лидерного мотива.

Аналогично смысловой цепи, антисмысловая цепь средства для РНКи может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления цепи или рядом с ним. Эта антисмысловая цепь может также содержать одну или более крыльевых модификаций при выравнивании, аналогично крыльевым модификациям, которые могут присутствовать в смысловой цепи.

В одном варианте осуществления крыльевая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи средства для РНКи обычно не включает первые один или два

концевых нуклеотида на 3’-конце, 5’-конце или на обоих концах цепи.

В еще одном варианте осуществления крыльевая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи средства для РНКи обычно не включает первые один или два спаренных нуклеотида в дуплексной области на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

Когда каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь средства для РНКи содержит по меньшей мере одну крыльевую модификацию, то крыльевые модификации могут находиться на одном и том же конце дуплексной области и иметь перекрывание одного, двух или трех нуклеотидов.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь средства для РНКи каждая содержат по меньшей мере две крыльевых модификации, то смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, что две модификации, каждая из одной цепи, находятся на одном конце дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации, каждая из одной цепи, находятся на другом конце дуплексной области с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации из одной цепи находятся на каждой стороне лидерного мотива с перекрыванием одного, двух или трех нуклеотидов в дуплексной области.

В одном варианте осуществления можно модифицировать каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи средства для РНКи, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов. Каждый нуклеотид можно модифицировать одной и той же или другой модификацией, которая может включать одно или более изменений одного или обоих не образующих связей кислородов фосфатов и/или одного или более образующих связи кислородов фосфатов; изменение компонента сахара рибозы, например 2'-гидроксила в сахаре рибозе; полную замену фосфатной группы «дефосфо»-линкерами; модификацию или замену природного основания; и замену или модификацию рибоза-фосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие модификации находятся в положении, которое повторяется в нуклеиновой кислоте, например, модификация основания или фосфатной группы, или не образующего связи О фосфатной группы. В некоторых случаях модификация будет иметь место во всех данных положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях это отсутствует. Например, модификация может иметь место только в 3'- или 5'-концевом положении, может иметь место только в концевой области, например, в положении в концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может находиться в двухцепочечной области, в одноцепочечной области или в обеих. Модификация может находиться только в двухцепочечной области РНК или может находиться только в одноцепочечной области РНК. Например, модификация фосфоротиоата в положении О, не образующего связи, может иметь место только на одном или обоих концах, может находиться только в концевой области, например, в положении концевого нуклеотида или последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах в цепи, или может находиться в двухцепочечных и одноцепочечных областях, особенно на концах. 5’-конец или концы могут быть

фосфорилированы.

Возможно, например, для повышения стабильности, включить определенные основания в выступы или включить модифицированные нуклеотиды или миметики нуклеотидов в одноцепочечные выступы, например, в 5’- или 3’-выступы, или в оба. Например, может быть желательным включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3’- или 5’-выступе могут быть модифицированы, например, посредством модификации, описанной здесь. Модификации могут включать, например, использование модификаций в 2'-положении сахара рибозы с модификациями, которые известны в данной области, например, использование дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезокси-2'-фтор (2'-F)- или 2'-O-метил-модифицированных вместо сахара рибозы азотистого основания, и модификации в фосфатной группе, например, модификации фосфоротиоата. Выступы не обязательно должны быть гомологичны последовательности-мишени.

В одном варианте каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-O-метилом, 2'-O-аллилом, 2'-C-аллилом, 2'-дезокси, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Цепи могут содержать более одной модификации. В одном варианте каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицируют 2’-O-метилом или 2’-фтором.

По меньшей мере, две различные модификации обычно присутствуют в смысловой цепи и антисмысловой цепи. Эти две модификации могут представлять 2’-O-метил-, 2’-фтор-модификации или другие.

В одном варианте осуществления Na и/или Nb содержат модификации чередующегося паттерна. Как здесь используется, термин «чередующийся мотив» относится к мотиву, имеющему одну или более модификаций, где каждая модификация находится в чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному на каждый второй нуклеотид или к одному на каждый третий нуклеотид, или аналогичный паттерн. Например, если A, B и C представляют один тип модификации нуклеотида, то чередующимся мотивом может быть «ABABABABABAB…», «AABBAABBAABB…», «AABAABAABAAB…», «AAABAAABAAAB…», «AAABBBAAABBB…» или «ABCABCABCABC…» и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если A, B, C, D каждый представляет один тип модификации в нуклеотиде, то чередующийся паттерн, т. е. модификации в каждом последующем нуклеотиде, могут быть такими же, но каждую для смысловой цепи или антисмысловой цепи можно выбрать из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, таких как «ABABAB…», «ACACAC…», «BDBDBD…» или «CDCDCD…» и т. д.

В одном варианте осуществления средство для РНКи по изобретению содержит паттерн модификации для чередующегося мотива в смысловой цепи, который сдвинут относительно паттерна модификации чередующегося мотива в антисмысловой цепи. Сдвиг может представлять собой такой, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой

цепи соответствует различно модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, смысловая цепь, когда спарена с антисмысловой цепью в дуплексе дцРНК, то чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ABABAB» от 5'-3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «BABABA» от 5'-3' цепи в дуплексной области. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «AABBAABB» от 5'-3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «BBAABBAA» от 5'-3' цепи внутри дуплексной области, так что происходит полный или частичный сдвиг паттернов модификации между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

В одном варианте осуществления средство для РНКи содержит паттерн чередующегося мотива 2'-O-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой цепи, который исходно имеет сдвиг относительно паттерна чередующегося мотива 2'-O-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой цепи, т. е. 2'-O-метил-модифицированный нуклеотид в парах оснований смысловой цепи с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловой цепи и наоборот. Положение 1 смысловой цепи может начинаться с 2'-F-модификации, и положение 1 антисмысловой цепи может начинаться с 2'-O-метил-модификации.

Введение одного или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь нарушает первоначальный паттерн модификации, имеющий место в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи. Такое нарушение паттерна модификации смысловой и/или антисмысловой цепи посредством введения одного или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую и/или антисмысловую цепь неожиданно усиливает активность сайленсинга гена в отношении гена-мишени.

В одном варианте осуществления, когда мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах вводится в любую из цепей, то модификация нуклеотида, следующего за мотивом, представляет собой модификацию, отличную от модификации мотива. Например, участок последовательности, содержащий мотив, представляет собой «...NaYYYNb...», где «Y» представляет модификацию мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и «Na» и «Nb» представляют модификации нуклеотида, следующего за мотивом «YYY», которая отличается от модификации Y, и где Na и Nb могут быть одинаковыми или разными модификациями. Альтернативно, Na и/или Nb могут присутствовать или отсутствовать, когда присутствует крыльевая модификация.

Средство для РНКи может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может иметь место в любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или обеих цепях в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может находиться в каждом нуклеотиде смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; каждая модификация

межнуклеотидной связи может происходить в чередующемся паттерне в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может быть таким же или отличаться от такового в антисмысловой цепи, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления двухцепочечное средство для РНКи содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце или на 3'-конце.

В одном варианте осуществления РНКи содержит модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающей области. Например, выступающая область может содержать два нуклеотида, имеющих фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для связывания выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексной области. Например по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны через фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь, и, необязательно, могут иметь место дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за выступающим нуклеотидом. Например, между концевыми тремя нуклеотидами могут быть по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, в которых два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, и третий является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. Эти три концевых нуклеотида могут находиться на 3’-конце антисмысловой цепи, 3’-конце смысловой цепи, 5’-конце антисмысловой цепи и/или 5’-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, и имеет место две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за выступающим нуклеотидом. Необязательно, средство для РНКи может дополнительно иметь две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами как на 5’-конце смысловой цепи, так и на 5’-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления средство для РНКи содержит ошибочное спаривание(я) с мишенью в дуплексе или их комбинации. Ошибочное спаривание может иметь место в области выступа или области дуплекса. Пару оснований можно ранжировать на основе ее способности к диссоциации или плавлению (например, на основе свободной

энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самым простым подходом является анализ пары на основе конкретной пары, хотя также можно использовать следующего соседа или аналогичный анализ). С точки зрения стимуляции диссоциации: A:U предпочтительнее G:C; G:U предпочтительнее G:C; и I:C предпочтительнее G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или иные, чем канонические спаривания (как описано здесь в других местах), предпочтительнее канонических спариваний (A:T, A:U, G:C); и спаривания, которые включают универсальное основание, являются предпочтительнее канонических спариваний.

В одном варианте осуществления средство для РНКи содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных областях от 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранных из группы: A:U, G:U, I:C, и ошибочно спаренные пары, например, неканонические или иные, чем канонические спаривания или спаривания, которые включают универсальное основание, для содействия диссоциации антисмысловой цепи на 5'-конце дуплекса.

В одном варианте осуществления нуклеотид в положении 1 в дуплексной области от 5’-конца антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. Альтернативно по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексной области от 5’-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексной области от 5’-конца антисмысловой цепи представляет пару оснований AU.

В еще одном варианте осуществления нуклеотид на 3’-конце смысловой цепи представляет дезокситимидин (dT). В еще одном варианте осуществления нуклеотид на 3’-конце антисмысловой цепи представляет дезокситимидин (dT). В одном варианте осуществления имеет место короткая последовательность из нуклеотидов дезокситимидина, например, два нуклеотида dT на 3’-конце смысловой и/или антисмысловой цепи.

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

5' np-Na-(X X X)i-Nb-Y Y Y -Nb-(Z Z Z)j-Na-nq 3'(I)

где:

i и j каждый независимо равен 0 или 1;

p и q каждый независимо равен 0-6;

Na каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

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

np и nq каждый независимо представляет выступающий нуклеотид;

где Nb и Y не имеют одинаковых модификаций; и

XXX, YYY и ZZZ каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных

модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Предпочтительно все YYY представляют 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления Na и/или Nb содержат модификации чередующегося паттерна.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или рядом с ним. Например, когда средство для РНКи имеет дуплексную область, составляющую 17-23 нуклеотидов в длину, то мотив YYY может находиться в или рядом с сайтом расщепления (например: может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой цепи, где нумерация начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца; или, необязательно нумерация начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области, начиная от 5'-конца.

В одном варианте осуществления i равно 1, и j равно 0, или i равно 0, и j равно 1, или оба i и j равны 1. Следовательно, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

5' np-Na-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Ib);

5' np-Na-XXX-Nb-YYY-Na-nq 3' (Ic); или

5' np-Na-XXX-Nb-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Id).

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

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

Когда смысловая цепь представлена формулой (Id), то каждый Nb независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно Nb равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый Na может независимо представлять олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

В еще одних вариантах осуществления i равно 0, и j равно 0, и смысловая цепь может быть представлена формулой:

5' np-Na-YYY- Na-nq 3' (Ia).

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

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой цепи РНКи

может быть представлена формулой (II):

5' nq'-Na′-(Z'Z'Z')k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(X′X′X′)l-N′a-np′ 3'(II)

где:

k и l каждый независимо равен 0 или 1;

p' и q' каждый независимо равен 0-6;

Na' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность включает по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

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

np' и nq' каждый независимо представляет выступающий нуклеотид;

где Nb' и Y' не имеют одинаковых модификаций; и

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

В одном варианте осуществления Na' и/или Nb' содержат модификации чередующегося паттерна.

Мотив Y'Y'Y' находится в сайте расщепления антисмысловой цепи или рядом с ним. Например, когда средство для РНКи имеет дуплексную область, составляющую 17-23 нуклеотидов 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 цепи, где нумерация начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца; или, необязательно, нумерация начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области, начиная от 5'-конца. Предпочтительно мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления мотив Y'Y'Y' представляет все 2'-OMe-модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления k равно 1, и l равно 0, или k равно 0, и l равно 1, или оба k и l равны 1.

Следовательно, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

5' nq'-Na′-Z′Z′Z′-Nb′-Y′Y′Y′-Na′-np' 3'(IIb);

5' nq'-Na′-Y′Y′Y′-Nb′-X′X′X′-np' 3' (IIc); или

5' nq'-Na′- Z′Z′Z′-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′- X′X′X′-Na′-np' 3' (IId).

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIb), то Nb' представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIc), то Nb' представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na' независимо представляет

олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IId), то каждый Nb' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно Nb равно 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В еще одних вариантах осуществления k равно 0, и l равно 0, и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:

5' np'-Na'-Y'Y'Y'- Na'-nq' 3' (Ia).

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

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

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-O-метилом, 2'-O-аллилом, 2'-C-аллил, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-O-метилом или 2'-фтором. Каждый X, Y, Z, X', Y' и Z', в частности, может представлять 2'-O-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства для РНКи может содержать мотив YYY, находящийся в положениях 9, 10 и 11 цепи, когда дуплексная область составляет 21 нуклеотид, где нумерация начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно нумерация начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца; и Y представляет 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ как крыльевые модификации на противоположном конце дуплексной области; и XXX и ZZZ каждый независимо, представляет 2'-OMe-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив Y'Y'Y', находящийся в положениях 11, 12, 13 цепи, где нумерация начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца, или необязательно нумерация начинается с 1-ого спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца; и Y' представляет 2'-O-метил-модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' как крыльевые модификации на противоположном конце дуплексной области; и X'X'X' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет 2'-OMe-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

Соответственно, средства для РНКи для применения в способах по настоящему изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь

содержит от 14 до 30 нуклеотидов, где дуплекс РНКи представлен формулой (III):

смысловая: 5' np-Na-(XXX)i-Nb-YYY-Nb-(ZZZ)j-Na-nq 3'

антисмысловая: 3' np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq' (III)
5'

где:

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

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

Na и Na' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

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

где np', np, nq' и nq, каждый может присутствовать или отсутствовать, и независимо представляет выступающий нуклеотид; и

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

В одном варианте осуществления i равно 0, и j равно 0; или i равно 1, и j равно 0; или i равно 0, и j равно 1; или оба i и j равны 0; или оба i и j равны 1. В еще одном варианте осуществления k равно 0, и l равно 0; или k равно 1, и l равно 0; k равно 0, и l равно 1; или оба k и l равны 0; или оба k и l равны 1.

Типичные комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующие дуплекс РНКи, включают следующие формулы:

5' np - Na -Y Y Y -Na-nq 3'

3' np'-Na'-Y'Y'Y' -Na'nq' 5'

(IIIa)

5' np -Na -Y Y Y -Nb -Z Z Z -Na-nq 3'

3' np'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na'nq' 5'

(IIIb)

5' np-Na- X X X -Nb -Y Y Y - Na-nq 3'

3' np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-nq' 5'

(IIIc)

5' np -Na -X X X -Nb-Y Y Y -Nb- Z Z Z -Na-nq 3'

3' np'-Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na-nq' 5'

(IIId)

Когда средство для РНКи представлено формулой (IIIa), то каждый Na независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда средство для РНКи представлено формулой (IIIb), то каждый Nb независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na независимо представляет

олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда средство для РНКи представлено формулой (IIIc), то каждый Nb, Nb' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда средство для РНКи представлено формулой (IIId), то каждый Nb, Nb' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na, Na' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na, Na', Nb и Nb' независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

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

Когда средство для РНКи представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), то по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. Альтернативно по меньшей мере два нуклеотида Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три нуклеотида Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

Когда средство для РНКи представлено формулой (IIIb) или (IIId), то по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. Альтернативно по меньшей мере два из Z нуклеотидов образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три нуклеотида Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

Когда средство для РНКи представлено формулой (IIIc) или (IIId), то по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. Альтернативно по меньшей мере два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три нуклеотида X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

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

В одном варианте осуществления, когда средство для РНКи представлено формулой (IIId), то модификации Na представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации. В еще одном варианте осуществления, когда средство для РНКи представлено формулой (IIId), то модификации Na представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации, и np' > 0, и по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь. В еще одном варианте осуществления, когда средство для РНКи представлено формулой

(IIId), то модификации Na представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации, np' > 0 и по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер (описанный ниже). В еще одном варианте осуществления, когда средство для РНКи представлено формулой (IIId), то модификации Na представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации, np' > 0 и по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатная связь, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления, когда средство для РНКи представлено формулой (IIIa), то модификации Na представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации, np' > 0 и по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления средство для РНКи представляет мультимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы связаны линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым линкером. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацеленным на один или два разных гена; или каждый из дуплексов может быть нацеленным на один и тот же ген в двух различных сайтах-мишенях.

В одном варианте осуществления средство для РНКи представляет мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы связаны линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым линкером. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацеленным на один или два разных гена; или каждый из дуплексов может быть нацеленным на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В одном варианте осуществления два средства для РНКи, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), связаны друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может быть нацеленным на один или два разных гена; или каждое из средств может быть нацеленным на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи по изобретению может содержать небольшое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 10 или меньше нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. Например, средство для РНКи может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией.

В конкретном варианте осуществления средство для РНКи по изобретению содержит 10 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи. В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по изобретению содержит 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи.

В еще одних вариантах осуществления средство для РНКи по изобретению может содержать очень небольшое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 2 или меньше нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию. Например, средство для РНКи может содержать 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. В конкретном варианте осуществления средство для РНКи может содержать 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией, например, 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи.

В различных публикациях описываются мультимерные средства для РНКи, которые можно использовать в способах по изобретению. Такие публикации включают WO2007/091269, патент США № 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 и WO2011/031520, содержание каждого из которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

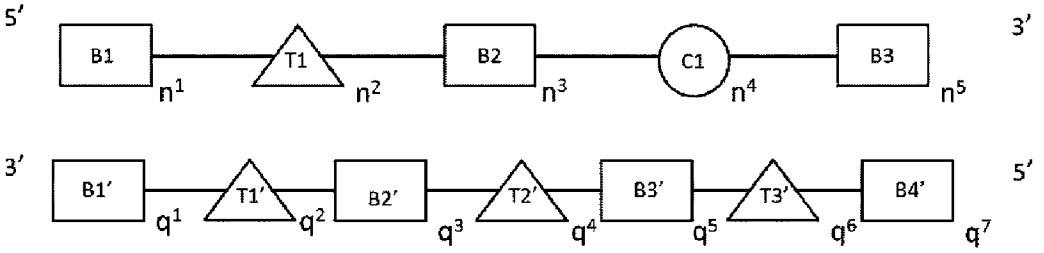
Как более подробно описано ниже, средство для РНКи содержит конъюгации одной или более углеводных групп со средством для РНКи, которые могут оптимизировать одно или более свойств средства для РНКи. Во многих случаях углеводная группа присоединена к модифицированной субъединице средства для РНКи. Например, сахар рибоза одной или более рибонуклеотидных субъединиц средства на основе дцРНК может быть замещен другой группой, например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой сахар рибоза в субъединице был замещен таким образом, обозначен здесь как субъединица модификации замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять карбоциклическую кольцевую систему, т.е. все атомы кольца являются атомами углерода, или гетероциклическую кольцевую систему, т.е. один или несколько атомов кольца могут быть гетероатомом, например, азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может представлять моноциклическую кольцевую систему или может содержать два или более колец, например конденсированных колец. Циклический носитель может быть полностью насыщенной кольцевой системой или может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду через носитель. 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». Как здесь используется, термин «точка присоединения к остову» относится к функциональной группе, например гидроксильной группе или, как правило, связи, доступной для и пригодной для включения носителя в остов, например, фосфат или

модифицированный фосфат, например, содержащий серу остов рибонуклеиновой кислоты. «Связывающая точка присоединения» (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в состав кольца атому циклического носителя, например атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), которая соединяет выбранную группу. Группа может представлять, например, углевод, например моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно, выбранная группа связана промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто будет включать функциональную группу, например аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, которая подходит для включения или связывания другого химического соединения, например лиганда, с компонентом кольца.

Средства для РНКи могут быть конъюгированы с лигандом через носитель, где носитель может представлять циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из остова серинола или остова диэтаноламина.

В еще одном варианте осуществления изобретения средство для РНКи содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь содержит от 14 до 40 нуклеотидов. Средство для РНКи может быть представлено формулой (L):

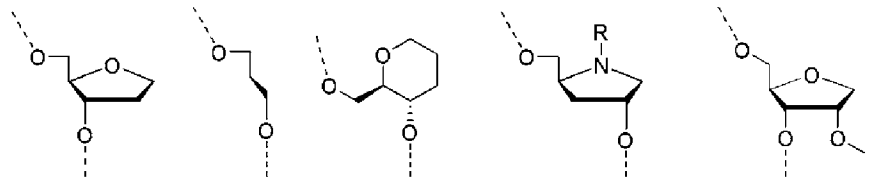


(L),

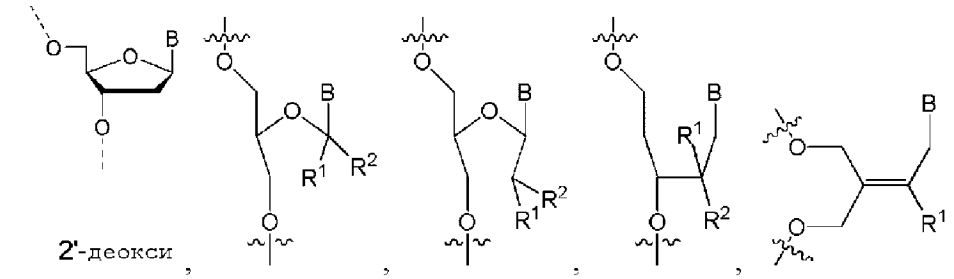
В формуле (L) B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' каждый независимо представляет нуклеотид, содержащий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-алкила, 2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA. В некоторых вариантах осуществления B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' каждый содержит 2'-OMe-модификации. В некоторых вариантах осуществления B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' каждый содержит 2'-OMe- или 2'-F-модификации. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-O-N-метилацетамидо(2'-O-NMA)модификацию.

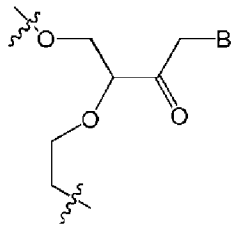
C1 представляет собой термически дестабилизирующий нуклеотид, расположенный в сайте, противоположном затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой цепи). Например, C1 находится в положении смысловой цепи,

которое спаривается с нуклеотидом в положениях 2-8 от 5’-конца антисмысловой цепи. В одном примере C1 находится в положении 15 от 5’-конца смысловой цепи. Нуклеотид C1 несет термодестабилизирующую модификацию, которая может включать модификацию без основания; ошибочное спаривание с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и модификации сахара, такие как 2’-дезокси-модификация или ациклический нуклеотид, например, раскрытые нуклеиновые кислоты (UNA) или нуклеиновая кислота гликоля (GNA). В некоторых вариантах осуществления C1 имеет термодестабилизирующую модификацию, выбранную из группы, состоящей из: i) ошибочного спаривания с противоположным нуклеотидом в антисмысловой цепи; ii) модификацию без основания, выбранную из группы, состоящей из:

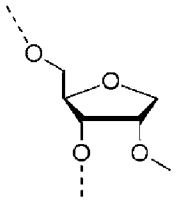


и iii) модификацию сахара, выбранную из группы, состоящей из:





, где B представляет модифицированное или немодифицированное азотистое основание, R1 и R2 независимо представляют H, атом галогена, OR3 или алкил; и R3 представляет H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар. В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация в C1 представляет собой ошибочное спаривание, выбранное из группы, состоящей из G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C: T, U:U, T:T и U:T; и необязательно по меньшей мере одно азотистое основание в паре ошибочно спаренных нуклеотидов представляет собой 2’-дезокси азотистое основание. В одном примере термически дестабилизирующая модификация в C1 представляет GNA или:



T1, T1', T2' и T3' каждый независимо представляет нуклеотид, содержащий модификацию, придающую нуклеотиду стерический объем, который меньше или равен стерическому объему 2'-OMe-модификации. Стерический объем относится к сумме стерических эффектов модификации. Способы определения стерических эффектов модификации нуклеотида известны специалисту в данной области. Модификация может находиться в положении 2' сахара рибозы нуклеотида или представлять модификацию не рибозного нуклеотида, ациклического нуклеотида или остова нуклеотида, который аналогичен или эквивалентен 2' положению сахара рибозы, и обеспечивает нуклеотиду стерический объем, который меньше или равен стерическому объему 2'-OMe-модификации. Например, T1, T1', T2' и T3' каждый независимо выбран из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила. В некоторых вариантах осуществления T1 представляет ДНК. В некоторых вариантах осуществления T1' представляет ДНК, РНК или LNA. В некоторых вариантах осуществления T2' представляет ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления T3' представляет ДНК или РНК.

n1, n3 и q1 независимо составляют от 4 до 15 нуклеотидов в длину.

n5, q3 и q7 независимо составляют 1-6 нуклеотидов в длину.

n4, q2 и q6 независимо составляют 1-3 нуклеотида в длину; в качестве альтернативы n4 равно 0.

q5 независимо составляет 0-10 нуклеотидов в длину.

n2 и q4 независимо составляют 0-3 нуклеотида в длину.

Альтернативно, n4 составляет 0-3 нуклеотида в длину.

В некоторых вариантах осуществления n4 может быть равен 0. В одном примере n4 равно 0, и q2 и q6 равны 1. В еще одном примере n4 равно 0, и q2 и q6 равны 1, с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

В некоторых вариантах осуществления n4, q2 и q6 каждый равен 1.

В некоторых вариантах осуществления n2, n4, q2, q4 и q6 каждый равен 1.

В некоторых вариантах осуществления C1 находится в положении 14-17 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь составляет 19-22 нуклеотида в длину, и n4 равно 1. В некоторых вариантах осуществления C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления T3' начинается в положении 2 от 5'-конца

антисмысловой цепи. В одном примере T3’ находится в положении 2 от 5’ конца антисмысловой цепи, и q6 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления T1’ начинается в положении 14 от 5’-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1’ находится в положении 14 от 5’-конца антисмысловой цепи, и q2 равно 1.

В примерном варианте осуществления T3’ начинается в положении 2 от 5’-конца антисмысловой цепи, и T1’ начинается в положении 14 от 5’-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3’ начинается в положении 2 от 5’-конца антисмысловой цепи, и q6 равно 1, и T1’ начинается с положения 14 от 5’-конца антисмысловой цепи, и q2 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления T1’ и T3’ разделены по длине 11 нуклеотидами (т.е. без учета нуклеотидов T1’ и T3’).

В некоторых вариантах осуществления T1’ находится в положении 14 от 5’-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q2 равен 1, и модификация в положении 2' или в положениях не рибозного нуклеотида, ациклического нуклеотида или остова нуклеотида, которая обеспечивает меньший стерический объем, чем 2'-OMe рибоза.

В некоторых вариантах осуществления T3’ находится в положении 2 от 5’-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q6 равно 1, и модификация в положении 2' или в положениях не рибозного нуклеотида, ациклического нуклеотида или остова нуклеотида, которые обеспечивают меньший или равный стерический объем, чем 2'-OMe-рибоза.

В некоторых вариантах осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи. В одном примере T1 находится в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь составляет 19-22 нуклеотида в длину, и n2 равно 1. В примерном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь составляет 19-22 нуклеотида в длину, и n2 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления T2’ начинается в положении 6 от 5’-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2’ находится в положениях 6-10 от 5’-конца антисмысловой цепи, и q4 равен 1.

В иллюстративном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи, например, в положении 11 от 5’-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь составляет 19-22 нуклеотида в длину, и n2 равно 1; T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q2 равно 1, и модификация T1' находится в положении 2' сахара рибозы или в положениях не рибозного нуклеотида, ациклического нуклеотида или остова нуклеотида, которые обеспечивают меньший стерический объем, чем 2'-OMe-рибоза; T2’ находится в положениях 6-10 от 5’-конца антисмысловой цепи, и q4 равно 1; и T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q6 равно 1, и модификация T3' находится в положении 2' или в положениях не рибозного нуклеотида, ациклического нуклеотида или остова нуклеотида, которые обеспечивают меньший или равный

стерический объем, чем 2'-OMe-рибоза.

В некоторых вариантах осуществления T2’ начинается в положении 8 от 5’-конца антисмысловой цепи. В одном примере, T2’ начинается в положении 8 от 5’-конца антисмысловой цепи, и q4 равно 2.

В некоторых вариантах осуществления T2’ начинается в положении 9 от 5’-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2’ находится в положении 9 от 5’-конца антисмысловой цепи, и q4 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 1, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 6, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи).

В некоторых вариантах осуществления n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 1, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 6, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи).

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в

положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи).

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 6, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 7, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4 , T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи).

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; необязательно по меньшей мере с 2 дополнительными TT на 3'-конце антсмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществленя B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 5, T2' представляет 2'-F, q4 равно 1, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; необязательно по меньшей мере с двумя дополнительными TT на 3'-конце антисмысловой цепи; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи).

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' равно 2'-OMe, и q7 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи).

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4 , T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1.

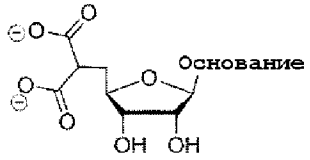
В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной

межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи).

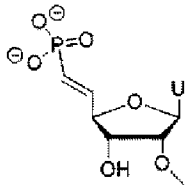
В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи).

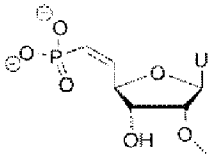
Средство для РНКи может содержать фосфорсодержащую группу на 5’-конце смысловой цепи или антисмысловой цепи. Фосфорсодержащая группа на 5'-конце может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфоротиоат (5'-PS), 5'-концевой фосфородитиоат (5'-PS2), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат (MePhos) или 5’-дезокси-5’-C-малонил



). Когда 5’-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5’-концевой винилфосфонат (5’-VP), то 5’-VP может представлять изомер 5’-E-VP (т.е. транс-винилфосфат,



), изомер 5’-*Z*-VP (т.е. цис-винилфосфат,



), или их смеси.

В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит фосфорсодержащую группу на 5’-конце смысловой цепи. В некоторых вариантах

осуществления средство для РНКи содержит фосфорсодержащую группу на 5’-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-P. В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-P в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-PS. В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-PS в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-VP. В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-VP в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-E-VP в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-Z-VP в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-PS2. В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-PS2 в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-PS2. В некоторых вариантах осуществления средство для РНКи содержит 5’-дезокси-5’-C-малонил в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-PS.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-P.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-VP. 5’-VP может быть 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3

представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-PS2.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-дезокси-5'-C-малонил.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-P.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца

смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-VP. 5’-VP может быть 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, T2’ представляет 2’-F, q4 равно 2, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 5, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS2.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-дезокси-5’-С-малонил.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-P.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство на основе дцРНК также содержит 5'-PS.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8,

T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' равно 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-PS2.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет й 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-дезокси-5'-С-малонил.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой прядь (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-Р.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой прядь (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-PS.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3

представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой прядь (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-VP. 5'-VP может быть 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой прядь (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-PS2.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой прядь (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5'-дезокси-5'-C-малонил.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'-OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5'-P.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2'

представляет 2’-F, q4 равно 2, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 5, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5’-PS.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, T2’ представляет 2’-F, q4 равно 2, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 5, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5’-VP. 5’-VP может быть 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, T2’ представляет 2’-F, q4 равно 2, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 5, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство на основе дцРНК для РНКи также содержит 5’-PS2.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, T2’ представляет 2’-F, q4 равно 2, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 5, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5’-дезокси-5’-C-малонил.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-P.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно

1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-VP. 5’-VP может быть 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS2.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' равно 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-дезокси-5’-С-малонил.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 7, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5’-P.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 7, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5’-PS.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 7, T3’ равно 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5’- VP. 5’-VP может быть 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 7, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5’-PS2.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2’-OMe или 2’-F, n1 равно 8, T1 представляет 2’-F, n2 равно 3, B2 представляет 2’-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2’-OMe, n5 равно 3, B1’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q1 равно 9, T1’ представляет 2’-F, q2 равно 1, B2’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3’ представляет 2’-OMe или 2’-F, q5 равно 7, T3’ представляет 2’-F, q6 равно 1, B4’ представляет 2’-F, и q7 равно 1. Средство для РНКи также содержит 5’-дезокси-5’-C-малонил.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя

модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-P.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-VP. 5’-VP может быть 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS2.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3'

представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5'-дезокси-5'-С-малонил.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца

смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд.

В некоторых вариантах осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5'-PS2 и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5'-PS2 находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5'-дезокси-5'-C-малонил и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5'-дезокси-5'-C-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями

фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5’-P и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-P находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5’-PS и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-PS находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5’-VP (например, 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-VP находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5’-PS2 и нацеливающий

лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-PS2 находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-OMe, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца). Средство для РНКи также содержит 5’-дезокси-5’-С-малонил и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-дезокси-5’-С-малонил находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-Р и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-Р находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-PS находится на 5’-конце антисмысловой цепи, а нацеливающий лиганд

находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-VP (например, 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-VP находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS2 и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-PS2 находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, T2' представляет 2'-F, q4 равно 2, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 5, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-дезокси-5’-С-малонил и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-дезокси-5’-С-малонил находится на 5’-конце

антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-P и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-P находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах реализации 5’-PS находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-VP (например, 5’-E-VP, 5’-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-VP находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-PS2 и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-PS2 находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления B1 представляет 2'-OMe или 2'-F, n1 равно 8, T1 представляет 2'-F, n2 равно 3, B2 представляет 2'-OMe, n3 равно 7, n4 равно 0, B3 представляет 2'- OMe, n5 равно 3, B1' представляет 2'-OMe или 2'-F, q1 равно 9, T1' представляет 2'-F, q2 равно 1, B2' представляет 2'-OMe или 2'-F, q3 равно 4, q4 равно 0, B3' представляет 2'-OMe или 2'-F, q5 равно 7, T3' представляет 2'-F, q6 равно 1, B4' представляет 2'-F, и q7 равно 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (нумерация от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (нумерация от 5'-конца антисмысловой цепи). Средство для РНКи также содержит 5’-дезокси-5’-С-малонил и нацеливающий лиганд. В некоторых вариантах осуществления 5’-дезокси-5’-С-малонил находится на 5’-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3’-конце смысловой цепи.

В конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер; и

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 17, 19 и 21 и 2'-OMe-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14-16, 18 и 20 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 3, 5, 9, 11-13, 15, 17, 19, 21 и 23, и 2'-F модификации в положениях 2, 4, 6-8, 10, 14, 16, 18, 20 и 22 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства на основе дцРНК имеют двухнуклеотидный выступ на 3’-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 15, 17, 19 и 21, и 2'-OMe-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 и 20 (нумерация от 5’-конца); и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23, и 2'-F модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства для РНКи имеют двухнуклеотидный выступ на 3’-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-OMe-модификации в положениях с 1-6, 8, 10 и 12-21, 2'-F-модификации в положениях 7 и 9 и дезоксинуклеотид (например, dT) в положении 11 (нумерация от 5’-конца); и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19-23, и 2'-F-модификации в положениях 2, 4-6, 8, 10, 12 , 14, 16 и 18 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства для РНКи имеют двухнуклеотидный выступ на 3’-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-OMe-модификации в положениях 1-6, 8, 10, 12, 14 и 16-21, и 2'-F модификации в положениях 7, 9, 11, 13 и 15; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 и 21-23, и 2'-F-модификации в положениях 2-4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства для РНКи имеют двухнуклеотидный выступ на 3’-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-OMe-модификации в положениях 1-9 и 12-21 и 2'-F- модификации в

положениях 10 и 11; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23, и 2'-F модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства для РНКи имеют двухнуклеотидный выступ на 3’-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11 и 13 и 2'-OMe-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12 и 14-21; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 3, 5-7, 9, 11-13, 15, 17-19 и 21-23, и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 8, 10, 14, 16 и 20 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства для РНКи имеют двухнуклеотидный выступ на 3’-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17 и 19-21, и 2'-F-модификации в положениях 3, 5, 7, 9-11, 13, 16 и 18; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 25 нуклеотидов;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 4, 6, 7, 9, 11-13, 15, 17 и 19-23, 2'-F-модификации в положениях 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16 и 18, и дезоксинуклеотиды (например, dT) в положениях 24 и 25 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства для РНКи имеют четырехнуклеотидный выступ на 3’-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-OMe-модификации в положениях 1-6, 8 и 12-21, и 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 8, 10-13, 15 и 17-23, и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 9, 14 и 16 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства для РНКи имеют двухнуклеотидный выступ на 3’-конце

антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-OMe-модификации в положениях 1-6, 8 и 12-21, и 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 23 нуклеотида;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-23, и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (нумерация от 5’-конца);

где средства для РНКи имеют двухнуклеотидный выступ на 3’-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5’-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления средство для РНКи по настоящему изобретению содержит:

(a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину 19 нуклеотидов;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3’-концу, где указанный лиганд ASGPR включает три производных GalNAc, присоединенные через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-OMe-модификации в положениях 1-4, 6 и 10-19, и 2'-F-модификации в положениях 5 и 7-9; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2 и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (нумерация от 5’-конца);

и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину 21 нуклеотид;

(ii) 2'-OMe-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-21, и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (нумерация от 5’-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными

положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 19 и 20 и между нуклеотидными положениями 20 и 21 (считая от 5'-конца);

где средства для РНКи имеют двухнуклеотидный выступ на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления иРНК для применения в способах по изобретению представляет средство, выбранное из средств, приведенных в таблицах 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13. В одном варианте осуществления средство представляет AD-288917. В другом варианте осуществления средство представляет AD-288996. В еще одном варианте осуществления средство представляет AD-413639. В одном варианте осуществления средство представляет AD-413644. В еще одном варианте осуществления средство представляет AD-413669. Эти средства могут дополнительно содержать лиганд.

IV. иРНК, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК в иРНК по изобретению включает химическое связывание с РНК одного или более лигандов, групп или конъюгатов, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточный захват иРНК. Такие группы включают, не ограничиваясь этим, липидные группы, такие как группа холестерина (Letsinger et al. (1989) Proc. Natl. Acid. Sci. USA, 86: 6553-6556), холевая кислота (Manoharan et al. (1994) Biorg. Med. Chem. Let., 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-тритилтиол (Manoharan et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci., 660:306-309; Manoharan et al., (1993) Biorg. Med. Chem. Let., 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al. (1992) Nucl. Acids Res., 20:533-538), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al. (1991) EMBO J., 10:1111-1118; Kabanov et al., (1990) FEBS Lett., 259:327-330; Svinarchuk et al., (1993) Biochimie, 75:49-54), фосфолипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-O-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654; Shea et al. (1990) Nucl. Acids Res., 18:3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al. (1995) Nucleosides & Nucleotides, 14:969-973) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al. (1995) Tetrahedron Lett., 36:3651-3654), пальмитиловую группу (Mishra et al. (1995) Biochim. Biophys. Acta, 1264:229-237) или группу октадециламина или гексиламинокарбонилоксихолестерина (Crooke et al. (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther., 277:923-937).

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или период полувыведения средства на основе иРНК, в которое его включают. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышение аффинности к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, компартменту клетки или органа, ткани, органу или участку в организме, например, по сравнению с соединением без такого лиганда. Предпочтительные лиганды не участвуют в образовании пар дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающееся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин,

циклодекстрин, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может представлять рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирол-ангидрид малеиновой кислоты, сополимер поли(L-лактид-со-гликолид), сополимер дивиниловый эфир-малеиновый ангидрид, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (HMPA), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиутеран, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида, или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметик полиамина, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, нацеливающий агент на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, например с клеткой почек. Нацеливающей группой могут быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок A, углевод муцина, 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, витамин A, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркаляторы (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин C), порфирины (TPPC4, тексапирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелатор (например, ЭДТА), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-O(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, O3-(олеоил)литохолевую кислоту, O3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и конъюгаты пептидов (например, пептид antennapedia, пептид Tat), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, полиамино, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), способствующие транспорту/всасыванию вещества (например, аспирин, витамин E, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридин-имидазол, Eu3+ комплексы тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять белки, например, гликопротеины или пептиды, например, молекулы со специфической аффинностью к колиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с конкретным типом клеток, таким как злокачественная клетка, эндотелиальная клетка или клетка костной ткани. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать не являющиеся пептидами молекулы, такие как липиды, пектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза или аптамеры. Лиганд может представлять, например, липополисахарид, активатор p38 MAP киназы или активатор NF-kB.

Лиганд может представлять вещество, например, лекарственное средство, которое может повышать поступление средства на основе иРНК в клетку, например, посредством разрушения цитоскелета клетки, например, посредством разрушения микротрубочек клетки, микрофиламентов и/или промежуточных микрофиламентов. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джасплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, присоединенный к иРНК, как здесь описано, функционирует в качестве модулятора фармакокинетики (модулятор ФК). Модуляторы ФК включают липофильные соединения, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие агенты, PEG, витамины и т.д. Примеры модуляторов ФК включают, не ограничиваясь этим, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Известно также, что олигонуклеотиды, содержащие ряд фосфоротиоатных связей, связываются с белком сыворотки крови, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды примерно из 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие несколько фосфоротиоатных связей в остове, также подходят для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, в качестве лигандов, модулирующих ФК). Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки крови (например, белки сыворотки крови), также подходят для применения в качестве лигандов, модулирующих ФК, в вариантах осуществления, описанных здесь.

Конъюгированные с лигандом олигонуклеотиды по изобретению можно синтезировать с использованием олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, например, полученную в результате присоединения связывающей молекулы к олигонуклеотиду (описанному ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид может непосредственно взаимодействовать с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируют, несущими любую из многочисленных защитных групп, или лигандами, которые имеют присоединенную к ним связывающую группу.

Олигонуклеотиды, используемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно

получить подходящим способом и общепринятой хорошо известной техникой твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза реализует несколько поставщиков, включая, например, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Дополнительно или альтернативно можно применять любые другие средства, известные в данной области, для такого синтеза. Также известно, что аналогичные методики используют для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

В конъюгированных с лигандом олигонуклеотидах и молекуле лиганда, несущей последовательность-специфические связанные нуклеозиды по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды можно синтезировать на подходящем синтезаторе ДНК с использованием стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов или предшественников нуклеотидных или нуклеозидных конъюгатов, которые уже несут линкерную группу, предшественников лиганда-нуклеотида или нуклеозида-конъюгата, которые уже несут молекулу лиганда или структурных блоков, несущих ненуклеозидный лиганд.

При использовании предшественников нуклеотидных конъюгатов, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез последовательность-специфических связанных нуклеозидов обычно завершается, и молекулу лиганда затем подвергают взаимодействию с линкерной группой с образованием олигонуклеотида, конъюгированного с лигандом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с использованием автоматического синтезатора с использованием фосфорамидитов, полученных из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и обычно используются в синтезе олигонуклеотидов.

А. Конъюгаты с липидами

В одном варианте осуществления лиганд или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида предпочтительно связывается с сывороточным белком, например человеческим сывороточным альбумином (HSA). Связывание лиганда с HSA обеспечивает распределение конъюгата в ткани-мишени, например, ткани-мишени организма, отличной от ткани почки. Например, ткань-мишень может представлять печень, включая паренхиматозные клетки печени. В качестве лигандов также можно использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать непроксин или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (a) повышать устойчивость конъюгата к деградации, (b) повышать направленную доставку или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану, и/или (c) его можно использовать для регуляции связывания с сывороточным белком, например, HSA.

Лиганд на основе липида можно использовать для модулирования, например, контроля связывания конъюгата с тканью-мишенью. Например, менее вероятно, что липид или лиганд на основе липида, который сильнее связывается с HSA, будет направлен на почку, и, таким образом, менее вероятно, что он будет выводиться из организма. Липид или

лиганд на основе липида, который слабее связывается с HSA, можно использовать для направленной доставки конъюгата в почку.

В предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывается с HSA. Предпочтительно он связывается с HSA с достаточной аффинностью, таким образом, что такой конъюгат предпочтительно распределяется в ткани, отличной от ткани почки. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не являлась настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида слабо связывается с HSA или не связывается совсем, таким образом, что конъюгат предпочтительно распределится в почке. Также можно использовать другие молекулы, которые обеспечивают направленную доставку в клетки почки, вместо лиганда на основе липида или в дополнение к нему.

В еще одном аспекте лиганд представляет молекулу, например, витамин, который поглощается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Такие молекулы являются особенно пригодными для лечения расстройств, характеризующихся нежелательной клеточной пролиферацией, например, злокачественного или незлокачественного типа, например, опухолевых клеток. Иллюстративные примеры витаминов включают витамин A, E и K. Другие иллюстративные витамины включают витамины B, например, фолиевую кислоту, B12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые клетками-мишенями, такими как клетки печени. Также включают HAS и липопротеин низкой плотности (LDL).

B. Средства, проникающие в клетку

В еще одном аспекте лиганд представляет собой средство, проникающее в клетку, предпочтительно спиральное средство, проникающее в клетку. Предпочтительно средство является амфипатическим. Иллюстративное средство представляет пептид, такой как tat или antennopedia. Если средство представляет пептид, то его можно модифицировать, включая пептидилмиметик, инвертромеры, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Спиральное средство предпочтительно представляет альфа-спиральное средство, которое предпочтительно содержит липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также обозначаемый здесь как олигопептидомиметик) представляет молекулу, способную сворачиваться в определенную трехмерную структуру, аналогичную природному пептиду. Связывание пептида и пептидомиметиков со средствами на основе иРНК может влиять на фармакокинетическое распределение иРНК, такое как повышение распознавания и поглощения клетками. Длина молекулы пептида или пептидомиметика может составлять примерно 5-50 аминокислот, например, примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептид или пептидомиметик может представлять, например, проникающий в клетку пептид, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например,

состоящий преимущественно из Tyr, Trp или Phe). Молекула пептида может представлять собой дендримерный пептид, пептид с ограниченной конформационной свободой или сшитый пептид. В другом альтернативном варианте осуществления молекула пептида может содержать гидрофобную последовательность мембранной транслокации (MTS). Иллюстративный пептид, содержащий гидрофобную MTS, представляет RFGF, содержащий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 2977). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP) (SEQ ID NO: 2978), содержащий гидрофобную MTS, также может представлять нацеливающую молекулу. Молекула пептида может представлять «транспортный» пептид, который может переносить крупные полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды, и белок через клеточные мембраны. Например, было установлено, что последовательности из белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ) (SEQ ID NO: 2979) и белка Drosophila antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK) (SEQ ID NO: 2980) могут функционировать в качестве транспортных пептидов. Пептид или пептидомиметик может кодироваться произвольной последовательностью ДНК, такой как пептид, идентифицируемый в библиотеке фагового дисплея или комбинаторной библиотеке одна гранула-одно соединение (OBOC) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примеры пептида или пептидомиметика, связанного со средством на основе дцРНК через встроенную мономерную единицу, представляет собой направленный на клетку пептид, такой как аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD)-пептид или миметик RGD. Длина молекулы пептида может находиться в диапазоне примерно от 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Молекулы пептида могут содержать такую структурную модификацию для повышения стабильности или непосредственно конформационных свойств. Можно использовать любую из описанных ниже структурных модификаций.

Пептид RGD для применения в композициях и способах по изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, для облегчения нацеливания на конкретную ткань(и). RGD-содержащие пептиды и пептидиомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические миметики RGD. Помимо RGD, можно использовать другие молекулы, нацеленные на лиганд интегрина. Предпочтительные конъюгаты этого лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

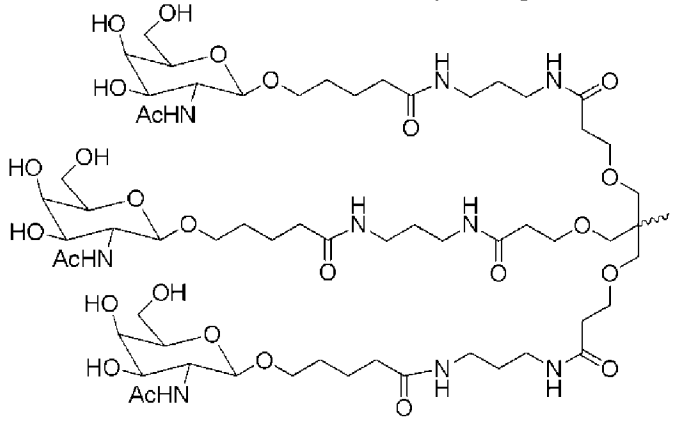
«Проникающий в клетку пептид» способен проникать в клетку, например, микробную клетку, такую как бактериальная или грибковая клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Проникающий в микробную клетку пептид может представлять собой, например, α-спиральный линейный пептид (например, LL-37 или церопин P1), содержащий дисульфидную связь пептид (например, α-дефензин, β-дефензин или бактенецин) или пептид, содержащий только одну или две преобладающих аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Проникающий в клетку пептид также содержит сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, проникающий в клетку пептид может представлять собой двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как

MPG, который получают из домена слитого пептида gp41 ВИЧ-1 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res., 31:2717-2724, 2003).

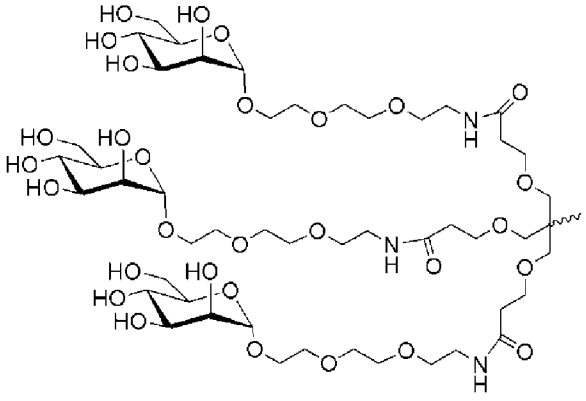
С. Коньюгаты с углеводами

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению олигонуклеотид иРНК дополнительно содержит углевод. иРНК, конъюгированная с углеводами, пригодна для доставки нуклеиновых кислот in vivo, а также для композиций, подходящих для терапевтического применения in vivo, как здесь описано. Как здесь используется, термин «углевод» относится к соединению, которое само по себе является углеводом, состоящим из одной или более моносахаридных единиц, содержащих не менее 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими) с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или соединение, имеющее в качестве своей части углеводную группу, состоящую из одной или более моносахаридных единиц, каждая из которых имеет по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных единиц) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают С5 и более (например, С5, С6, С7 или С8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара, содержащие две или три моносахаридных единицы (например, С5, С6, С7 или С8).

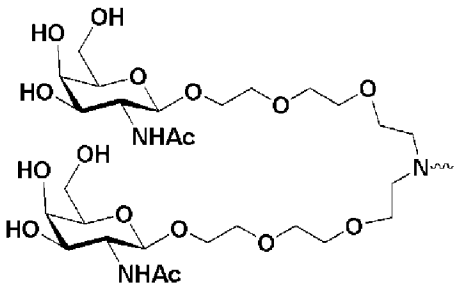
В одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из:



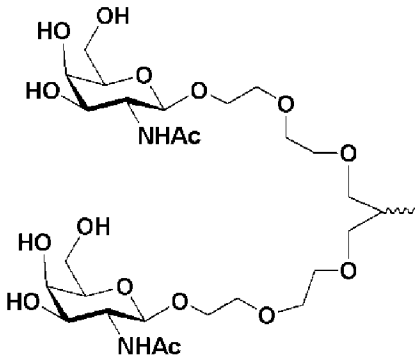
формула II,



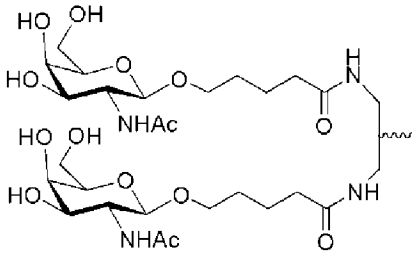
формула III,



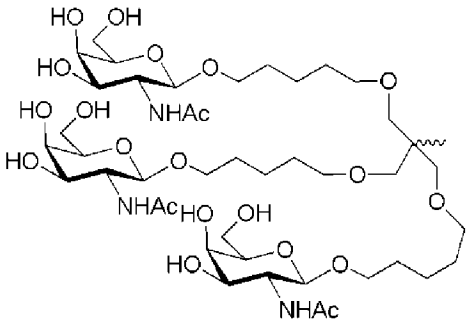
формула IV,



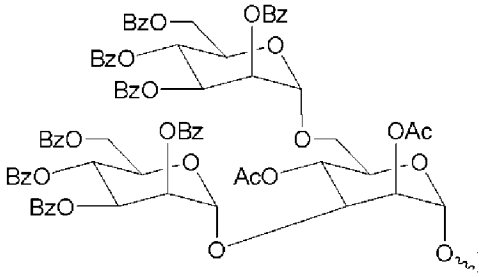
формула V,



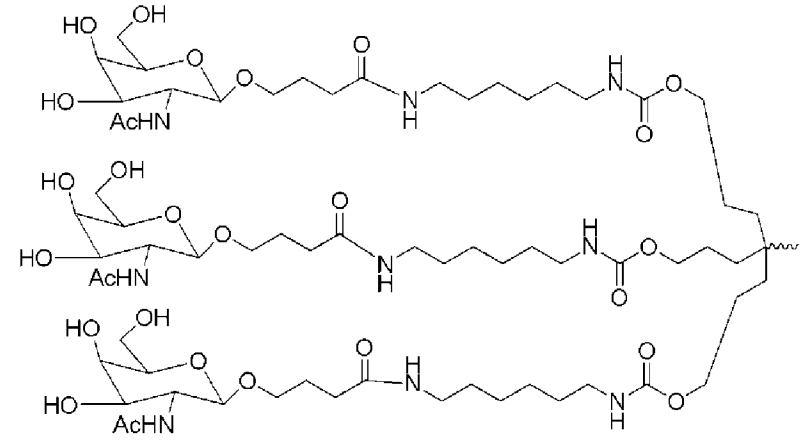
формула VI,



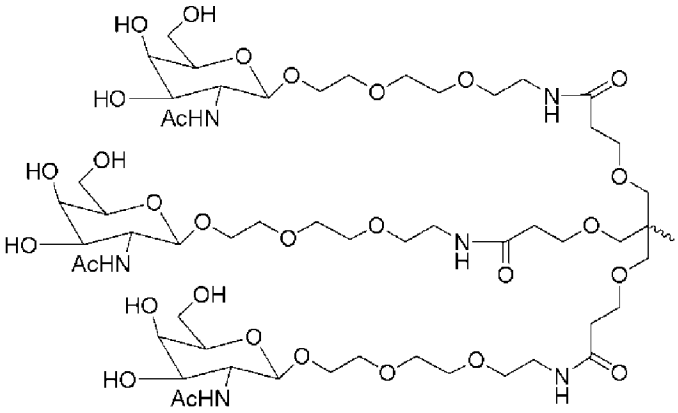
формула VII,



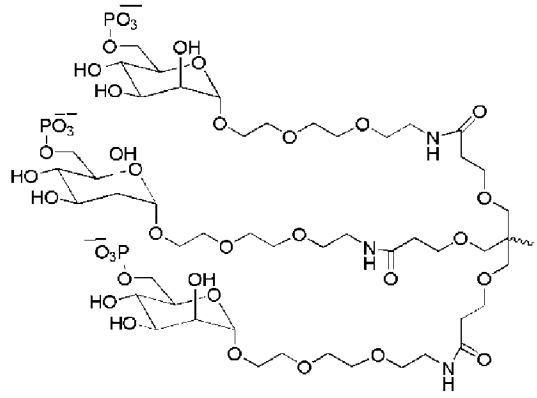
формула VIII,



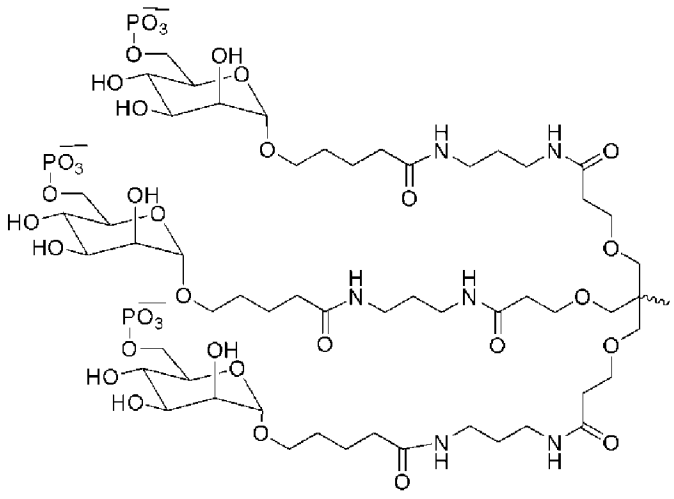
формула IX,



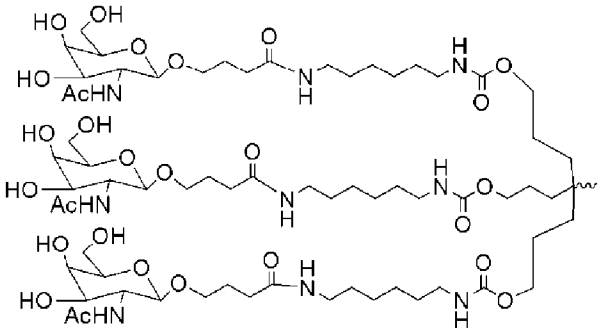
формула X,



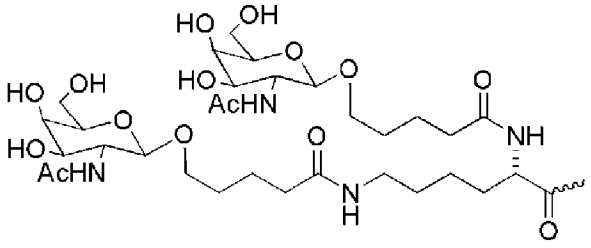
формула XI,



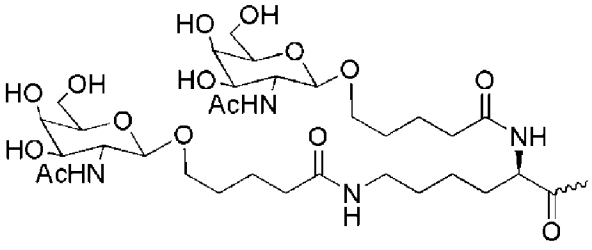
формула XII,



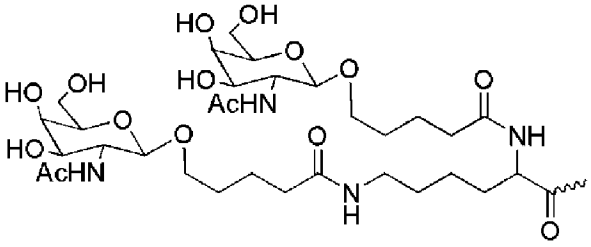
формула XIII,



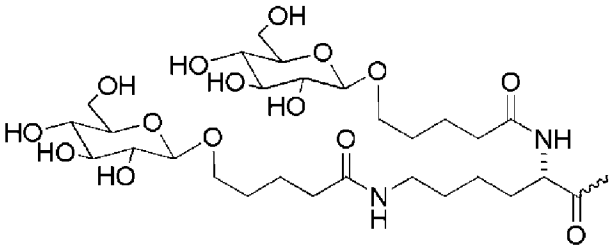
формула XIV,



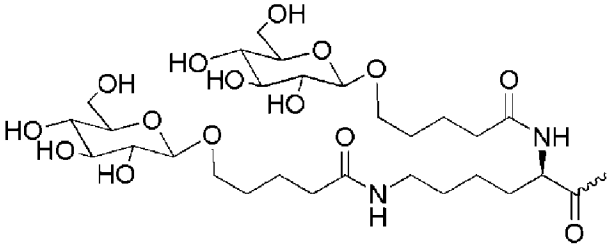
формула XV,



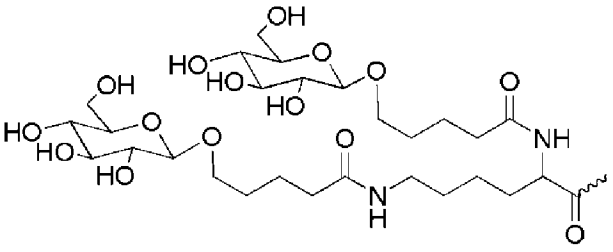
формула XVI,



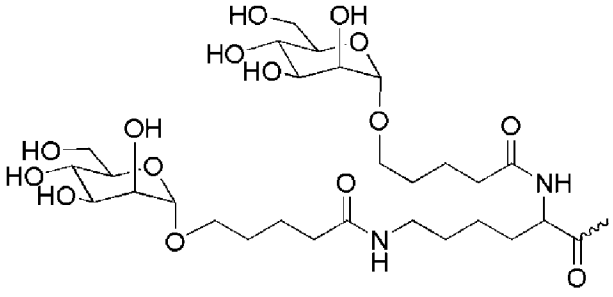
формула XVII,



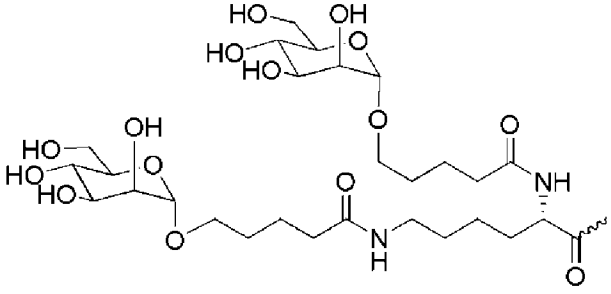
формула XVIII,



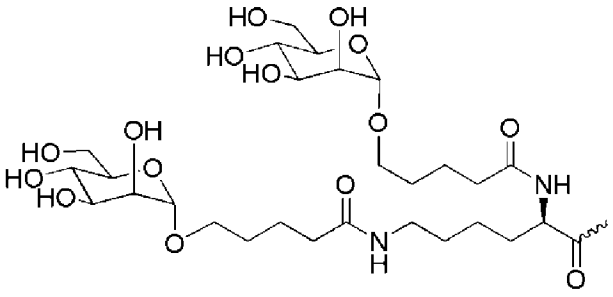
формула XIX,



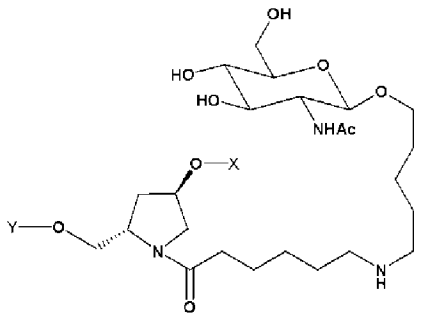
формула XX,



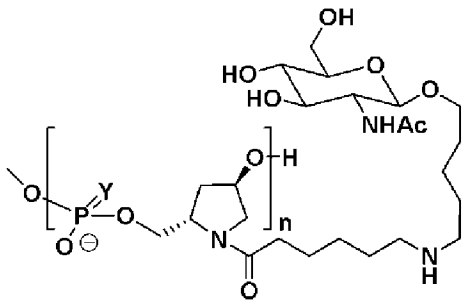
формула XXI,



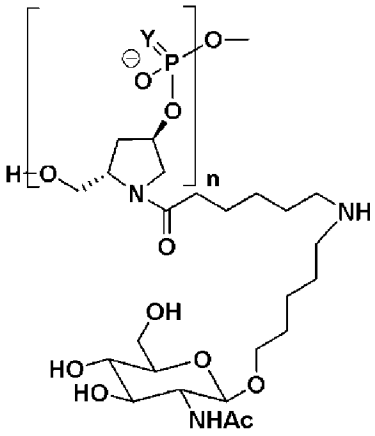
формула XXII,



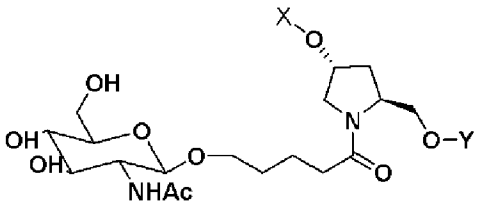
формула XXIII;



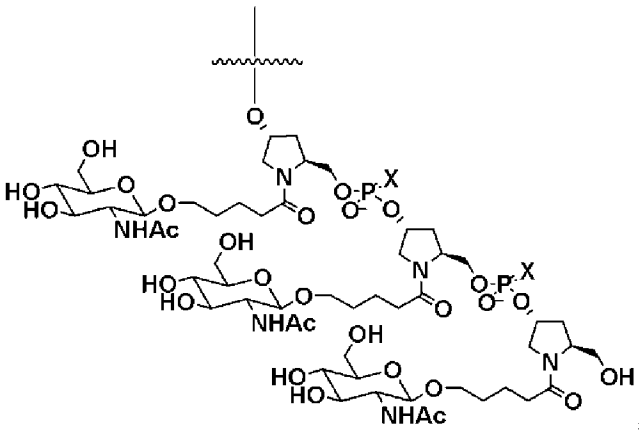
, где Y представляет O или S, и n равно 3-6 (формула XXIV);



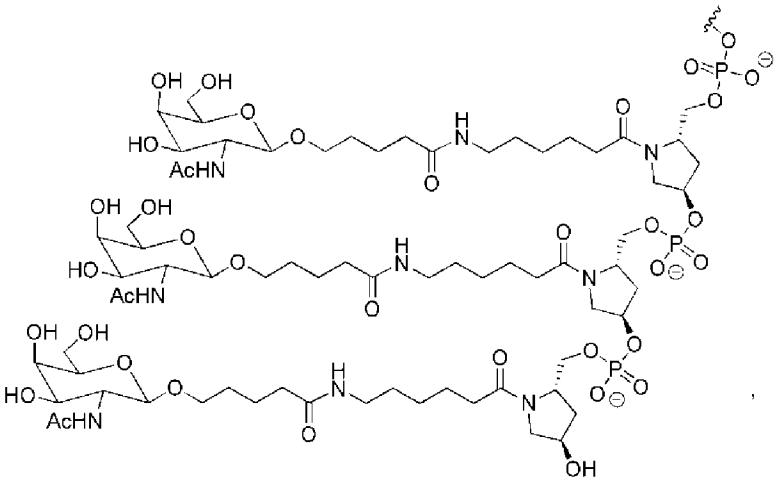
где Y представляет O или S, и n равно 3-6 (формула XXV);

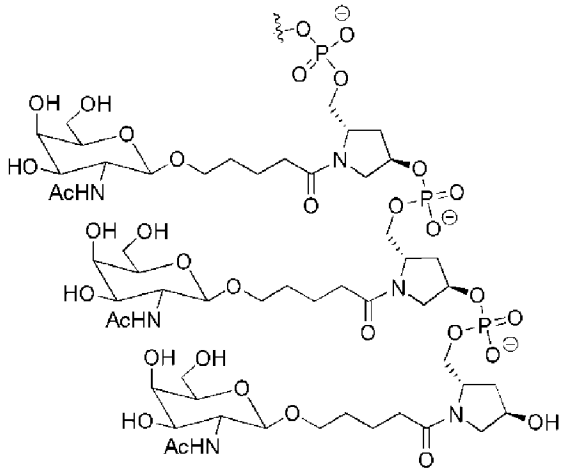


формула XXVI,

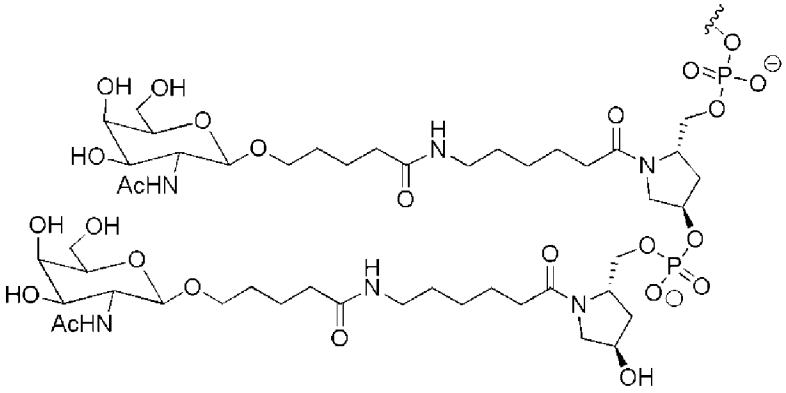


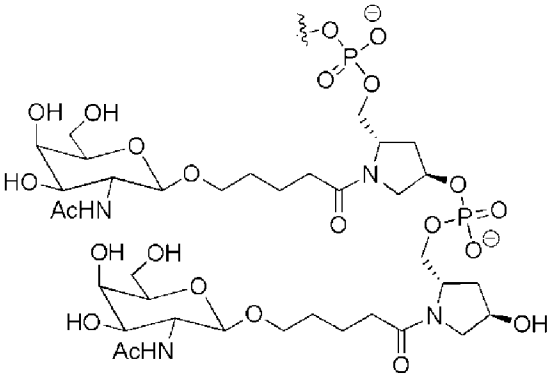
где X представляет O или S (формула XXVII);





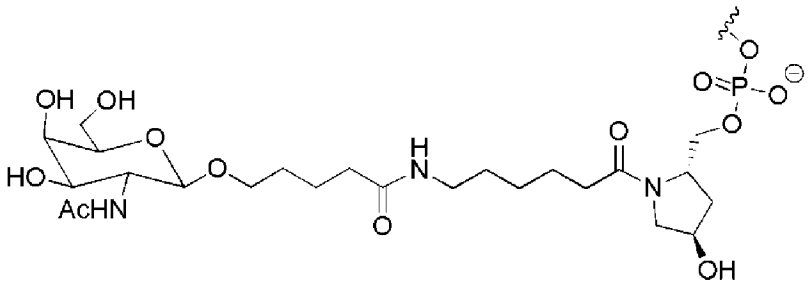
формула XXVIII; формула XXIX;



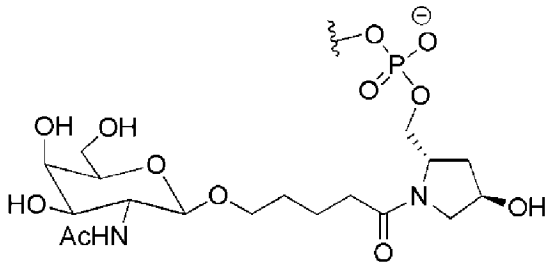


формула XXX;

формула XXXI;

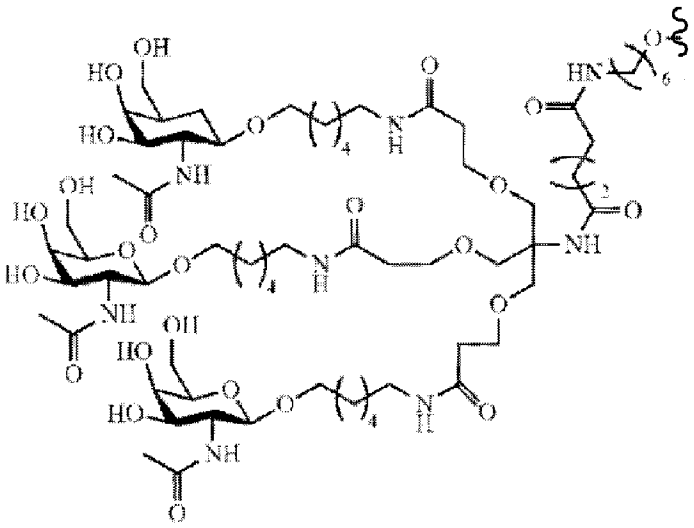


и



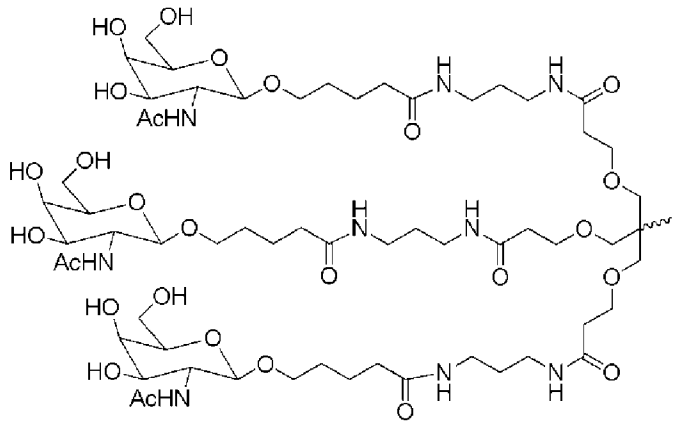
формула XXXII;

формула XXXIII.



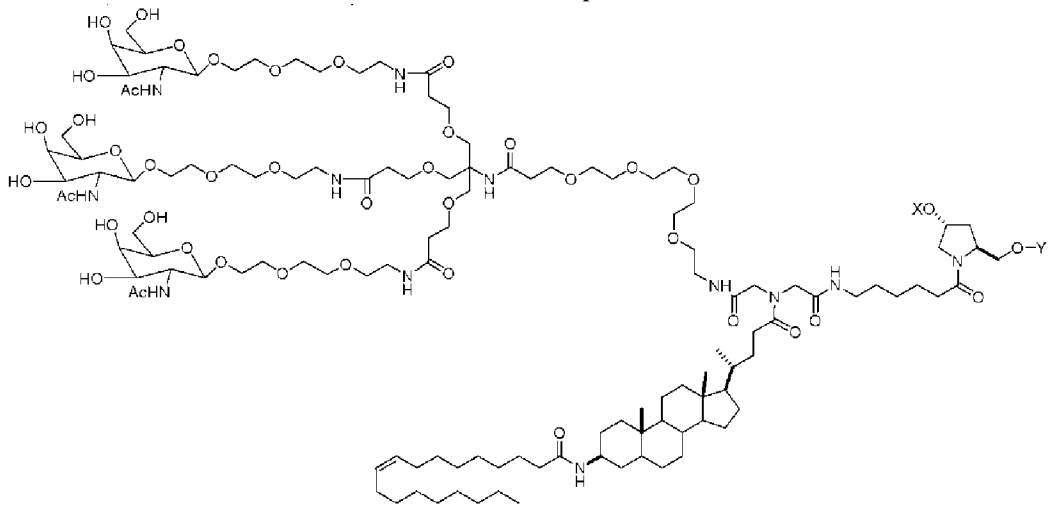
формула XXXIV.

В еще одном варианте осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по изобретению представляет моносахарид. В одном варианте осуществления моносахарид представляет N-ацетилгалактозамин, такой как:



формула II.

Еще один типичный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных здесь, включает, не ограничиваясь этим:



формула XXXVI,

где один из X или Y представляет олигонуклеотид, другой представляет атом водорода.

В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к средству на основе иРНК по настоящему изобретению через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединено к средству на основе иРНК по настоящему изобретению через двухвалентный линкер. В еще одних вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединено к средству на основе иРНК по изобретению через трехвалентный линкер.

В одном варианте осуществления двухцепочечные средства на основе иРНК по изобретению содержат одно производное GalNAc или GalNAc, присоединенное к средству на основе иРНК, например, на 3'- или 5'-конце смысловой цепи средства на основе дцРНК, как здесь описано. В еще одном варианте осуществления двухцепочечные средства на основе иРНК по изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) производных GalNAc или GalNAc, где каждое независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного средства на основе иРНК посредством множества одновалентных

линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи средства на основе иРНК по изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующая петлю шпильку, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, то каждый неспаренный нуклеотид в шпильке может независимо содержать производное GalNAc или GalNAc, присоединенное через моновалентный линкер.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, как описано выше, таких как, не ограничиваясь этим, модулятор ФК и/или проникающий в клетку пептид.

Дополнительные углеводные конъюгаты (и линкеры), подходящие для применения в настоящем изобретении, включают конъюгаты, описанные в публикациях PCT № WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанный здесь, может быть присоединен к олигонуклеотиду иРНК через различные линкеры, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин «линкер» или «линкерная группа» означает органическую группу, которая соединяет две части соединения, например, ковалентно связывает две части соединения. Линкеры обычно содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR8, C(O), C(O) NH, SO, SO2, SO2NH, или цепочку атомов, такую как, не ограничиваясь этим, замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где один или более метиленов могут прерываться или заканчиваться на O, S, S(O), SO2, N(R8), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероцикл; где R8 представляет собой атом водорода,

ацил, алифатическую группу или замещенную алифатическую группу. В одном варианте осуществления линкер содержит примерно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17 , 8-17, 6-16, 7-17 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет группу, которая является достаточно стабильной вне клетки, но которая при входе в клетку-мишень расщепляется с высвобождением двух фрагментом, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется по меньшей мере примерно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более или по меньшей мере примерно 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первом контрольном условии (которое может, например, быть выбрано для имитации или предоставления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при втором контрольном условии (которое может, например, быть выбрано для имитации или предоставления условий, обнаруженных в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы являются чувствительными к расщепляемым агентам, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или наличию деструктивных молекул. Как правило, расщепляющие агенты являются наиболее распространенными или содержатся на более высоких уровнях или с высокими активностями в клетках, чем в сыворотке или крови. Примеры таких деструктивных агентов включают: окислительно-восстановительное средство, которое выбирают для конкретных субстратов или которое не обладает субстратной специфичностью, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановители, такие как меркаптаны, содержащиеся в клетках, которые могут разрушать расщепляемую в окислительно-восстановительных условиях линкерную группу посредством восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые приводят к pH, равному 5 или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой линкерную группу, действуя как основная кислота, пептидазы (которые могут быть специфичными к субстрату) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к pH. pH человеческой сыворотки составляет 7,4, тогда как среднее внутриклеточного значение pH несколько ниже и находится в пределах 7,1-7,3. Эндосомы имеют более кислый pH в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более кислый pH примерно 5,0. Некоторые линкеры имеют расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном pH, высвобождая тем самым катионный липид из лиганда внутри клетки или в желаемый клеточный компартмент.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется определенным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, входящей в состав линкера, может зависеть от клетки-мишени. Например, лиганд, нацеленный на печень, может быть связан с катионным липидом через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и следовательно, линкер будет расщепляться

более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легких, коркового вещества почек и семенников.

Линкеры, содержащие пептидные связи, можно использовать при нацеливании на типы клеток, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В общем, пригодность расщепляемой линкерной группы-кандидата можно оценить тестированием способности деструктивного средства (или условия) расщеплять линкерную группу-кандидат. Также будет желательно тестировать расщепляемую линкерную группу-кандидат на способность выдерживать расщепление в крови или при контактировании с другой тканью, которая не является мишенью. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению между первым и вторым условием, где первое выбирают таким образом, чтобы оно являлось показателем расщепления в клетке-мишени и второе выбирают, чтобы оно являлось показателем расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке крови. Оценку можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культурах клеток, в органах или тканевых культурах или на животных. Пригодным может быть проведение предварительной оценки в бесклеточных условиях или в условиях культивирования, и полученные данные подтвердить проведением дополнительной оценки на животных. В предпочтительных вариантах осуществления пригодные соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях in vitro, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях in vitro, выбранных для имитации внеклеточных условий).

i. Расщепляемые в окислительно-восстановительных условиях линкерные группы

В одном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа представляет расщепляемую в окислительно восстановительных условиях линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой в восстановительных условиях линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является ли расщепляемая линкерная группа-кандидат подходящей «расщепляемой в восстановительных условиях линкерной группой» или, например, пригодной для использования с конкретной группой иРНК и конкретным средством направленной доставки, можно обратиться к способам, описанным здесь. Например, кандидата можно оценивать посредством инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстановителем с использованием известных в данной области реагентов, которые имитируют уровень расщепления, который наблюдают в клетке, например, в клетке-мишени. Кандидатов также можно оценивать в условиях, которые выбирают для имитации условий крови или сыворотки крови. В одном варианте осуществления соединения-кандидаты расщепляются не более чем примерно на 10% в крови. В других вариантах осуществления пригодные соединения-кандидаты разрушаются по меньшей мере примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в

клетке (или в условиях in vitro, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях in vitro, выбранных для имитации внеклеточных условий). Уровень расщепления соединений-кандидатов можно определить стандартными анализами ферментативной кинетики в условиях, выбиранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнить с условиями, выбиранными для имитации внеклеточной среды.

ii. Расщепляемые линкерные группы на основе фосфата

В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе фосфата. Расщепляемая линкерная группа на основе фосфата расщепляется агентами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, расщепляющего фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как клеточные фосфатазы. Примерами линкерных групп на основе фосфата являются: -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтителььынми вариантами осуществления являюются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительным вариантом осуществления является -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты можно оценить с использованием методов, аналогичных описанным выше.

iii. Расщепляемые кислотой линкерные группы

В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой линкерную группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с pH примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или такими агентами, как ферменты, которые могут функционировать как основная кислота. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать расщепляющую среду для расщепляемых кислотой линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотой линкерных групп включают, не ограничиваясь этим, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу -C=NN-, C(O)O или -OC(O). В предпочтительном варианте осуществления углерод, присоединенный к кислороду сложного эфира (алкоксигруппа), представляет арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Эти кандидаты можно оценить с использованием методов, аналогичных описанным выше.

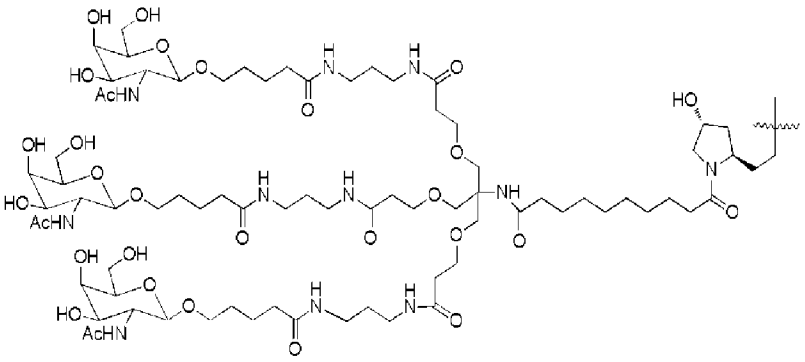
iv. Линкерные группы на основе сложного эфира. В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе сложного эфира. Расщепляемая линкерная группа на основе сложного эфира

расщепляется в клетках ферментами, такими как эстеразы и амидазы. Примеры расщепляемых линкерных групп на основе сложного эфира включают, не ограничиваясь этим, сложные эфиры алкилена, алкенилен и алкинилена. Расщепляемые линкерные группы на основе сложного эфира имеют общую формулу -C(O)O- или -OC(O)-. Эти кандидаты можно оценить с использованием методов, аналогичных описанным выше.

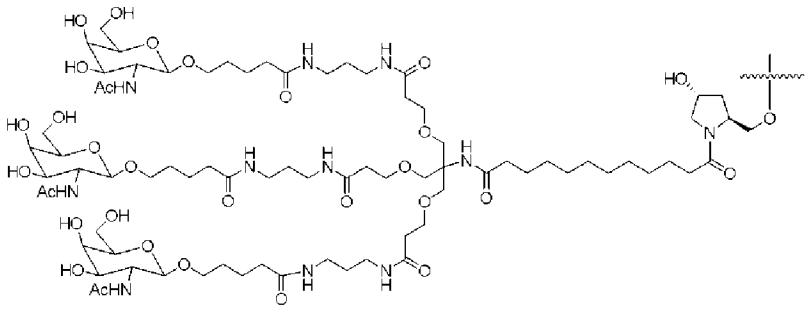
v. Расщепляемые группы на основе пептидов

В еще одном варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую линкерную группу на основе пептида. Расщепляемая линкерная группа на основе пептида расщепляется в клетке ферментами, такими как пептидазы и протеазы. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида представляют собой пептидные связи, образуемые между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептида не включают амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может образовываться между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образуемой между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида является, как правило, ограничивается пептидной связью (т.е. амидной связью), образуемой между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые линкерные группы на основе пептида имеют общую формулу -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB представляют собой группы R двух смежных аминокислот. Эти кандидаты можно оценить с использованием методов, аналогичных описанным выше.

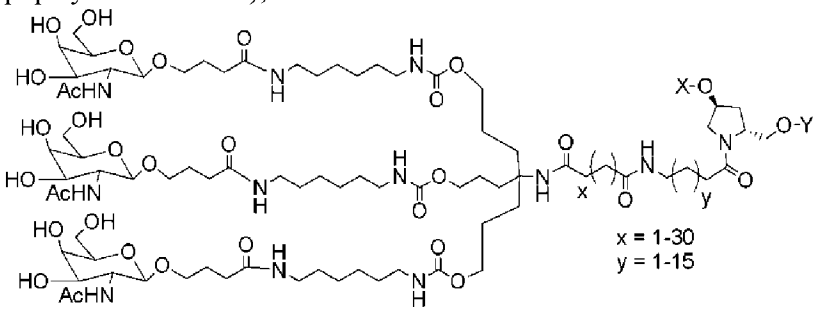
В одном из вариантов осуществления иРНК по изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов иРНК с линкерами в композициях и способах по изобретению включают, не ограничиваясь этим:



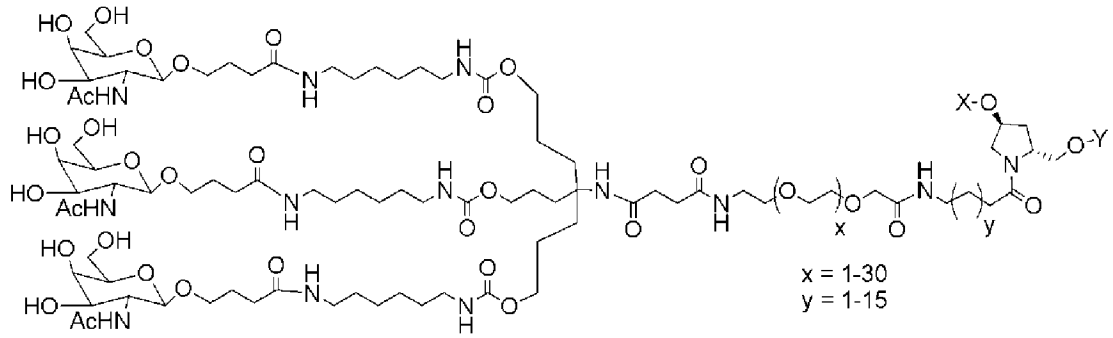
(формула XXXVII),



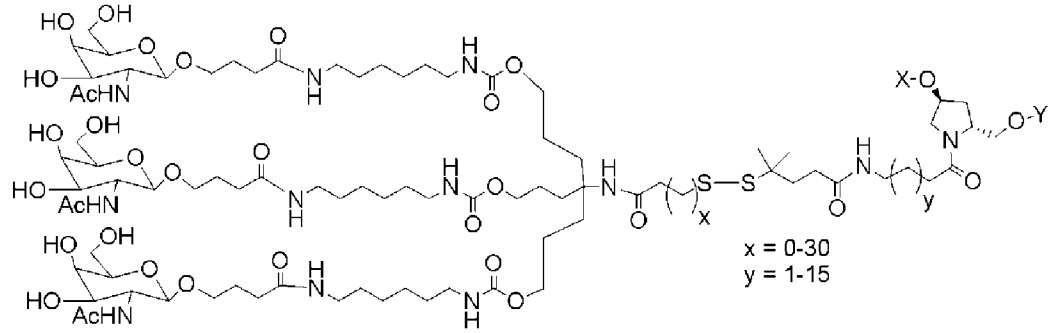
(формула XXXVIII),



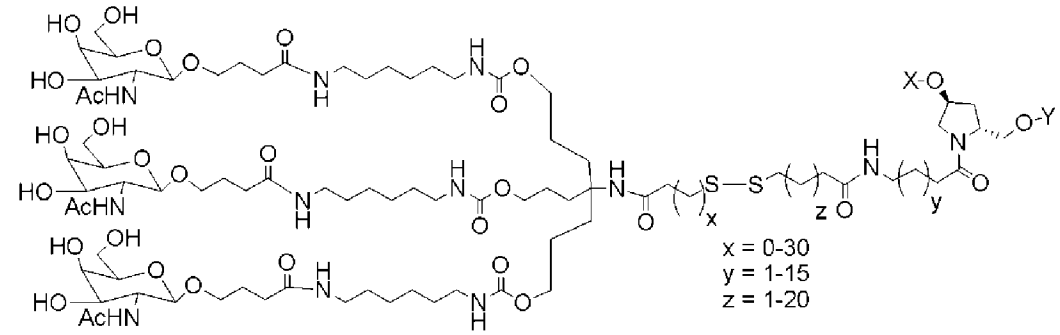
(формула XXXIX),



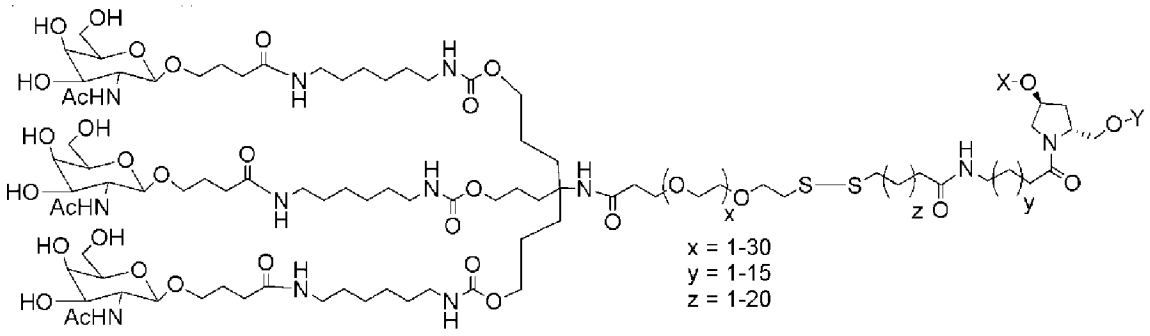
(формула XL),



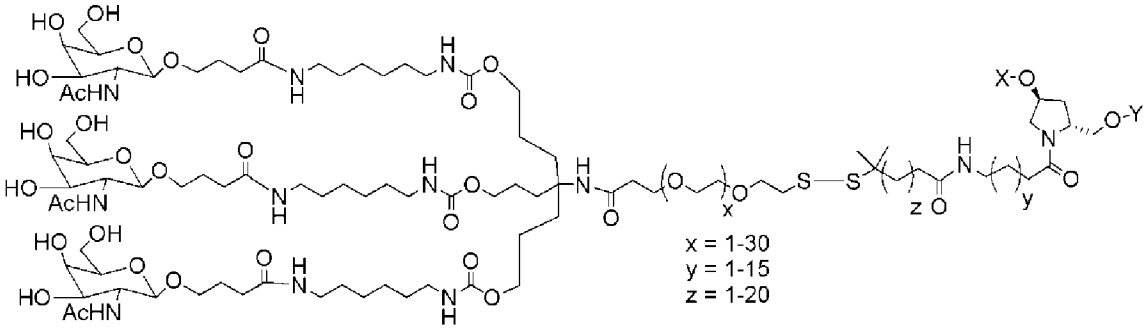
(формула XLI),



(формула XLII),



(формула XLIII), и

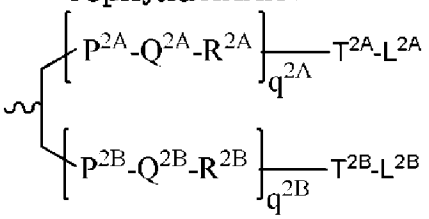


(формула XLIV), когда один из X или Y представляет олигонуклеотид, то другой представляет атом водорода.

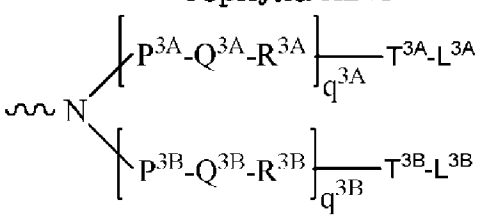
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет одно или более производных GalNAc (N-ацетилгалактозамина), присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

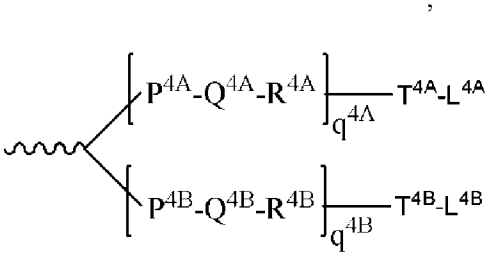
В одном варианте осуществления дцРНК по изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, представленных любой из формул (XLV)-(XLVI):

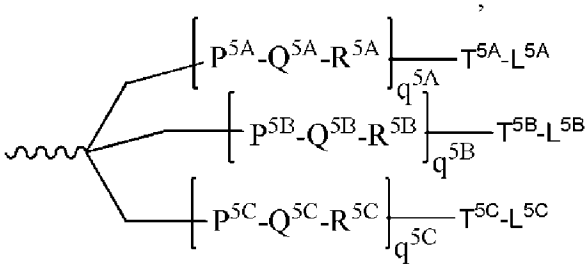
Формула XXXXV



Формула XLVI







Формула XLVII

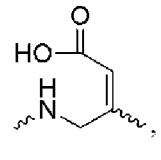
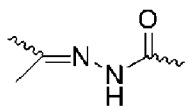
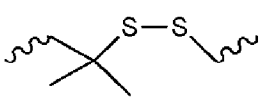
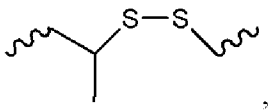
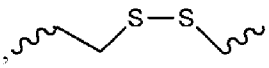
Формула XLVIII

где:

q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B и q5C независимо представляют в каждом случае 0-20, и где повторяющаяся единица может быть одинаковой или различной;

P2A, P2B, P3A, P3B, P4A, P4B, P5A, P5B, P5C, T2A, T2B, T3A, T3B, T4A, T4B, T4A, T5B, T5C каждый независимо в каждом случае отсутствует, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH2, CH2NH или CH2O;

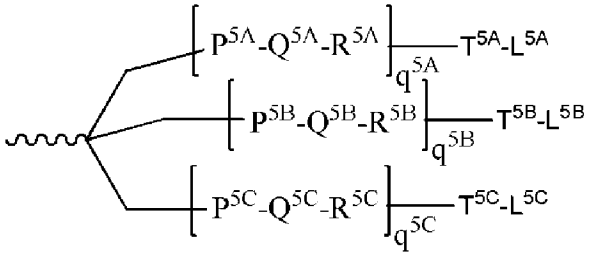
Q2A, Q2B, Q3A, Q3B, Q4A, Q4B, Q5A, Q5B, Q5C независимо в каждом случае отсутствуют, алкилен, замещенный алкилен, где один или более метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или более из O, S, S (O), SO2, N(RN), C(R')= C(R''), C≡C или C (O);

R2A, R2B, R3A, R3B, R4A, R4B, R5A, R5B, R5C каждый независимо в каждом случае отсутствует, NH, O, S, CH2, C(O)O, C(O)NH, NHCH(Ra)C(O), -C(O)-CH(Ra)-NH-, CO, CH=NO,  ,  ,  ,  ,  ,

или гетероциклил;

L2A, L2B, L3A, L3B, L4A, L4B, L5A, L5B и L5C представляют лиганд; т.е. каждый независимо в каждом случае моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и Ra представляет H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгированные производные GalNAc являются особенно пригодными для применения со средствами для РНКи для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как производные формулы (XLIX):

Формула XLIX

 ,

где L5A, L5B и L5C представляют моносахарид, такой как производное GalNAc.

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгированных с производными GalNAc, включают, не ограничиваясь этим, структуры, указанные выше в виде формул II, VII, XI, X и XIII.

Репрезентативные патенты США, которые описывают приготовление конъюгатов РНК, включают, не ограничиваясь этим, патенты США № 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717, 5580731; 5591584; 5109124; 5118802;

5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241, 5391723; 5416203, 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 и 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; 8106022, содержание каждого из которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

Необязательно, чтобы все положения в данном соединении были однородно модифицированы, и фактически более одной из вышеуказанных модификаций можно включить в одно соединение или даже в один нуклеозид в иРНК. Настоящее изобретение также включает соединения иРНК, которые являются химерными соединениями.

«Химерные» соединения иРНК или «химеры» в контексте настоящего изобретения представляют соединения иРНК, предпочтительно, дцРНК, которые содержат две или более химически отличные области, где каждая состоит по меньшей мере из одного мономерного звена, т.е. нуклеотида в случае соединения дцРНК. Такие иРНК, как правило, содержат по меньшей мере одну область, где РНК модифицируют таким образом, чтобы обеспечивать при повышенной устойчивости иРНК к разрушению нуклеазами повышенный захват клетками и/или повышенную аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью. Дополнительная область иРНК может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера РНКаза Н представляет клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Активация РНКазы Н, таким образом, приводит к расщеплению РНК-мишени, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования иРНК экспрессии гена. Таким образом, часто можно получить сравнимые результаты для более коротких иРНК, когда используют химерные дцРНК, по сравнению с фосфоротиоатными дезокси-дцРНК, гибридизующимися с аналогичной областью-мишенью. Расщепление РНК-мишени обычно можно детектировать электрофорезом в геле, и при необходимости ассоциированными методиками гибридизации нуклеиновых кислот, известными в данной области.

В определенных случаях РНК в иРНК можно модифицировать не относящейся к лигандам группой. Многие не относящиеся к лигандам молекулы конъюгировали с иРНК для повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения иРНК, и способы проведения таких конъюгаций являются доступными в научной литературе. Такие не относящиеся к лигандам группы включали липидные группы, такие как холестерин (Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2007, 365(1): 54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553), холевую кислоту (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4: 1053), тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan et al., Ann. NY Acad. Sci., 1992, 660: 306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3: 2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20: 533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10:

111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259: 327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49), фосфолипид, например дигексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-O-гексадецил-рац-глицеро-3-H-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18: 3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides , 1 995, 14: 969), или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36: 3651), пальмитиловую группу (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264: 229), или группу октадециламина или гексиламинокарбонилоксихолестерина (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277: 923). Репрезентативные патенты США, которые раскрывают получение таких конъюгатов РНК, приведены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих аминолинкер в одном или нескольких положениях последовательности. Затем аминогруппу подвергают взаимодействию с конъюгированной молекулой с использованием подходящих связывающих или активирующих реагентов. Реакцию конъюгации можно проводить либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после расщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

IV. Доставка иРНК по изобретению

Доставка иРНК по изобретению в клетку, например, в клетку в организме субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, например субъект, страдающий нарушением метаболизма липидов), может быть достигнута несколькими разными способами. Например, доставка может осуществляться посредством контактирования клетки с иРНК по изобретению in vitro или in vivo. Доставка in vivo также может быть осуществлена непосредственно введением субъекту композиции, содержащей иРНК, например, дцРНК. Альтернативно, доставка in vivo может осуществляться опосредованно введением одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. Эти альтернативы подробнее обсуждаются ниже.

В общем, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (in vitro или in vivo) можно адаптировать для применения с иРНК по изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian R.L. (1992) Trends Cell. Biol., 2 (5): 139-144 и WO94/02595, которые в полном объеме включены здесь посредством ссылки). Для доставки in vivo факторы, которые следует учитывать для доставки молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставляемой молекулы, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставленной молекулы в ткани-мишени. Неспецифические эффекты иРНК можно минимизировать посредством местного введения, например, прямой инъекцией или имплантацией в ткань или местным введением препарата. Локальное введение в место лечения максимизирует локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в противном случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы иРНК. Результаты нескольких исследований показали успешный нокдаун продуктов генов при локальном введении иРНК. Например, внутриглазная доставка дцРНК VEGF посредством интравитреальной инъекции обезьянам Cynomolgus

(Tolentino M.J., et al. (2004) Retina, 24: 132-138) и субретинальных инъекций мышам (Reich S.J. et al. (2003) Mol. Vis., 9: 210-216), как было показано, предотвращает неоваскуляризацию на экспериментальной модели возрастной макулярной дегенерации. Кроме того, прямая внутриопухолевая инъекция дцРНК мышам уменьшает объем опухоли (Pille J. et al. (2005) Mol. Ther., 11: 267-274) и может продлить выживаемость мышей с опухолью (Kim W.J. et al. (2006) Mol. Ther., 14:343-350; Li S. et al. (2007) Mol. Ther., 15: 515-523). Также было показано, что РНК-интерференция оказалась успешной при локальной доставке в ЦНС посредством прямой 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. USA, 101: 17270-17275; Akaneya Y. et al. (2005) J. Neurophysiol., 93: 594-602) и в легкие 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). Для системного введения иРНК для лечения заболевания РНК можно модифицировать или альтернативно доставить с использованием системы доставки лекарственного средства; оба подхода действуют для предупреждения быстрой деградации дцРНК эндо- и экзонуклеазами in vivo. Модификация РНК или фармацевтического носителя также может обеспечить нацеливание композиции иРНК на ткань-мишень и избежать нежелательных эффектов вне мишени. Молекулы иРНК можно модифицировать посредством химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для усиления поглощения клетками и предупреждения деградации. Например, иРНК, направленная против АроВ, конъюгированного с липофильной группой холестерина, вводили мышам системно и приводили к нокдауну мРНК apoB как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek J. et al. (2004) Nature, 432: 173-178). Было показано, что конъюгация иРНК с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регрессию опухоли на мышиной модели рака предстательной железы (McNamara J.O. et al. (2006) Nat. Biotechnol., 24: 1005-1015). В альтернативном варианте иРНК можно доставить с использованием систем, используемых для доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки облегчают связывание молекулы иРНК (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране, что обеспечивает эффективное поглощение иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры можно связать с иРНК или индуцировать образование везикулы или мицеллы (см., например, Kim S.H. et al. (2008) Journal of Controlled Release, 129 (2): 107-116), которые включают иРНК. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию иРНК при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов иРНК доступны специалистам 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 в полном объеме включены здесь посредством ссылки). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки

лекарственных средств, применимых для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen D.R. et al. (2003), выше; Verma U.N. et al. (2003), выше), олигофектамин, «твердые частицы нуклеиновая кислота-липид» (Zimmermann T.S. et al. (2006) Nature, 441:111-114), кардиолипин (Chien P.Y. et al. (2005) Cancer Gene Ther., 12:321-328; Pal A. et al. (2005) Int. J. Oncol., 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet M.E. et al. (2008) Pharm. Res. Aug 16 Epub ahead of print; Aigner A. (2006) J. Biomed. Biotechnol., 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu S. (2006) Mol. Pharm., 3:472-487), и 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 иРНК образует комплекс с циклодекстрином, пригодный для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который в полном объеме включен здесь посредством ссылки.

А. Кодируемые вектором иРНК по настоящему изобретению

иРНК, нацеленная на ген HSD17B13, может быть экспрессирована из единиц транскрипции, встроенных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture A. et al. TIG. (1996), 12: 5-10; Skillern, A. et al., публикация международной заявки PCT WO 00/22113, и Conrad, публикация PCT WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть транзиентной (продолжительностью от часов до недель) или продолжительной (от недель до месяцев или дольше), в зависимости от конкретной используемой конструкции и ткани-мишени или типа клетки. Эти трансгены можно ввести в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Также можно сконструировать трансген таким образом, чтобы обеспечить его наследственную передачу в виде внехромосомной плазмиды (Gassmann et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 1292).

Отдельная цепь или цепи иРНК могут быть транскрибированы с промотора экспрессионного вектора. Если две отдельные цепи должны быть экспрессированы для получения, например, дцРНК, то можно совместно ввести два отдельных экспрессионных вектора (например, трансфекцией или инфицированием) в клетку-мишень. Альтернативно каждая отдельная цепь дцРНК может транскрибироваться с промоторов, которые оба расположены в одной и той же экспрессионной плазмиде. В одном варианте осуществления дцРНК экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированными повторами, соединенными линкерной полинуклеотидной последовательностью, так что дцРНК имеет структуру стебля и петли.

Экспрессионные векторы иРНК обычно представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Экспрессионные векторы, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии иРНК, как здесь описано. Экспрессионные векторы для эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны из ряда коммерческих источников. Обычно обеспечиваются такие векторы, содержащие подходящие сайты рестрикции для вставки желаемого сегмента нуклеиновой кислоты.

Доставка векторов, экспрессирующих иРНК, может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в клетки-мишени, эксплантированные у пациента, с последующим повторным введением пациенту, или любыми другими способами, которые обеспечивают введение в желаемую клетку-мишень.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать с описанными здесь способами и композициями, включают, не ограничиваясь этим, (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая, не ограничиваясь этим, лентивирусные векторы, вирус мышиного лейкоза Молони и т.д.; (c) аденоассоциированные вирусные векторы; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV 40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы на основе поксвируса, такие как на основе ортопоксвируса, например, векторы на основе вакцинного вируса или вируса оспы птиц, например, оспы канареек или оспы-дифтерита птиц; и (j) зависимый от вируса-помощника или аденовирус с усеченным геномом. Также могут быть пригодными вирусы с дефектом репликации. Различные векторы встраиваются или не встраиваются в геном клеток. При желании конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. Альтернативно конструкцию можно включить в векторы, способные к эписомальной репликации, например векторы EPV и EBV. Для конструкций для рекомбинантной экспрессии иРНК, как правило, требуются регуляторные элементы, например промоторы, энхансеры и т.д., чтобы гарантировать экспрессию иРНК в клетках-мишенях. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, известны в данной области.

V. Фармацевтические композиции по изобретению

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают иРНК по изобретению. Следовательно, в одном варианте осуществления обеспечиваются фармацевтические композиции, содержащие средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК), которое ингибирует экспрессию 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, такой как клетка печени, где средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7; и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и указанная антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 7.

В еще одном варианте осуществления обеспечиваются фармацевтические композиции, содержащие средство на основе дцРНК, которое ингибирует экспрессию 17β-

гидроксистероиддегидрогеназ (HSD17B13) в клетке, такой как клетка печени, где средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая включает по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11, или 13; и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из любой из последовательностей антисмысловой цепи, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13.

Фармацевтические композиции, содержащие иРНК по изобретению, пригодны для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией или активностью гена HSD17B13, например, хронического фиброзно-воспалительного заболевания. Такие фармацевтические композиции формулируются в зависимости от способа доставки. Одним из примеров являются композиции, которые формулированы для системного введения посредством парентеральной доставки, например, внутривенной (IV), внутримышечной (IM) или подкожной доставки. Другим примером являются композиции, которые формулированы для прямой доставки в печень, например, инфузией в печень, например, непрерывной инфузией с использованием насоса. Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена HSD17B13. В общем, подходящая доза иРНК по изобретению будет находиться в диапазоне примерно от 0,001 до примерно 200,0 мг на кг массы тела реципиента в день, обычно в диапазоне примерно от 1 до 50 мг на кг массы тела в день. Обычно подходящая доза иРНК по изобретению будет находиться в диапазоне примерно от 0,1 мг/кг до примерно 5,0 мг/кг, предпочтительно примерно от 0,3 мг/кг до примерно 3,0 мг/кг. Режим с повторными введениями может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, через день или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят примерно один раз в неделю, один раз каждые 7-10 дней, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в 6 недель, один раз в 7 недель, один раз в 8 недель, один раз в 9 недель, один раз в 10 недель, один раз в 11 недель, один раз в 12 недель, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца (один раз в квартал), один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев или один раз в 6 месяцев.

После начальной схемы лечения лечение можно проводить реже.

Специалист в данной области понимает, что определенные факторы могут оказывать влияние на дозировку и время введения, которые требуются для эффективного лечения субъекта, включая, не ограничиваясь, тяжесть заболевания или расстройства, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие, и другие имеющиеся болезни. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократное лечение или серию курсов лечения. Установление эффективных доз и периодов полураспада in vivo для отдельных иРНК,

охватываемых изобретением, можно сделать с использованием обычных методологий или на основе тестирования in vivo с использованием соответствующей модели на животных, как здесь описано в других местах.

Достижения в генетике мышей позволили создать ряд мышиных моделей для изучения различных заболеваний человека, таких как заболевание, расстройство или патологическое состояние, ассоциированное с HSD17B13, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13. Такие модели можно использовать для тестирования иРНК in vivo, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Такие модели можно использовать для тестирования иРНК in vivo, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышиные модели известны в данной области и включают, например, мышей и крыс, которым скармливали рацион с высоким содержанием жиров (HFD; также называемый «западным» рационом), рацион с дефицитом метионина-холина (MCD) или рацион с высоким содержанием жиров (15%), рацион с высоким содержанием холестерина (1%) (HFHC), мышь с ожирением (ob/ob), содержащая мутацию в гене ожирения (ob) (Wiegman et al. (2003) Diabetes, 52: 1081-1089); мышь, содержащая гомозиготный нокаут рецептора LDL (LDLR-/-мышь; Ishibashi et al. (1993) J. Clin. Invest., 92 (2): 883-893); модель рацион-индуцированного атеросклероза на мышах (Ishida et al. (1991) J. Lipid. Res., 32: 559-568); модель на мышах с гетерозиготным нокаутом липопротеинлипазы (Weistock et al. (1995) J. Clin. Invest., 96 (6): 2555-2568); мышей и крыс, которым скармливали рацион с дефицитом холина, определенными L-аминокислотами и высоким содержанием жиров (CDAHFD) (Matsumoto et al. (2013) Int. J. Exp. Path., 94: 93-103); мышей и крыс, получавших рацион с высоким содержанием транс-жиров и холестерина (HTF-C) (Clapper et al. (2013) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 305: G483-G495); мышей и крыс, получавших рацион с высоким содержанием жиров, холестерина и солей желчных кислот (HF/HC/BS) (Matsuzawa et al. (2007) Hepatology, 46: 1392-1403); и мышей и крыс, получавших рацион с высоким содержанием жиров+фруктозы (30%) воды (Softic et al. (2018) J. Clin. Invest., 128 (1), 85-96).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, является ли желательным системное или местное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (например, посредством трансдермального пластыря), легочным, например, посредством ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, включая с помощью распылителя, внутритрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, интраперитонеальную или внутримышечную инъекцию или инфузию, подкожное, например, через имплантированное устройство, или интракраниальное, например, посредством интрапаренхиматозного, интратекального или внутрижелудочкового введения.

иРНК можно доставлять таким образом, чтобы обеспечивать направленную доставку в конкретную ткань, такую как печень (например, гепатоциты печени).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению подходят для внутримышечного введения субъекту. В еще одних вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению подходят для внутривенного введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции по изобретению подходят для подкожного введения субъекту, например, с использованием иглы 29 g или 30 g.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать средство для РНКи по изобретению в незабуференном растворе, таком как физиологический раствор или вода, или в забуференном растворе, таком как буферный раствор, содержащий ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению, например, такие как композиции, подходящие для подкожного введения, содержат средство для РНКи по настоящему изобретению в фосфатно-солевом буфере (PBS). Подходящие концентрации PBS включают, например, 1 мМ, 1,5 мМ, 2 мМ, 2,5 мМ, 3 мМ, 3,5 мМ, 4 мМ, 4,5 мМ, 5 мМ, 6,5 мМ, 7 мМ, 7,5 мМ, 9 мМ, 8,5 мМ, 9 мМ, 9,5 мМ или примерно 10 мМ PBS. В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит средство для РНКи по настоящему изобретению, растворенное в растворе примерно 5 мМ PBS (например, 0,64 мМ NaH_2PO_4, 4,36 мМ Na_2HPO_4, 85 мМ NaCl). Значения, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и значениям, также предназначены для включения в данное изобретение. Кроме того, предполагается включение диапазонов значений, использующих комбинацию любых из приведенных выше значений в качестве верхних и/или нижних пределов.

pH фармацевтических композиций по изобретению может составлять примерно от 5,0 до примерно 8,0, примерно от 5,5 до примерно 8,0, примерно от 6,0 до примерно 8,0, примерно от 6,5 до примерно 8,0, примерно от 7,0 до примерно 8,0, примерно от 5,0 до примерно 7,5, примерно от 5,5 до примерно 7,5, примерно от 6,0 до примерно 7,5, примерно от 6,5 до примерно 7,5, примерно от 5,0 до примерно 7,2, примерно от 5,25 до примерно 7,2, примерно от 5,5 до примерно 7,2, примерно от 5,75 до примерно 7,2, примерно от 6,0 до примерно 7,2, примерно от 6,5 до примерно 7,2 или примерно от 6,8 до примерно 7,2. Диапазоны и значения, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и значениям, также предназначены для включения в данное изобретение.

Осмоляльность фармацевтических композиций по изобретению может подходить для подкожного введения, например, не более примерно 400 мОсм/кг, например, от 50 до 400 мОсм/кг, от 75 до 400 мОсм/кг, от 100 до 400 мОсм/кг, от 125 до 400 мОсм/кг, от 150 до 400 мОсм/кг, от 175 до 400 мОсм/кг, от 200 до 400 мОсм/кг, от 250 до 400 мОсм/кг, от 300 до 400 мОсм/кг, от 50 до 375 мОсм/кг, от 75 до 375 мОсм/кг, от 100 до 375 мОсм/кг, от 125 до 375 мОсм/кг, от 150 до 375 мОсм/кг, от 175 до 375 мОсм/кг, от 200 до 375 мОсм/кг, от 250 до 375 мОсм/кг, от 300 до 375 мОсм/кг, от 50 до 350 мОсм/кг, от 75 до 350 мОсм/кг, от 100 до 350 мОсм/кг, от 125 до 350 мОсм/кг, от 150 до 350 мОсм/кг, от 175 до 350 мОсм/кг, от 200 до 350 мОсм/кг, от 250 до 350 мОсм/кг, от 50 до 325 мОсм/кг, от 75 до 325 мОсм/кг,

от 100 до 325 мОсм/кг, от 125 до 325 мОсм/кг, от 150 до 325 мОсм/кг, от 175 до 325 мОсм/кг, от 200 до 325 мОсм/кг, от 250 до 325 мОсм/кг, от 300 до 325 мОсм/кг, от 300 и 350 мОсм/кг, от 50 до 300 мОсм/кг, от 75 до 300 мОсм/кг, от 100 до 300 мОсм/кг, от 125 до 300 мОсм/кг, от 150 до 300 мОсм/кг, от 175 до 300 мОсм/кг, от 200 до 300 мОсм/кг, от 250 до 300, от 50 до 250 мОсм/кг, от 75 до 250 мОсм/кг, от 100 до 250 мОсм/кг, от 125 до 250 мОсм/кг, от От 150 до 250 мОсм/кг, от 175 до 350 мОсм/кг, от 200 до 250 мОсм/кг, например, примерно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 295, 300, 305, 310, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395 или примерно 400 мОсм/кг. Диапазоны и значения, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и значениям, также предназначены для включения в данное изобретение.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие средства для РНКи по настоящему изобретению, могут находиться во флаконе, который содержит примерно 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 или примерно 2,0 мл фармацевтической композиции. Концентрация средства для РНКи в фармацевтических композициях по настоящему изобретению может составлять примерно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 130, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 230, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 330, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 375, 380, 385, 390, 395, 400, 405, 410, 415, 430, 425, 430, 435, 440, 445, 450, 475, 480, 485, 490, 495 или примерно 500 мг/мл. В одном варианте осуществления концентрация средства для РНКи в фармацевтических композициях по изобретению составляет примерно 100 мг/мл. Значения, промежуточные по отношению к указанным выше диапазонам и значениям, также предназначены для включения в данное изобретение.

Фармацевтические композиции по изобретению могут содержать средство на основе дцРНК по изобретению в форме свободной кислоты. В других вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут содержать средство на основе дцРНК по настоящему изобретению в форме соли, такой как натриевая соль. В некоторых вариантах осуществления, когда средства на основе дцРНК по изобретению находятся в форме натриевой соли, то ионы натрия присутствуют в средстве в виде противоионов практически для всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиотатных групп, присутствующих в средстве. Средства, в которых по существу все фосфодиэфирные и/или фосфоротиоатные связи имеют противоион натрия, включают не более 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирных и/или фосфоротиоатных связей без противоиона натрия. В некоторых вариантах осуществления, когда средства на основе дцРНК по изобретению находятся в форме натриевой соли, то ионы натрия присутствуют в средстве в виде противоионов для всех фосфодиэфирных и/или фосфортиотатных групп, присутствующих в средстве.

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи,

жидкости и порошки. Обычные фармацевтические носители, водные, порошковые или масляные основы, загустители и т.п. могут быть необходимыми или желательными. Также пригодными могут быть презервативы с покрытием, перчатки и т.п. Подходящие составы для местного введения включают такие, в которых иРНК по изобретению находятся в смеси с агентом 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, диолеоилфосфатидилэтаноламин DOPE, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтаноламин DOTMA). иРНК по изобретению можно инкапсулировать в липосомы или можно формулировать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. Альтернативно, иРНК можно формулировать в виде комплекса с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, не ограничиваясь этим, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C1-20 алкиловый сложный эфир (например, изопропилмиристат IPM), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемые соль. Составы для местного введения подробно описаны в патенте США № 6747014, включенном здесь посредством ссылки.

А. Составы иРНК, содержащие мембранные молекулярные агрегаты

иРНК для применения в композициях и способах по изобретению можно формулировать для доставки в виде мембранного молекулярного агрегата, например липосомы или мицеллы. Помимо микроэмульсий, существует множество организованных структур поверхностно-активных веществ, которые были исследованы и используются для формуляции лекарственных препаратов. Они включают монослои, мицеллы, бислои и везикулы. Везикулы, такие как липосомы, вызывают большой интерес за счет их специфичности и продолжительности действия, которые они обеспечивают с точки зрения доставки лекарственных препаратов. Как здесь используется, термин «липосома» означает везикулу, состоящую из амфифильных липидов, расположенных в сферическом бислое или бислоях.

Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые содержат мембрану, образованную из липофильного вещества и водного содержимого. Водное пространство содержит композицию иРНК. Липофильное вещество отделяет водное содержимое от водной внешней среды, которая, как правило, не содержит композицию иРНК, хотя в некоторых примерах, может содержать. Катионные липосомы обладают тем

преимуществом, что они способны сливаться с клеточной стенкой. Некатионные липосомы, хотя и не способны так эффективно сливаться с клеточной стенкой, поглощаются макрофагами in vivo.

Для того, чтобы пройти через неповрежденную кожу млекопитающих, липидные везикулы должны пройти через ряд мелких пор, каждая диаметром менее 50 нм, под действием соответствующего трансдермального градиента. Следовательно, желательно использовать липосомы, которые обладают высокой способностью к деформации и могут проходить через такие мелкие поры.

Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к месту проявления действия. Поскольку липосомальная мембрана в структурном отношении похожа на биологические мембраны, то когда липосомы наносят на ткань, липосомы начинают сливаться с клеточными мембранами, и по мере того, как слияние липосомы и клетки прогрессирует, содержимое липосом доставляется в клетку, где активный агент может проявлять свое действие.

Липосомальные составы как способ доставки многих лекарственных препаратов были предметом обширных исследований. Появляется все больше доказательств того, что липосомы для местного применения обладают рядом преимуществ по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают снижение побочных эффектов, связанных с высокой системной абсорбцией введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в желаемой мишени и возможность вводить широкий ряд лекарственных препаратов, как гидрофильных, так и гидрофобных, в кожу.

В нескольких публикациях подробно описана способность липосом доставлять агенты, включая высокомолекулярную ДНК, в кожу. Соединения, включая анальгетики, антитела, гормоны и высокомолекулярные ДНК, вводились в кожу. Большинство применений было направлено на верхний эпидермис.

Липосому, содержащую средство для РНКи, можно получить различными способами. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте таким образом, чтобы получить мицеллы с липидным компонентом. Например, липидный компонент может представлять амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может обладать высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионногенным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат средства для РНКи затем добавляют в мицеллы, которые содержат липидный компонент. Катионные группы на липиде взаимодействуют со средством для РНКи и конденсируются вокруг средства для РНКи с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, диализом, с получением липосомального препарата средства для РНКи.

При необходимости можно добавить соединение-носитель, которое способствует конденсации, во время реакции конденсации, например, посредством контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может представлять полимер, отличный от

нуклеиновой кислоты (например, спермин или спермидин). pH также можно корректировать, чтобы поддерживать конденсацию.

Способы получения стабильных носителей для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов носителя для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, содержание которой в полном объеме включено здесь посредством ссылки. Получение липосом также может включать один или более аспектов иллюстративных способов, описанных в публикации Felgner P.L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8:7413-7417; в патенте США № 4897355, патенте США № 5171678; публикациях Bangham et al. (1965) M. Mol. Biol., 23:238; Olson et al. (1979) Biochim. Biophys. Acta, 557:9; Szoka et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 4194; Mayhew et al. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 775:169; Kim et al. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 728:339 и Fukunaga et al. (1984) Endocrinol 115:757. Широко используемые методики получения липидных агрегатов подходящего размера для применения в качестве носителей для доставки включают обработку ультразвуком и замораживание-оттаивание плюс экструзия (см., например, Mayer et al. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 858:161. Можно использовать микрофлюидизацию, когда желательны сопоставимо небольшие (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew et al. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 775:169. Эти способы можно легко адаптировать для упаковки препаратов средства для РНКи в липосомы.

Липосомы подразделяются на два обширных класса. Катионные липосомы представляют положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновой кислоты с образованием стабильного комплекса. Комплексы положительно заряженной нуклеиновой кислоты/липосомы связываются с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализуются в эндосому. За счет кислого pH в эндосоме липосомы разрушаются, высвобождая свое содержимое в цитоплазму клетки (Wang et al. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun., 147:980-985).

Липосомы, которые являются чувствительными к pH или отрицательно заряженными, лучше захватывают нуклеиновые кислоты, чем комплекс с ними. За счет того, что нуклеиновая кислота и липид обладают одинаковым зарядом, чаще происходит отталкивание, чем образование комплекса. Однако некоторое количество нуклеиновой кислоты захватывается в водное пространство таких липосом. Чувствительные к pH липосомы использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы в клеточные монослои в культуре. Экспрессию экзогенного гена детектировали в клетках-мишенях (Zhou et al. (1992) Journal of Controlled Release, 19:269-274).

Один из основных типов липосомальной композиции включает фосфолипиды, отличные от природного фосфатидилхолина. Нейтральные липосомальные композиции, например, можно получить из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомальные композиции, как

правило, получают из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные способствующие слиянию липосомы получают преимущественно из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомальной композиции получают из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, соевый PC и яичный PC. Другой тип получают из смеси фосфолипида и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

Примеры других методов введения липосом в клетки in vitro и in vivo включают патенты США № 5283185 и 5171678; международные заявки WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; публикации Felgner 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 неионные липосомальные системы для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомальные составы, содержащие NovasomeTMI (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и NovasomeTMII (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина A в дерму кожи мышей. Результаты опытов свидетельствовали о том, что такие неионные липосомальные системы были эффективными в обеспечении депонирования циклоспорина A в различных слоях кожи (Hu et al. (1994) S.T.P.Pharma. Sci., 4(6):466).

Липосомы также включают «стерически стабилизованные» липосомы, термин, который, как здесь его используют, относится к липосомам, содержащим один или более специализированных липидов, которые при введении в липосомы, приводят к увеличению времени существования в кровяном русле по сравнению с липосомами, не содержащими такие специализированные липиды. Примеры стерически стабилизованных липосом представляют такие, в которых часть образующей везикулы липидной фракции липосомы (A) содержит один или более гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид GM1, или (B) дериватизируют с использованием одного или более гидрофильных полимеров, таких как группа полиэтиленгликоля (PEG). Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией в данной области, предполагаетсят, что по меньшей мере для стерически стабилизованных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-дериватизированные липиды, повышенное время полусущесвования в кровяном русле этих стерически стабилизованных липосом возникает в результате пониженного поглощения клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al. (1987) FEBS Letters, 223:42; Wu et al. (1993) Cancer Research, 53:3765).

В данной области известны различные липосомы, содержащие один или более гликолипидов. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci. (1987), 507:64) описали способность моносиалоганглиозида GM1, сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полусуществования липосом в крови. Эти открытия интерпретировали Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988), 85,:6949). В

патенте США № 4837028 и международной заявке WO 88/04924, авторы обоих Allen et al., описаны липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид GM1 или сложный эфир сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) описаны липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, описаны в международной заявке WO 97/13499 (Lim et al.).

В некоторых вариантах осуществления используют катионные липосомы. Катионные липосомы обладают тем преимуществом, что они способными сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, несмотря на то, что они неспособны сливаться так эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами in vivo, и их можно использовать для доставки средств для РНКи в макрофаги.

Дополнительные преимущества липосом включают: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразлагаемыми, в липосомы можно инкапсулировать широкий диапазон водорастворимых и липидорастворимых лекарственных средств, липосомы могут защищать инкапсулированные средства для РНКи в своих внутренних компартментах от метаболизма и деградации (Rosoff, в «Pharmaceutical Dosage Forms», Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторы, которые следует рассматривать при приготовлении липосомальных составов, являются поверхностный заряд липидов, размер везикул и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N, N, N-триметиламмонийхлорид (DOTMA) можно использовать для получения небольших липосом, которые спонтанно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны к слиянию с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры тканей, приводя к доставке средства для РНКи (для описания DOTMA и его использования с ДНК см., например, публикацию Felgner P.L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8:7413-7417 и патент США № 4897355).

Аналог DOTMA 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP) можно использовать в комбинации с фосфолипидом для получения образующих комплекс с ДНК везикул. ЛипофектинТМ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) представляет эффективное средство для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в живые клетки культуры тканей, которые содержат положительно заряженные липосомы DOTMA, которые спонтанно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Когда используют достаточно положительно заряженные липосомы, то общий заряд на получаемых комплексах также является положительным. Положительно заряженные комплексы, получаемые таким образом, спонтанно 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, Indianapolis, Indiana) отличается от DOTMA тем, что олеоиловые группы

связаны сложноэфирными связями, а не простыми эфирными связями.

Другие описанные соединения на основе катионных липидов включают такие, которые конъюгировали с различными группами, включая, например, карбоксиспермин, который конъюгировали с одним из двух типов липидов, и включают соединения, такие как 5-карбоксиспермилглициндиоктаолеоиламид («DOGS») (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин 5-карбоксиспермиламид («DPPES») (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат катионных липидов включает дериватизацию липида с холестерином («DC-Chol»), который можно формулировать в липосомы в комбинации с DOPE (см., Gao X. and Huang L. (1991) Biochim. Biophys. Res. Commun., 179:280). Сообщалось, что липополилизин, полученный конъюгацией полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки крови (Zhou X. et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta, 1065:8). На определенных клеточных линиях показано, что эти липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем композиции, содержащие DOTMA. Другие коммерчески доступные продукты катионных липидов включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомальные составы являются особенно подходящими для местного введения, липосомы обеспечивают несколько преимуществ перед другими составами. Такие преимущества включают пониженные побочные эффекты, связанные с высоким системным всасыванием введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в желаемой мишени и возможность вводить средство для РНКи в кожу. В некоторых осуществлениях липосомы используют для доставки средства для РНКи в эпидермальные клетки, а также для повышения проникновения средства для РНКи в дермальные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно наносить местно. Сообщалось о местной доставке лекарственных средств, формулированных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner et al. (1992) Journal of Drug Targeting, vol. 2,405-410 и du Plessis et al. (1992) Antiviral Research, 18:259-265; Mannino R.J. and Fould-Fogerite S. (1998) Biotechniques, 6:682-690; Itani T. et al. (1987) Gene, 56:267-276; Nicolau C. et al. (1987) Meth. Enzymol., 149:157-176; Straubinger R.M. and Papahadjopoulos D. (1983) Meth. Enzymol., 101:512-527; Wang C.Y. and Huang L. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7851-7855).

Неионные липосомальные системы также исследовали для определения их пригоднос для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомальные составы, содержащие NovasomeTM I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и NovasomeTM II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) использовали для доставки лекарственного средства в дерму кожи

мыши. Такие составы со средством для РНКи являются пригодными для лечения дерматологического заболевания.

Липосомы, которые содержат иРНК, можно получить в высокой степени деформируемыми. Такая способность к деформации может обеспечивать проникновение липосом через пору, радиус которой меньше, чем средний радиус липосомы. Например, трансферсомы представляют тип деформируемых липосом. Трансферсомы можно получить, добавляя активаторы поверхности раздела фаз поверхность, как правило, поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомальной композиции. Трансферсомы, которые содержат средство для РНКи, можно доставлять, например, подкожно посредством инфекции с целью доставки средства для РНКи в кератиноциты в коже. Для прохождения через интактную кожу млекопитающих липидные везикулы должны проходить через ряд мелких пор, каждая с диаметром менее 50 нм, под влиянием соответствующего трансдермального градиента. Кроме того, за счет липидных свойств, такие трансферсомы могут являться самооптимизирующимися (адаптированными к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и могут многократно достигать свои мишени без фрагментации и часто являются самонагружаемыми.

Другие составы, подходящие для настоящего изобретения, описаны в международной заявке WO 2008/042973.

Трансферсомы представляют еще один тип липосом и являются высоко деформируемыми липидными агрегатами, которые являются привлекательными кандидатами для доставки носителей лекарственных средств. Трансферсомы можно описать как липидные капли, которые являются настолько высоко деформируемыми, что они могут легко проникать через поры, которые меньше чем капля. Трансферсомы адаптируются к среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (адаптированными к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и могут многократно достигать свои мишени без фрагментации и часто являются самонагружаемыми. Для получения трансферсом необходимо добавлять активаторы раздела фаз поверхности, как правило, поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомальной композиции. Трансферсомы использовали для доставки сывороточного альбумина в кожу. Было показано, что опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина является такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

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

Если молекула поверхностно-активного вещества не является ионизированной, ее классифицируют как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах и являются применимыми в широком диапазоне значений pH. Как правило, их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до примерно 18 в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные эфиры глицерина, сложные эфиры полиглицерина, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Также к этому классу относятся неионные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-полимеры. Поверхностно-активные вещества на основе полиоксиэтилена являются наиболее известными членами класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд, когда ее растворяют или диспергируют в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионогенное. Анионогенные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтауураты и сульфосукцинаты и фосфаты. Наиболее важные члены класса анионогенных поверхностно-активных веществ представляют собой алкилсульфаты и мыла.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд, когда ее растворяют или диспергируют в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионогеннное. Катионогенные поверхностно-активные вещества включают соли четвертичного аммония и этоксилированные амины. Соли четвертичного аммония представляют наиболее используемые члены этого класса.

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

Описано применение поверхностно-активных веществ в лекарственных продуктах, составах и в эмульсиях (Rieger, в Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

иРНК для применения в способах по изобретению также можно обеспечивать в виде мицеллярных составов. «Мицеллы» определяют здесь как конкретный тип молекулярного агрегата, в котором амфипатические молекулы располагаются в виде сферической структуры таким образом, что все гидрофобные участки молекул направлены внутрь, оставляя гидрофильный участки в контакте с окружающей водной фазой. Если окружающая среда является гидрофобной, то имеет месо обратное расположение.

Смешанные мицеллярные составы, подходящие для доставки через трансдермальные мембраны, можно получить смешиванием водного раствора композиции миРНК, С8-С22алкилсульфата щелочного металла и образующего мицеллы соединения. Иллюстративные соединения, образующие мицеллы, включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолауораты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланилглицин и их фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, полидоканолалкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Соединения, образующие мицеллы, можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы получают по существу при любом типе перемешивания ингредиентов, но при интенсивном перемешивании для обеспечения меньшего размера мицелл.

В одном способе готовят первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию миРНК и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Затем первую мицеллярную композицию смешивают по меньшей мере с тремя соединениями, образующими мицеллы, с получением смешанной мицелярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают смешиванием композиции миРНК, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из соединений, образующих мицеллы, с последующим добавлением оставшихся соединений, образующих мицеллы, при энергичном перемешивании.

Для стабилизации состава и защиты от роста бактерий к смешанной мицеллярной композиции можно добавить фенол и/или мета-крезол. Альтернативно, фенол и/или мета-крезол можно добавить совместно с ингредиентами, образующими мицеллы. Также можно добавлять средство для придания изотоничности, такое как глицерин, после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав можно поместить в аэрозольный дозатор, и заполнить диспенсер пропеллентом. Пропеллент, который находится под давлением, содержатся в жидкой форме в дозаторе. Соотношения ингредиентов корректируют таким образом, чтобы водная фаза и фаза пропеллента становились одной, т.е. имеет место одна фаза. Если имеют место две фазы, то необходимо встряхивать дозатор перед дозированием части содержимого, например, через дозирующий клапан. Дозируемую дозу фармацевтического средства проталкивают через дозирующий клапан в виде тонкодисперсного спрея.

Пропелленты могут включать водород-содержащие хлорфторуглероды, водород-содержащие фторуглероды, простой диметиловый эфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно использовать HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов можно определить относительно простым экспериментированием. Для всасывания через ротовую полость, часто желательно повысить, например по меньшей мере вдвое или втрое, дозу для прямой инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

B. Липидные частицы

иРНК, например, средства на основе дцРНК по изобретению, можно полностью инкапсулировать в липидный состав, например LNP, или другую частицу нуклеиновая кислота-липид.

Как здесь используется, термин «LNP» относится к стабильной частице липид-нуклеиновая кислота. LNP обычно содержат катионный липид, некатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частицы (например, конъюгат ПЭГ-липид). LNP очень пригодны для системного применения, поскольку они демонстрируют увеличенный период полусуществования в кровотоке после внутривенной (в/в) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, местах, физически отделенных от места введения). Как здесь используется, термин «SPLP» относится к частице нуклеиновая кислота-липид, содержащей плазмидную ДНК, инкапсулированную в липидную везикулу. LNP включают «pSPLP», которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, как описано в публикации PCT № WO 00/03683. Частицы по настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр примерно от 50 нм до примерно 150 нм, более типично примерно от 60 нм до примерно 130 нм, более типично примерно от 70 нм до примерно 110 нм, наиболее типично примерно от 70 нм до примерно 90 нм, и они являются по существу нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда они присутствуют в частицах нуклеиновая кислота-липид по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к расщеплению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения описаны, например, в патентах США № 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; и публикации PCT WO 96/40964.

в некоторых вариантах осуществления отношение липида к лекарственному средству (отношение мас./мас.) (например, отношение липида к дцрнк) будет находиться в диапазоне примерно от 1:1 до примерно 50:1, примерно от 1:1 до примерно 25:1, примерно от 3:1 до примерно 15:1, примерно от 4:1 до примерно 10:1, примерно от 5:1 до примерно 9:1 или примерно от 6:1 до примерно 9:1. предусматривается, что диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам, также являются частью изобретения.

Катионный липид может представлять, например, N, N-диолеил-N, N-диметиламмоний хлорид (DODAC), N, N-дистеарил-N, N-диметиламмоний бромид (DDAB), N-(I-(2,3-диолеилокси)пропил)-N, N, N-триметиламмоний хлорид (DOTAP), N-(I-(2,3-диолеилокси)пропил)-N, N, N-триметиламмоний хлорид (DOTMA), N, N-диметил-2,3-диолеилоксипропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLenDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-

(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлоридная соль 1,2-Дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлоридная соль 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N, N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N, N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-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 их 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)этилазанедиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать примерно от 20 мол.% до примерно 50 мол.% или примерно 40 мол.% от общего количества липида, содержащегося в частице.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц липид-миРНК. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной патентной заявке США номер 61/107998, зарегистрированной 23 октября 2008 года, которая включена здесь посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления частица липид-миРНК содержит 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана:10% DSPC:40% холестерина:10% PEG-C-DOMG (молярные проценты) с размером частицы 63,0±20 нм и отношением миРНК/липид 0,027.

Некатионный липид может представлять анионный липид или нейтральный липид, включая, не ограничиваясь этим, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеилфосфатидилэтаноламин-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфоэтаноламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтаноламин (DSPE), 16-O-монометил-PE, 16-O-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеил-фосфатидиэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять примерно от 5 мол.% до примерно 90 мол.%, примерно 10 мол.% или примерно 58 мол.%, если содержится холестерин, от общего количества липида, содержащегося в частице.

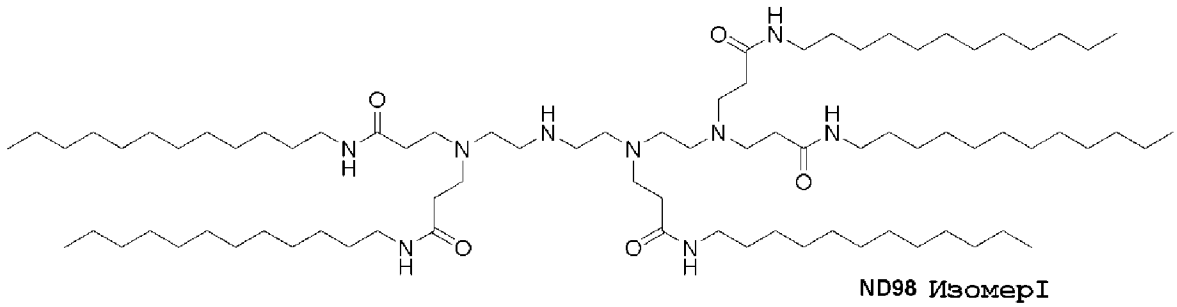
Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц может

представлять, например, полиэтиленгликоль (PEG)-липид, включая 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 (Ci2), PEG-димиристилоксипропил (Ci4), PEG-дипальмитилоксипропил (Ci6), или PEG-дистеарилоксипропил (Ci9). Конъюгированный липид, который предотвращает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол.% до примерно 20 мол.% или примерно 2 мол.% от общего количества липида, содержащегося в частице.

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

LNP01

В некоторых вариантов осуществления можно использовать липидоид ND98·4HC1 (ММ 1487) (см. патентную заявку США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., включенную здесь посредством ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) для получения наночастиц липид-дцРНК (т.е. частиц LNP01). Исходные растворы каждого в этаноле можно приготовить следующим образом: ND98 133 мг/мл, холестерин 25 мг/мл, PEG-церамид C16 100 мг/мл. Затем исходные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно объединять, например, в молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водной дцРНК (например, в ацетате натрия, pH 5) таким образом, чтобы конечная концентрация этанола составляла примерно 35-45%, и конечная концентрация ацетата натрия составляла примерно 100-300 мМ. Наночастицы липид-дцРНК, как правило, образуются спонтанно при перемешивании. В зависимости от желаемого распределения размера частиц полученную смесь наночастиц можно продавить через поликарбонатную мембрану (например, с порогом пропускания 100 нм) с использованием, например, экструдера с термобарабаном, такого как экструдер Lipex (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно исключить. Удаление этанола и одновременную замену буфера можно сопровождать, например, диализом или фильтрованием в тангенциальном потоке. Буфер можно заменить, например, на фосфатно-солевой буфер (PBS) с pH примерно 7, например, примерно pH 6,9, примерно pH 7,0, примерно pH 7,1, примерно pH 7,2, примерно pH 7,3 или примерно pH 7,4.



формула 1

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки WO

2008/042973, которая включена здесь посредством ссылки.

Дополнительные примерные составы липид-дцРНК представлены в следующей таблице.

Таблица А

Примерные липидные составы

	катионный липид	**коньюгат катионный липид/некатионный липид/холестерин/PEG-липид соотношение липид:миРНК**
SNALP	1,2-Дилиноленилокси-N, N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:siРНК □ 7:1
S-XTC	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (XTC)	XTC/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:миРНК □ 7:1
LNP05	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миРНК □ 6:1
LNP06	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миРНК □ 11:1
LNP07	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миРНК □ 6:1
LNP08	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миРНК □ 11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (XTC)	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1.5 липид:миРНК 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N, N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК 10:1

LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 липид:миРНК 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис (2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (C12-200)	C12-200/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 липид:миРНК: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:миРНК: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:миРНК: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК:12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:siРНК: 8:1

LNP20	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК:10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миРНК: 10:1

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-димиристилоксипропиламин (PEG со средней молекулярной массой 2000)

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

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

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в предварительной заявке на патент США с серийным номером 61/244834, поданной 22 сентября 2009 г., в предварительной заявке на патент США с серийным номером 61/1885800, поданной 10 июня 2009 г., и международной заявке № PCT/US10/28224, поданной 10 июня 2010 г., которые включены здесь посредством ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны, например, в международной заявке на патент № PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 г., которая включена здесь посредством ссылки.

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

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или минитаблетки. Желательными могут быть загустители, ароматизаторы, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связывающие средства. В некоторых вариантах осуществления составы для перорального введения представляют такие, в которых дцРНК по изобретению вводят в сочетании с одним или более усилителей проникновения поверхностно-активных веществ и хелаторов. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или сложные эфиры или их соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, гликолевую кислоту, гликолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натрия). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации усилителей проникновения, например, жирные кислоты/соли в комбинации с желчными кислотами/солями. Одна из иллюстративных комбинаций представляет собой натриевую соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные усилители проникновения включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. дцРНК по изобретению можно доставлять перорально, в гранулярной форме, включая распыляемые сухие частицы, или в виде комплексов с образованием микро- или наночастиц. Средства, образующие комплексы с дцРНК, включают полиаминокислоты, полиимины, полиакрилаты, полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты, желатины в катионной форме, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы, полиалкилцианоакрилаты, DEAE-дериватизированные полиимины, поллюланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразователи включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинометилэтилен P(TDAE), полиаминостирол (например, п-амино-), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D, L-молочную кислоту), сополимер поли(DL-молочной-гликолевой кислоты) (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Пероральные составы для дцРНК и их получение подробно описано в патенте США № 6887906, публикации

заявки на патент США 20030027780 и публикации заявки на патент 6747014, каждый из которых включен здесь посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интратекального, внутрижелудочкового или внутрипеченочного введения могут содержать стерильные водные растворы, которые также могут включать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, не ограничиваясь этим, усилители проникновения, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают, не ограничиваясь этим, растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции можно получить из различных компонентов, которые включают, не ограничиваясь этим, предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Особенно предпочтительными являются составы, которые направлены на печень при лечении заболеваний печени, таких как карцинома печени.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые можно подходящим способом предоставлять в разовой лекарственной форме, можно получить общепринятыми способами, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие способы включают стадию объединения активных ингредиентов с фармацевтическим носителем(ями) или эксципиентом(ами). Обычно составы получают посредством однородного и равномерного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или обеими формами, и затем при необходимости придание формы продукту.

Композиции по настоящему изобретению можно формулировать в любой из многих возможных лекарственных форм, таких как, не ограничиваясь этим, таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизма. Композиции по настоящему изобретению также можно формулировать в виде суспензий в водных, неводных или смешанных средах. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

Многие липосомы, содержащие липиды, дериватизированные одним или несколькими гидрофильными полимерами, и способы их получения известны в данной области. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) описали липосомы, содержащие неионогенный детергент, 2C1215G, который содержит фрагмент PEG. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) отметили, что гидрофильное покрытие частиц полистирола полимерными гликолями приводит к значительному увеличению периода полураспада в крови. Синтетические фосфолипиды, модифицированные присоединением карбоксильных групп полиалкиленгликолей (например, ПЭГ), описаны Sears (патенты США № 4426330 и 4534899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) описали эксперименты,

демонстрирующие, что липосомы, содержащие фосфатидилэтаноламин (PE), дериватизированный PEG или PEG стеаратом, имеют значительное увеличение периода полураспада в кровотоке. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) распространили такие наблюдения на другие фосфолипиды, дериватизированные ПЭГ, например, DSPE-PEG, образованные комбинацией дистеароилфосфатидилэтаноламина (DSPE) и PEG. Липосомы, имеющие ковалентно связанные фрагменты PEG на своей внешней поверхности, описаны в европейском патенте № EP 0445131 B1 и международной заявке WO 90/04384, выданными Fisher. Липосомные композиции, содержащие 1-20 мол.% ПЭ, дериватизированного ПЭГ, и способы их применения описаны Woodle et al. (патенты США № 5013556 и 5356633) и Martin et al. (патент США № 5213804 и Европейский патент № EP 0 496 813 B1). Липосомы, содержащие ряд других конъюгатов липид-полимер, раскрыты в WO 91/05545 и патенте США № 5225212 (Martin et al.), и в WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Липосомы, содержащие липиды церамидов, модифицированные ПЭГ, описаны в WO 96/10391 (Choi et al). В патенте США № 5540935 (Miyazaki et al.) и патенте США № 5556948 (Tagawa et al.) Описаны липосомы, содержащие ПЭГ, которые могут быть дополнительно модифицированы функциональными фрагментами на их поверхности.

В данной области известен ряд липосом, содержащих нуклеиновые кислоты. WO 96/40062, Thierry et al. раскрывают способы инкапсулирования нуклеиновых кислот с высокой молекулярной массой в липосомы. В патенте США № 5264221, Tagawa et al. раскрываются липосомы, связанные с белками, и утверждается, что содержимое таких липосом может включать дцРНК. В патенте США № 5665710, Rahman et al. описаны определенные методы инкапсулирования олигодезоксинуклеотидов в липосомы. В международной заявке WO 97/04787, Love et al. раскрываются липосомы, содержащие дцРНК, нацеленные на ген raf.

Дополнительные составы

i. Эмульсии

Композиции по настоящему изобретению можно приготовить и формулировать в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, представляют гетерогенные системы одной жидкости, диспергированной в другой в форме капель, как правило, превышающих 0,1 мкм в диаметре (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют двухфазные системы, содержащие две несмешивающиеся жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные друг в друге. Как правило, эмульсии могут представлять вариант типа вода-в-масле (в/м) или масло-в-воде (м/в). Когда водную фазу

тщательно разделяют и диспергируют в виде мелких капель в объеме масляной фазы, то полученную композицию называют эмульсия типа вода-в-масле (в/м). Альтернативно, когда масляную фазу тщательно измельчают и диспергируют в виде мелких капель в объеме водной фазы, то полученную композицию называют эмульсия типа масло-в-воде (м/в). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты в дополнение к диспергируемым фазам и активное лекарственное средство, которое может содержаться в виде раствора в водной фазе, масляной фазе или само по себе в виде отдельной фазы. Фармацевтические эксципиенты, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты также могут находиться в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять множественные эмульсии, которые состоят из более двух фаз, например, такие как в случае эмульсий типа масло-в-воде-в-масле (м/в/м) и вода-в-масле-в-воде (в/м/в). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двойные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные капли масла эмульсии м/в содержат маленькие капли воды, представляют эмульсию в/м/в. Аналогично, система масляных капель, заключенных в глобулах воды, стабилизированных в масляной непрерывной фазе, представляет эмульсию м/в/м.

Эмульсии характеризуются низкой термодинамической стабильностью или ее отсутствием. Обычно диспергируемую или прерывистую фазу эмульсии тщательно диспергируют во внешней или непрерывной фазе и поддерживают в такой форме посредством эмульгаторов или сохранения вязкости состава. Любая из фаз эмульсии может представлять полутвердое или твердое вещество, как в случае основ эмульсионного типа для мазей и кремов. Другие средства стабилизации эмульсий включают использование эмульгаторов, которые можно вводить в любую фазу эмульсии. В широком смысле эмульгаторы можно классифицировать на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, природные эмульгаторы, абсорбирующие основы и тонко диспергированные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как поверхностно-активные средства, нашли широкое применение в формуляции эмульсий, и они описаны в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p.199). Поверхностно-активные вещества, как правило, являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Отношение

гидрофильного к гидрофобного компоненту поверхностно-активного вещества называют гидрофильным/липофильным балансом (HLB), и он представляет важное средство для категоризации и выбора поверхностно-активных веществ для получения составов. Поверхностно-активные вещества можно классифицировать на различные классы в зависимости от природы гидрофильной группы: неионогенные, анионогеннные, катионогенные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Природные эмульгаторы, используемые в составах эмульсий, включают ланолин, пчелиный воск, фосфолипиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбирующие основы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий типа в/м, при этом сохраняя свою полутвердую консистенцию. Тонко размельченные твердые вещества также использовали в качестве хороших эмульгаторов, в частности, в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилтристеарат.

Целый ряд различных неэмульгирующих веществ также может находиться в эмульсионных составах, и они вносят определенный вклад в свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают природные камеди и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновая кислота, каррагенан, гуаровая камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии, образуя сильные межповерхностные пленки вокруг фазы диспергированных капель и повышая вязкость внешней фазы.

За счет того, что эмульсии часто содержат ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфолипиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, в эти составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включаемые в составы эмульсии, включают метилпарабен, пропилпарабен, соли четвертичного аммония,

хлорид бензалкония, сложные эфиры пара-гидроксибензойной кислоты и борную кислоту. В составы эмульсий также общепринято добавляют антиоксиданты для предотвращения ухудшения состава. Используемые антиоксиданты могут представлять поглотители свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановители, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и синергисты антиоксидантов, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов через кожный, пероральный и парентеральный пути и способы их получения описаны в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199). Эмульсионные составы для пероральной доставки широко использовали за счет простоты их получения, а также эффективности с точки зрения всысывания и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.199). Слабительные средства на основе минерального масла, маслорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира входят в число веществ, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий типа м/в.

ii. Микроэмульсии

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции иРНК и нуклеиновых кислоты формулируют в виде микроэмульсий. Микроэмульсию можно определить как систему из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет один оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Как правило, микроэмульсии представляют системы, которые получают сначала диспергированием масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, и затем добавлением достаточного количества четвертого компонента, в основном спирта с цепью промежуточной длины, с образованием прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также можно описать как термодинамически стабильные, изотропно прозрачные дисперсии двух несмешивающихся жидкостей, которые стабилизированы посредством межповерхностных пленок поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, in: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают комбинацией от трех до пяти компонентов, которые

включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вспомогательное поверхностно-активное вещество и электролит. Независимо от типа микроэмульсии вода-в-масле (в/м) или масло-в-воде (м/в) она зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Широкое изучение феноменологического подхода с использованием фазовых диаграмм привело к получению глубокой информации у специалистов в данной области в отношении того, как формулировать микроэмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с обычными эмульсиями микроэмульсии обеспечивают преимущество, заключающееся в солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств в составе термодинамически стабильных капель, которые образуются спонтанно.

Поверхностно-активные вещества, используемые для получения микроэмульсий включают, не ограничиваясь этим, ионогенные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот, тетраглицеринмонолаурат (ML310), тетраглицеринмоноолеат (MO310), гексаглицеринмоноолеат (PO310), гексаглицеринпентаолеат (PO500), декаглицеринмонокапрат (MCA750), декаглицеринмоноолеат (MO750), декаглицеринсеквиолеат (SO750), декаглицериндекаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации с вспомогательными поверхностно-активными веществами. Вспомогательное поверхностно-активное вещество, как правило, короткоцепочечный спирт, такой как этанол, 1-пропанол, и 1-бутанол, служит для повышения межповерхностной текучести посредством проникновения в пленку поверхностно-активного вещества и таким образом создания разупорядоченной пленки за счет свободного пространства, образуемого между молекулами поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии можно получить без использования вспомогательных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны не содержащие спирт самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий. Водная фаза, как правило, может представлять собой, не ограничиваясь этим, воду, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может содержать, не ограничиваясь этим, вещества, такие как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C8-C12) моно-, ди- и трилицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры глицерина и жирных кислот, жирные спирты, полигликолизированные глицериды, насыщенные полигликолизированные C8-C10 глицериды, растительные масла и

силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации лекарственного средства и повышенного всасывания лекарственных средств. Для повышения биодоступности при пероральном введении лекарственных средств, включая пептиды, были предложены микроэмульсии на основе липидов (м/в и в/м) (см., например, патенты США № 6191105, 7063860, 7070802, 7157099, Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества улучшенной солюбилизации лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного усиления всасывания лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести и проницаемости мембраны, простоты получения, простоты перорального введения по сравнению с твердыми лекарственными формами, улучшенной клинической активности 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 спонтанно, когда их компоненты приводят в контакт при температуре окружающей среды. Они могут быть особенно эффективными при формуляции термолабильных лекарственных средства, пептидов или иРНК. Микроэмульсии также являются эффективными для трансдермальной доставки активных компонентов, как в косметических, так и в фармацевтических применениях. Предполагается, что композиции и составы на основе микроэмульсий по настоящему изобретению будут способствовать повышенному системному всасыванию иРНК и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, и также улучшать местное клеточное поглощение иРНК и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии по настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), лабразол и усилители впитывания, для улучшения свойств состава и усиления всасывания иРНК и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Усилители впитывания, используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, можно классифицировать, как принадлежащие к одной из пяти больших категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и не относящиеся к хелатирующим поверхностно-активным веществам средства (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Каждый из этих групп соединений обсуждался выше.

iii. Микрочастицы

Средство для РНКи по изобретению можно включить в частицу, например микрочастицу. Микрочастицы можно получить с помощью распылительной сушки, но также их можно получить другими методами, включая лиофилизацию, выпаривание, сушку в псевдоожиженном слое, вакуумную сушку или комбинацию этих методов.

iv. Усилители проникновения

В одном вариантt осуществления в настоящем изобретении применяют различные усилители проникновения для обеспечения эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности, иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств находится в растворе в ионизованной и неионизированной формах. Однако, как правило, только растворимые в липидах или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрану, через которую необходимо пройти, обрабатывают усилителем проникновения. В дополнение к облегчению диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны усилители проникновения также повышают проходимость липофильных лекарственных средств.

Усилители проникновения можно классифицировать, как относящиеся к одной из пяти крупных категорий, т.е. поверхностно-активным веществам, жирным кислотам, солям желчных кислот, хелатирующим средствам и средствам, не относящимся к хелатирующим поверхностно-активным веществам (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 указанных выше групп усилителей проникновения более подробно описан ниже.

Поверхностно-активные вещества (или «поверхностно-активные средства») представляют химические соединения, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или междуфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, что приводит к тому, что всасывание иРНК через слизистую оболочку усиливается. В дополнение к солям желчных кислот и жирным кислотам данные усилители проникновения включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир) (см., например, Malmsten M., Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92) и эмульсии перфторсоединений, такие как FC-43 (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Различные жирные кислоты и их производные, которые функционируют в качестве усилителей проникновения, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, C1-20алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, миристат, 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 обеспечение диспергирования и всасывания

липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten M., Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Различные природные соли желчных кислот и их синтетические производные функционируют в качестве усилителей проникновения. Таким образом, термин «соли желчных кислот» включает любые природные компоненты желчи, а также любые их синтетические производные. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюхолевую кислоту (глюхолат натрия), глихолевую кислоту (глихолат 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 агенты, как их используют в контексте настоящего изобретения, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металлов из раствора, образуя с ними комплексы, что приводит к тому, что всасывание иРНК через слизистую оболочку усиливается. Относительно их применения в качестве усилителей проникновения в настоящем изобретении, то хелатирующие средства обладают дополнительными преимуществами, которые заключаются в том, что они служат в качестве ингибиторов ДНКазы, т.к. для большинства охарактеризованных ДНК-нуклеаз необходим двухвалентный ион металла для катализа и, таким образом, они могут ингибироваться хелатирующими агентами (Jarrett J., Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают, но ограничиваясь этим, этилендиаминтетраацетат динатрия (ЭДТА), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацильные производные бета-дикетонов (енаминов) (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).

Как здесь используется, повышающие проникновение соединения, которые не относятся ни к хелатирующим, ни к поверхностно-активным веществам, можно определить

как соединения, которые проявляют незначительную активность в качестве хелатирующих агентов или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые, тем не менее, повышают всасывание иРНК через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Эта группа усилителей проникновения включает, например, ненасыщенные циклические мочевины, 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканоновые производные (Lee et al., Critical Reviews in в 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 усиливают поглощение иРНК на клеточном уровне, также можно отнести к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, также известно, что катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al., патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка PCT WO 97/30731) усиливают клеточное поглощение дцРНК. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции наряду с другими включают, среди прочего, например, Липофектамин™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Липофектамин 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Целлфектин™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Липофектамин™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Липофектамин™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Олигофектамин™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Оптифект™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Switzerland), липосомальный реагент для трансфекции DOTAP (Grenzacherstrasse, Switzerland), липосомальный реагент для трансфекции DOSPER (Grenzacherstrasse, Switzerland) или Fugene (Grenzacherstrasse, Switzerland), реагент Трансфектам® (Promega; Madison, WI), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Madison, WI), реагент Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), реагент Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, France), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, France), реагент для трансфекции TransPassaD1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, USA), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, USA), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, USA), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, USA), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, USA), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, USA), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; San Diego, CA, USA), реагент для трансфекции BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, USA), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, USA), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, USA), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, USA), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, USA), или HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, USA).

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот можно использовать другие средства, включая гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы,

такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

v. Носители

Некоторые композиции по настоящему изобретению также содержат в своем составе соединения-носители. Как здесь используется, «соединение-носитель» или «носитель» может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, который является инертным (т.е. не обладает биологической активностью сам по себе), но распознается как нуклеиновая кислота процессами in vivo, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, посредством деградации биологически активной нуклеиновой кислоты или ускорением ее удаления из кровяного русла. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, как правило, в избытке последнего вещества, может приводить к существенному снижению количества нуклеиновой кислоты, обнаруживаемой в печени, почках или других компартментах вне кровотока, предположительно за счет конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, выход частично фосфоротиоата дцРНК в ткани печени может быть снижен, когда ее совместно вводят с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоцианостилбен-2,2-дисульфоновой кислотой (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

vi. Эксципиенты

В отличие от соединения-носителя «фармацевтический носитель» или «эксципиент» представляет фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или более нуклеиновых кислоты у животного. Эксципиент может быть жидким или твердым, и выбран с учетом предполагаемого способа введения таким образом, чтобы обеспечить желаемый объем, консистенцию и т.д. при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают, не ограничиваясь этим, связывающие средства (например, прежелатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.), наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или гидрофосфат кальция и т.д.), смазочные средства (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.), дезинтегранты (например, крахмал, крахмалгликолят натрия и т.д.) и средства для смачивания (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для непарентерального введения, которые не взаимодействуют с разрушающим действием с нуклеиновыми кислотами, также можно использовать для формуляции композиций по настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически

приемлемые носители включают, не ограничиваясь этим, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут содержать 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 эксципиенты, подходящие для непарентерального введения, которые не взаимодействуют с разрушающим действием с нуклеиновыми кислотами.

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

vii. Другие компоненты

Композиции по настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно используемые в фармацевтических композициях в количествах, в которых они обычно применяются в данной области. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически-активные вещества, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные вещества, такие как красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, замутняющие средства, загустители и стабилизаторы. Однако такие вещества при добавлении не должны оказывать неблагоприятное действие на виды биологической активности компонентов композиций по настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и при желании смешивать с вспомогательными средствами, например, смазочными средствами, консервантами, стабилизаторами, средствами для смачивания, эмульгаторами, солями, влияющими на осмотическое давление, буферами, красителями, вкусовыми ароматизирующими веществами и/или ароматическими веществами и т.п., которые не взаимодействуют с разрушающим действием с нуклеиновой кислотой(ами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, обеспеченные в изобретении, включают (a) одно или более соединений иРНК и (b) один или более агентов, которые действуют по механизму, отличному от механизма РНКи, и которые пригодны в лечении заболевания, расстройства или патологического состояния, ассоциированного с HSD17B13. Примеры таких агентов включают, не ограничиваясь этим: пиридоксин, ингибитор ACE (ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента),

например, беназеприл (Лотензин); антагонист рецептора ангиотензина II (ARB) (например, лозартан калия, такой как Cozaar® производства Merck & Co.), например кандесартан (Атаканд); ингибитор HMG-CoA редуктазы (например, статин); кальций-связывающие агенты, например фосфат натриевой целлюлозы (Calcibind); диуретики, например тиазидные диуретики, такие как гидрохлоротиазид (микрозид); сенсибилизатор инсулина, такой как агонист PPAR пиоглитазон, агонист glp-1r, такой как лираглутатид, витамин E, ингибитор SGLT2, ингибитор DPPIV и трансплантат почки/печени; или комбинация любого из вышеперечисленных средств.

Токсичность и терапевтическую эффективность всех соединений можно определить стандартными фармацевтическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (летальной дозы в 50% популяции) и ED50 (терапевтически эффективной дозы в 50% популяции). Отношение доз токсических эффектов к терапевтическим эффектам представляет собой терапевтический индекс, и его можно выражать в виде отношения LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые обладают высокими терапевтическими индексами.

Данные, полученные в анализах на культуре клеток и опытах на животных, можно использовать для определения диапазона доз для применения у людей. Дозирование композиций по изобретению, описанных здесь, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают ED50, с небольшой токсичностью или ее отсутствием. Дозирование может изменяться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, используемого в способах по изобретению, терапевтически эффективную дозу можно изначально устанавить на основании анализов на культуре клеток. Дозу можно устанавить на моделях на животных, с получением диапазона циркулирующих концентраций соединения в плазме крови или при необходимости полипептидного продукта последовательности-мишени (например, получая сниженные концентрации полипептида), которая включает IC50 (т.е. концентрацию тестируемого соединения, при которой получают полумаксимальное ингибирование симптомов), как определено на культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодных доз для людей. Уровни в плазме можно измерить, например, высокоэффективной жидкостной хроматографией.

В дополнение к их введению, как указано выше, иРНК по изобретению можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными для лечения патологических процессов, опосредованных экспрессией HSD17B13. В любом случае лечащий врач может корректировать количество и время введения иРНК на основании результатов, наблюдаемых с использованием стандартных величин эффективности, известных в данной области или описанных здесь.

Синтез катионных липидов:

Любое из соединений, например, катионные липиды и т.п., используемые в частицах нуклеиновая кислота-липид по изобретению, можно получить известными методами

органического синтеза. Все заместители представляют такие, как определено ниже, если не указано иное.

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

«Алкенил» означает алкил, имеющий значения, определенные выше, содержащий по меньшей мере одну двойную связь между соседними атомами углерода. Алкенилы включают цис- и транс-изомеры. Репрезентативные алкенилы с прямой и разветвленной цепью включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и тому подобное.

«Алкинил» означает любой алкил или алкенил, имеющие значения, определенные выше, который дополнительно содержит по меньшей мере одну тройную связь между соседними атомами углерода. Репрезентативные алкинилы с прямой и разветвленной цепью включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и тому подобное.

«Ацил» означает любой алкил, алкенил или алкинил, где углерод в месте присоединения замещен оксогруппой, как определено ниже. Например, -C(=O)алкил, -C(= O)алкенил и -C(= O)алкинил являются ацильными группами.

«Гетероцикл» означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое гетероциклическое кольцо, которое является насыщенным, ненасыщенным или ароматическим и которое содержит 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из атома азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азот и сера могут быть необязательно окисленными, и гетероатом азота может быть необязательно кватернизованным, включая бициклические кольца, в которых любой из вышеуказанных гетероциклов конденсирован с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, как определено ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, гидантоил, валеролактамил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и тому подобное.

Термины «необязательно замещенный алкил», «необязательно замещенный алкенил», «необязательно замещенный алкинил», «необязательно замещенный ацил» и «необязательно замещенный гетероцикл» означают, что при замещении по меньшей мере

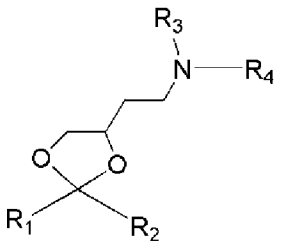
один атом водорода заменяется заместителем. В случае оксозаместителя (=O) заменяются два атома водорода. В этом отношении заместители включают оксо, атом галогена, гетероцикл, -CN, -ORx, -NRxRy, -NRxC(=O)Ry, -NRxSO2Ry, -C(=O)Rx, -C(=O)ORx, -C(=O)NRxRy, -SOnRx и -SOnNRxRy, где n равно 0, 1 или 2, Rx и Ry являются одинаковыми или разными и независимо представляют атом водорода, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных алкильных и гетероциклических заместителей может быть дополнительно замещен один или несколько из оксо, атома галогена, -OH, -CN, алкила, -ORx, гетероцикла, -NRxRy, -NRxC (=O)Ry, -NRxSO2Ry, -C(=O)Rx, -C(=O)ORx , -C(=O)NRxRy, -SOnRx и -SOnNRxRy.

«Галоген» означает атом фтора, хлора, брома и йода.

В некоторых вариантах осуществления в способах по изобретению может быть необходимым использование защитных групп. Методология защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, Protective Groups in Organic Synthesis, Green T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего изобретения представляют любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональной группы. Защитную группу можно добавить к функциональной группе для маскировки ее реакционной способности во время определенных реакций, и затем удалить, открывая исходную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления используют «спиртовую защитную группу». «Спиртовая защитная группа» представляет любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную реакционную способность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавить и удалить хорошо известными в данной области способами.

Синтез формулы A:

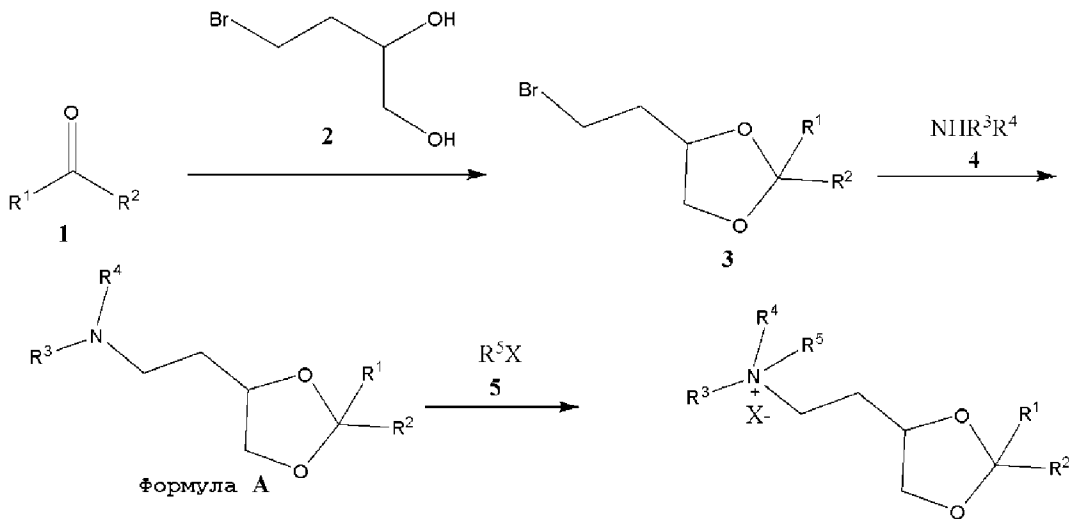
В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид по изобретению формулируют с использованием катионного липида формулы A:



,

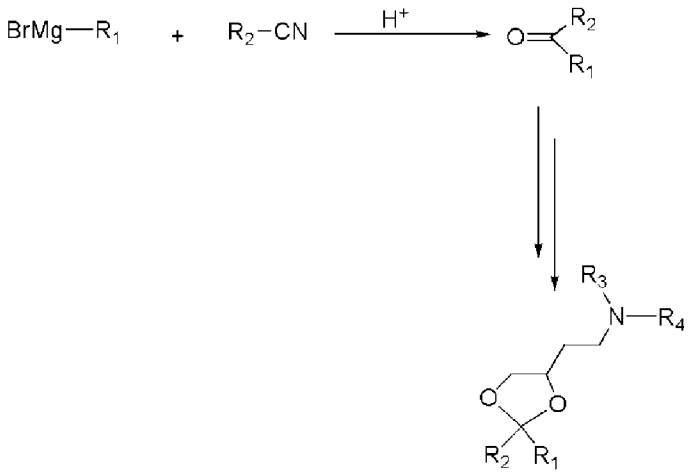
где R1 и R2 независимо представляют алкил, алкенил или алкинил, каждый из которых может быть необязательно замещен, и R3 и R4 независимо представляют низший алкил, или R3 и R4, взятые вместе, образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет XTC (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан). В общем, липид вышеуказанной формулы A можно получить по следующим схемам реакций 1 или 2, на которых все заместители имеют значения, определенные выше, если не указано иное.

Схема реакций 1



Липид A, где R1 и R2 независимо представляют алкил, алкенил или алкинил, каждый может быть необязательно замещен, и R3 и R4 независимо представляют низший алкил, или R3 и R4, взятые вместе, образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, может быть получен согласно схеме реакций 1. Кетон 1 и бромид 2 можно приобрести коммерческим путем или получить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Взаимодействие соединений 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кеталя 3 амином 4 дает липиды формулы A. Липиды формулы A могут быть преобразованы в соответствующую соль аммония с помощью органической соли формулы 5, где X представляет анионный противоион, выбранный из атома галогена, гидроксида, фосфата, сульфата и т.п.

Схема реакций 2



Альтернативно, исходный кетон 1 можно получить согласно схеме реакций 2. Реагент Гриньяра 6 и цианид 7 можно приобрести коммерческим путем или получить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники. Взаимодействие соединений 6 и 7 дает кетон 1. Превращение кетона 1 в соответствующие липиды формулы A показано на схеме реакций 1.

Синтез MC3:

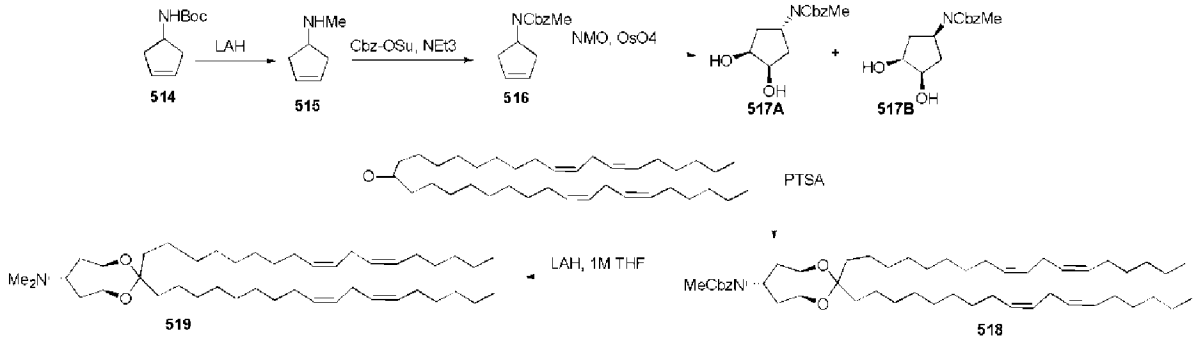
Получение DLin-M-C3-DMA (т.е. (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-

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

Синтез ALNY-100:

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

Схема реакций 3



Синтез 515:

К перемешиваемой суспензии LiAlH4 (3,74 г, 0,09852 моль) в 200 мл безводного ТГФ в двугорлой RBF (1 л) медленно добавляли раствор соединения 514 (10 г, 0,04926 моль) в 70 мл ТГФ при 0°C в атмосфере азота. После окончания добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры, и затем кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч. За ходом реакции следили с помощью ТСХ. После завершения реакции (по данным ТСХ) смесь охлаждали до 0°C и гасили осторожным добавлением насыщенного раствора Na2SO4. Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали THF. Фильтрат и промывные воды объединяли и разбавляли 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl и перемешивали 20 мин при комнатной температуре. Летучие вещества удаляли в вакууме с получением гидрохлорида соединения 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г. 1H-ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ=9,34 (шир., 2H), 5,68 (с, 2H), 3,74 (м, 1H), 2,66-2,60 (м, 2H), 2,50-2,45 (м , 5H).

Синтез 516:

К перемешиваемому раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в двухгорлой RBF емкостью 250 мл добавляли NEt3 (37,2 мл, 0,2669 моль) и охлаждали до 0°C в

атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимида (20 г, 0,08007 моль) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси давали подогреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч по данным ТСХ) смесь последовательно промывали 1 Н раствором HCl (1 × 100 мл) и насыщенным раствором NaHCO3 (1 × 50 мл). Затем органический слой высушивали над безводным Na2SO4, и растворитель выпаривали с получением сырого вещества, которое очищали хроматографией на колонке с силикагелем, с получением соединения 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%). 1Н-ЯМР (CDCl3, 400 МГц): δ=7,36-7,27 (м, 5Н), 5,69 (с, 2Н), 5,12 (с, 2Н), 4,96 (шир., 1Н) 2,74 (с, 3Н), 2,60 (м, 2Н), 2,30-2,25 (м, 2Н). ЖХ-МС [M+H]-232,3 (96,94%).

Синтез 517A и 517B:

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в одногорлой колбе RBF емкостью 500 мл и к раствору добавляли N-метилморфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), с последующим добавлением 4,2 мл 7,6% раствора OsO4 (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (≥3 ч) смесь гасили добавлением твердого Na2SO3 и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли DCM (300 мл) и промывали водой (2 × 100 мл), затем насыщенным раствором NaHCO3 (1 × 50 мл), водой (1 × 30 мл) и, наконец, насыщенным раствором соли (1 × 50 мл). Органическую фазу высушивали над Na2SO4, и растворитель удаляли в вакууме. После очистки сырого вещества на колонке с силикагелем получали смесь диастереомеров, которые разделяли препаративной ВЭЖХ. Выход: - 6 г неочищенного 517A - пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%). 1Н-ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ=7,39-7,31 (м, 5Н), 5,04 (с, 2Н), 4,78-4,73 (м, 1Н), 4,48-4,47 (д, 2Н), 3,94-3,93 (м , 2Н), 2,71 (с, 3Н), 1,72-1,67 (м, 4Н). ЖХ-МС - [M+H] -266,3, [M+NH4+]-283,5 присутствует, ВЭЖХ-97,86%. Стереохимия была подтверждена рентгенограммой.

Синтез 518:

Используя процедуру, аналогичную описанной для синтеза соединения 505, соединение 518 (1,2 г, 41%) получали в виде бесцветного масла. 1Н-ЯМР (CDCl3, 400 МГц): δ=7,35-7,33 (м, 4Н), 7,30-7,27 (м, 1Н), 5,37-5,27 (м, 8Н), 5,12 (с, 2Н), 4,75 (м, 1Н), 4,58-4,57 (м, 2Н), 2,78-2,74 (м, 7Н), 2,06-2,00 (м, 8Н), 1,96-1,91 (м, 2Н), 1,62 (м, 4Н), 1,48 (м, 2Н)), 1,37-1,25 (шир. м, 36Н), 0,87 (м, 6Н). ВЭЖХ-98,65%.

Общая процедура синтеза соединения 519:

Раствор соединения 518 (1 экв) в гексане (15 мл) добавляли по каплям к ледяному раствору LAH в THF (1 М, 2 экв). После завершения добавления смесь нагревали при 40°C в течение 0,5 ч, затем снова охлаждали на ледяной бане. Смесь осторожно гидролизовали насыщенным водным Na2SO4, затем фильтровали через Celite® и концентрировали до получения масла. Колоночная хроматография давала чистое соединение 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла. 13С ЯМР=130,2, 130,1 (×2), 127,9 (×3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (×2), 29,7, 29,6 (×2), 29,5 (×3), 29,3 (×2) , 27,2 (×3), 25,6,

24,5, 23,3, 226, 14,1; МС с электрораспылением (+ve): молекулярная масса для C44H80NO2 (M+H)+ расчетная 654,6, найденная 654,6.

Составы, полученные стандартным способом или способом без экструзии, можно охарактеризовать аналогичным образом. Например, составы, как правило, характеризовали визуальным исследованием. Они должны представлять собой беловатые прозрачные растворы, не содержащие агрегатов или осадка. Размер частиц и распределение размера частиц липида-наночастиц можно измерить светорассеянием с использованием, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, USA). Размер частицы должен составлять примерно 20-300 нм, такой как 40-100 нм. Распределение размера частиц должно быть однородным. Концентрацию общей дцРНК в составе, а также захваченной фракции оценивали анализом исключения красителя. Образец формулированной дцРНК можно инкубировать со связывающимся с РНК красителем, таким как Ribogreen (Molecular Probes) в присутствии или отсутствии разрушающего состав поверхностно-активного вещества, например, 0,5% Triton-X100. Общую дцРНК в составе можно определить по сигналу от образца, содержащего поверхностно-активное вещество, относительно стандартной кривой. Захваченную фракцию определяют вычитанием содержания «свободной» дцРНК (как измерено по сигналу в отсутствии поверхностно-активного вещества) из общего содержания дцРНК. Процент захваченной дцРНК, как правило, составляет >85%. Для состава SNALP размер частиц составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон, как правило, составляет примерно от по меньшей мере 50 нм примерно до по меньшей мере 110 нм, примерно от по меньшей мере 60 нм примерно до по меньшей мере 100 нм или примерно от по меньшей мере 80 нм примерно до по меньшей мере 90 нм.

VI. Способы по изобретению

Настоящее изобретение также относится к способам применения иРНК по изобретению и/или композиции по изобретению для снижения и/или ингибирования экспрессии HSD17B13 в клетке, такой как клетка у субъекта, например, гепатоцит. Способы включают приведение в контакт клетки со средством на основе иРНК или фармацевтической композицией, содержащей средство на основе иРНК по изобретению. В некоторых вариантах осуществления клетка поддерживается в течение времени, достаточного для получения расщепления транскрипта мРНК гена HSD17B13.

Настоящее изобретение также относится к способам применения иРНК по изобретению и/или композиции по изобретению и средства на основе иРНК, нацеленного на пататиноподобный фосфолипазный домен-содержащий белок 3 (PNPLA3), и/или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе иРНК, нацеленное на PNPLA3, для снижения и/или ингибирования экспрессии HSD17B13 в клетке, такой как клетка у субъекта, например, гепатоцит.

Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способы ингибирования

накопления и/или увеличения липидных капель в клетке, такой как клетка у субъекта, например, гепатоцит. Способы включают контактирование клетки со средством для РНКи или фармацевтической композицией, содержащей средство для иРНК по изобретению и средство на основе иРНК, нацеленное на ген PNPLA3, и/или фармацевтической композицией, содержащей средство для иРНК, нацеленное на PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления клетка поддерживается в течение времени, достаточного для получения расщепления транскрипта мРНК гена HSD17B13 и гена PNPLA3.

Снижение экспрессии генов можно оценить любыми методами, известными в данной области. Например, снижение экспрессии HSD17B13 можно определить посредством определения уровня экспрессии мРНК HSD17B13 с использованием стандартных методов, известных специалисту с обычной квалификацией в данной области, например, нозерн-блоттинга, ОТ-кПЦР; определением уровня белка HSD17B13 с использованием стандартных методов, известных специалисту с обычной квалификацией в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методы. Снижение экспрессии HSD17B13 также можно оценить опосредованно измерением снижения биологической активности HSD17B13, например, снижения ферментативной активности HSD17B13 и/или снижения одного или более из липидов, триглицеридов, холестерина (включая LDL-C, HDL-C, VLDL-C, IDL-C и общий холестерин) или свободных жирных кислот в плазме или образце ткани, и/или уменьшения накопления жира и/или увеличения липидных капель в печени.

Подходящие средства, нацеленные на ген PNPLA3, описаны, например, в публикации заявки на патент США №: 2017/0340661, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

В способах по настоящему изобретению клетку приводят в контакт in vitro или in vivo, т.е. клетка может находиться в организме субъекта.

Клеткой, подходящей для лечения с использованием способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген HSD17B13 (и, в некоторых вариантах осуществления, ген PNPLA3). Клетка, подходящая для применения в способах по настоящему изобретению, может быть клеткой млекопитающего, например, клеткой примата (такой как человеческая клетка или клетка примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клеткой животного, отличного от примата (такая как клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, хомяк, клетка морской свинки, клетка кошки, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра, клетка медведя или клетка буйвола), клеткой птицы (например, клетка утки или клетка гуся) или клеткой кита. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека, например клетку печени человека.

Экспрессия HSD17B13 ингибируется в клетке по меньшей мере на 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 , 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50 , 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63,

64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75 , 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или примерно 100%. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия HSD17B13 ингибируется по меньшей мере на 20%.

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

В одном варианте осуществления способы in vivo по изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере участку РНК-транскрипта гена HSD17B13 млекопитающего, подлежащего лечению.

В еще одном варианте осуществления способы in vivo по изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей первое средство на основе иРНК и второе средство на основе иРНК, где первая иРНК включает нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере участку РНК-транскрипта гена HSD17B13 млекопитающего, подлежащего лечению, и вторая иРНК включает нуклеотидную последовательность, комплементарную по меньшей мере участку РНК-транскрипта гена PNPLA3 млекопитающего, подлежащего лечению.

Когда организм, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающее, такое как человек, то композицию можно вводить любым известным в данной области способом, включая, не ограничиваясь этим, пероральный, внутрибрюшинный или парентеральный путь, включая интракраниальное (например, внутрижелудочковое, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутривенное, внутримышечное, подкожное, трансдермальное, через дыхательные пути (аэрозоль), назальное, ректальное и местное (включая буккальное и сублингвальное) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят посредством внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят посредством подкожной инъекции.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции-депо. Инъекция-депо может высвобождать иРНК постепенно в течение длительного периода времени. Таким образом, инъекция-депо может снизить частоту дозирования, необходимую для получения желаемого эффекта, например, желаемого ингибирования HSD17B13 или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция-депо может также обеспечить более постоянные концентрации в сыворотке. Инъекции-депо могут включать подкожные или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция-депо представляет собой подкожную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления введение проводят с использованием насоса.

Насос может представлять собой внешний насос или хирургически имплантированный насос. В некоторых вариантах осуществления насос представляет подкожно имплантированный осмотический насос. В еще одних вариантах осуществления насос представляет инфузионные насос. Инфузионные насос можно использовать для внутривенной, подкожной, артериальной или эпидуральной инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос представляет подкожный инфузионный насос. В еще одних вариантах осуществления насос представляет хирургически имплантированный насос, который доставляет иРНК в печень.

иРНК по изобретению может находится в фармацевтической композиции, например, в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном из вариантов осуществления буферный раствор представляет забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего иРНК, можно корректировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

Альтернативно иРНК по изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомный состав дцРНК.

Способ введения можно выбрать в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и в зависимости от области, подлежащей лечению. Путь и место введения могут быть выбраны для улучшения нацеливания.

В одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает способы ингибирования экспрессии гена HSD17B13 у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, которая нацелена на ген HSD17B13 в клетке млекопитающего, тем самым подавляя экспрессию гена HSD17B13 в клетке.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, которая нацелена на ген HSD17B13 в клетке млекопитающего, тем самым обеспечивая ингибирование экспрессии гена HSD17B13 в клетке. В еще одном варианте осуществления способы включают введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген HSD17B13 в клетке млекопитающего.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение средства на основе иРНК или фармацевтической композиции по изобретению для ингибирования экспрессии гена HSD17B13 у млекопитающего.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение средства на основе иРНК по изобретению, нацеленного на ген HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей такое средство, в производстве лекарственного средства для ингибирования экспрессии гена HSD17B13 у млекопитающего.

В еще одном аспекте настоящее изобретение также относится к способам ингибирования экспрессии гена HSD17B13 и гена PNPLA3 у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, которая нацелена

на ген HSD17B13 в клетке млекопитающего, и композиции, содержащей дцРНК, которая нацелена на ген PNPLA3 в клетке млекопитающего, тем самым обеспечивая ингибирование экспрессии гена HSD17B13 и гена PNPLA3 в клетке. В одном варианте осуществления способы включают введение млекопитающему фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген HSD17B13 и ген PNPLA3 в клетке млекопитающего.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение средства на основе иРНК или фармацевтической композиции по изобретению и дцРНК, которая нацелена на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащую такое средство, для ингибирования экспрессии гена HSD17B13 и гена PNPLA3 у млекопитающего.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение средства на основе иРНК по изобретению, нацеленного на ген HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей такое средство, и дцРНК, нацеленной на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей такое средство, в производстве лекарственного средства для ингибирования экспрессии гена HSD17B13 и гена PNPLA3 у млекопитающего.

Снижение экспрессии генов можно оценить любыми методами, известными в данной области техники, и методами, например ОТ-кПЦР, описанными здесь. Снижение продукции белка можно оценить любыми методами, известными в данной области техники, и методами, например ELISA, анализом ферментативной активности, описанными здесь.

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим и профилактическим способам, которые включают введение субъекту, имеющему или предрасположенному к развитию ассоциированного с ожирением печени заболевания, расстройства или патологического состояния, средств на основе иРНК, фармацевтических композиций, содержащих средство на основе иРНК, или векторов, содержащих иРНК изобретение.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего расстройством, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, например, заболевание, ассоциированное с HSD17B13.

Способы лечения (и применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК, которое ингибирует экспрессию HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, которая ингибирует экспрессию HSD17B13, тем самым обеспечивая лечение субъекта.

В одном аспекте изобретение относится к способам профилактики по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, например, хроническое фиброзно-воспалительное заболевание. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, тем самым обеспечивая профилактику по меньшей мере одного симптома у субъекта.

В одном варианте осуществления заболевание, расстройство или патологическое состояние, ассоциированное с HSD17B13, представляет хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени. Неограничивающие примеры хронических фиброзно-воспалительных заболеваний печени включают рак, например, гепатоцеллюлярную карциному, неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени, воспаление печени, гепатоцеллюлярный некроз, фиброз печени и неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD).

Настоящее изобретение также относится к терапевтическим и профилактическим способам, которые включают введение субъекту, имеющему или предрасположенному к развитию ассоциированного с ожирением печени заболевания, расстройства или патологического состояния, средств на основе иРНК, фармацевтических композиций, содержащих средство на основе иРНК, или векторов, содержащих иРНК по изобретению и средства на основе иРНК, нацеленного на PNPLA3, фармацевтических композиций, содержащих такое средство на основе иРНК, или векторов, содержащих такую иРНК.

Настоящее изобретение также относится к применению терапевтически эффективного количества средства на основе иРНК по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, которая ингибирует экспрессию HSD17B13, для лечения субъекта, например, субъекта, которому окажет положительное действие снижение и/или ингибирование экспрессии HSD17B13, например, лечения заболевания, ассоцированного с HSD17B13, например, хронического фиброзно-воспалительного заболевания.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение средства на основе иРНК, например, дцРНК по изобретению, нацеленного на ген HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе иРНК, нацеленного на ген HSD17B13, в производстве лекарственного средства для лечения субъекта, например, субъекта, которому окажет положительное действие снижение и/или ингибирование экспрессии HSD17B13, например, лечения заболевания, ассоциированного с HSD17B13.

Настоящее изобретение также относится к применению профилактически эффективного количества средства на основе иРНК по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, которая ингибирует экспрессию HSD17B13, для профилактики по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, например, хроническое фиброзно-воспалительное заболевание.

В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение средства на основе иРНК, например, дцРНК по изобретению, нацеленного на ген HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе иРНК, нацеленное на ген HSD17B13, в производстве лекарственного средства для профилактики по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, например, хроническое фиброзно-воспалительное заболевание.

В одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает применение

терапевтически эффективного количества средства на основе иРНК по изобретению или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, которая ингибирует экспрессию HSD17B13 в комбинации с дцРНК, которая нацелена на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей лекарственное средство для лечения субъекта, например субъекта, которому окажет положительное действие снижение и/или ингибирование экспрессии HSD17B13, например, заболевание, ассоциированное с HSD17B13, например, хроническое фиброзно-воспалительное заболевание.

В одном аспекте настоящее изобретение также обеспечивает применение средства на основе иРНК, например, дцРНК, по изобретению, нацеленного на ген HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе иРНК, нацеленное на ген HSD17B13, в комбинации с дцРНК, нацеленной на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей такое средство для профилактики по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, например, хроническое фиброзно-воспалительное заболевание.

Комбинированные способы по настоящему изобретению для лечения субъекта, например человека, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13, таким как хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени, например NASH, являются пригодными для лечения таких субъектов, поскольку сайленсинг PNPLA3 снижает стеатоз (т. е. жировое перерождение печени), в то время как ингибирование HSD17B13 снижает воспаление и фиброз. Например, результаты геномных исследований показали, что сайленсинг PNPLA3 и HSD17B13 имеет аддитивный эффект в уменьшении патологии NASH. Действительно, было обнаружено, что аллель HSD17B13 с протективной потерей функции связан с более низким распространением NASH у субъектов с патогенными аллелями PNPLA3. У субъектов, имеющих аллели PNPLA3 дикого типа, которые имеют более низкий риск развития NASH, дополнительное присутствие аллелей HSD17B13 с потерей функции обеспечивает еще большую защиту.

Следовательно, в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы лечения субъекта, страдающего расстройством, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, например, заболевание, ассоциированное с HSD17B13, такое как хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени (например, рак, например, гепатоцеллюлярная карцинома, неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени, воспаление печени, гепатоцеллюлярный некроз, фиброз печени и неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD). В одном варианте осуществления хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени представляет NASH.

Комбинированные способы лечения (и применения) по изобретению включают введение субъекту, например человеку, терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК, которое ингибирует экспрессию HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, которая ингибирует экспрессию HSD17B13, и средства

на основе дцРНК, которое ингибирует экспрессию PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, которая ингибирует экспрессию PNPLA3, тем самым обеспечивая лечение субъекта.

В одном аспекте изобретение относится к способам профилактики по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13, например, хроническое фиброзно-воспалительное заболевание, например, NASH. Способы включают введение субъекту профилактически эффективного количества средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, которая ингибирует экспрессию HSD17B13, и средства на основе дцРНК, которое ингибирует экспрессию PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей дцРНК, которая ингибирует экспрессию PNPLA3, тем самым обеспечивая профилактику по меньшей мере одного симптома у субъекта.

В одном варианте осуществления субъект является гетерозиготным по гену, кодирующему вариант пататинподобный фосфолипазный домен-содержащего белка 3 (PNPLA3) I148M. В еще одном варианте осуществления субъект является гомозиготным по гену, кодирующему вариант PNPLA3 I148M. В одном варианте осуществления субъект является гетерозиготным по гену, кодирующему вариант пататинподобный фосфолипазный домен-содержащего белка 3 (PNPLA3) I144M. В еще одном варианте осуществления субъект является гомозиготным по гену, кодирующему вариант PNPLA3 I144M. В одном варианте осуществления субъект является гомозиготным по гену, кодирующему функциональный белок HSD17B13. В еще одном варианте осуществления субъект является гетерозиготным по гену, кодирующему функциональный белок HSD17B13. В еще одном варианте осуществления субъект является гетерозиготным по гену, кодирующему функциональный белок HSD17B13, и гену, кодирующему вариант HSD17B13 с потерей функции. В еще одном варианте осуществления субъект не является носителем варианта HSD17B13 rs72613567.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способы могут включать идентификацию субъекта, которому окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13. Способы обычно включают определение того, содержит ли образец от субъекта нуклеиновую кислоту, кодирующую вариант PNPLA3Ile148Met или вариант PNPLA3Ile144Met. Способы могут также включать классификацию субъекта как кандидата на лечение или ингибирование заболевания печени посредством ингибирования экспрессии aHSD17B13, определением того, содержит ли образец от субъекта первую нуклеиновую кислоту, кодирующую белок PNPLA3, содержащий вариант I148M, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую функциональный белок HSD17B13, и/или белок PNPLA3, содержащий вариант I148M и функциональный белок HSD17B13, и классификацию субъекта как кандидата на лечение или ингибирование заболевания печени посредством ингибирования HSD17B13, когда и первая, и вторая нуклеиновые кислоты обнаруживаются и/или когда обнаруживаются оба белка.

Вариант PNPLA3 Ile148Met или вариант PNPLA3 Ile144Met может представлять любой из вариантов PNPLA3 Ile148Met и вариантов PNPLA3 Ile144Met, описанных здесь. Вариант PNPLA3 Ile148Met или вариант PNPLA3 Ile144Met может быть детектирован любыми подходящими средствами, такими как анализ ELISA, ОТ-ПЦР, секвенирование.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение, является ли субъект гомозиготным или гетерозиготным по варианту PNPLA3 Ile148Met или варианту PNPLA3 Ile144Met. В некоторых вариантах осуществления субъект является гомозиготным по варианту PNPLA3 Ile148Met или варианту PNPLA3 Ile144Met. В некоторых вариантах осуществления субъект является гетерозиготным по варианту PNPLA3 Ile148Met или варианту PNPLA3 Ile144Met. В некоторых вариантах осуществления субъект является гомозиготным по варианту PNPLA3 Ile148Met. В некоторых вариантах осуществления субъект является гетерозиготным по варианту PNPLA3 Ile148Met. В некоторых вариантах осуществления субъект является гомозиготным по варианту PNPLA3 Ile144Met. В некоторых вариантах осуществления субъект является гетерозиготным по варианту PNPLA3 Ile144Met.

В некоторых вариантах осуществления субъект не содержит любых генов, кодирующих варианты с потерей функции белка HSD17B13. Полагается, что варианты с потерей функции белка HSD17B13, в том числе описанные здесь и в предварительной заявке США с серийным номером 62/570985, поданной 11 октября 2017 г., обеспечивают защитный эффект от заболеваний печени, и также полагается, что этот защитный эффект усиливается при наличии варианта PNPLA3 Ile148M.

В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение того, страдает ли субъект ожирением. В некоторых вариантах осуществления субъект страдает ожирением, если его индекс массы тела (ИМТ) превышает 30 кг/м2. Ожирение может быть характеристикой субъекта, страдающего заболеванием печени или подверженного риску его развития. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение наличия у субъекта жирового перерождения печени. Жировое перерождение печени может может представлять характеристику субъекта, имеющего заболевание печени или имеющего риск развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают определение того, страдает ли субъект ожирением и жировым перерождением печени.

Как здесь используется, термин «неалкогольная жировая болезнь печени», который используется взаимозаменяемо с термином «NAFLD», относится к заболеванию, определяемому наличием макрососудистого стеатоза при потреблении менее 20 г алкоголя в день. NAFLD представляет наиболее распространенное заболевание печени в Соединенных Штатах, и обычно связано с инсулинорезистентностью/сахарным диабетом 2 типа и ожирением. NAFLD проявляется стеатозом, стеатогепатитом, циррозом печени и иногда гепатоцеллярной карциномой. Обзор по NAFLD см. в публикации Tolman and Dalpiaz (2007) Ther. Clin. Risk. Manag., 3 (6): 1153-1163, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

Как здесь используются, термины «стеатоз», «стеатоз печени» и «жировая болезнь печени» относятся к накоплению триглицеридов и других жиров в клетках печени.

Как здесь используется, термин «неалкогольный стеатогепатит» или «NASH» относится к воспалению и повреждению печени, вызванному накоплением жира в печени. NASH входит в группу патологических состояний, называемых неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). NASH напоминает алкогольную болезнь печени, но возникает у людей, которые мало потребляют или совсем не потребляют алкоголь. Главной особенностью NAFLD является жир в печени, а также воспаление и повреждение. Большинство людей с NASH чувствуют себя хорошо и не знают, что у них имеются проблемы с печенью. Тем не менее, NASH может иметь тяжелое течение и привести к циррозу, при котором печень необратимо повреждается, образуются рубцы, и больше она не может нормально функционировать. NASH обычно сначала подозревают у человека, у которого обнаружено повышение показателей печеночных тестов, которые входят в стандартные анализы крови, таких как активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) или аспартатаминотрансферазы (АСТ). Когда дальнейшее обследование не показывает очевидных причин заболевания печени (например, прием лекарственных препаратов, вирусный гепатит или чрезмерное употребление алкоголя) и когда рентгеновские снимки или результаты визуализирующих исследований печени показывают жир, то подозревается NASH. Единственным способом подтверждения диагноза NASH и дифференцированием его от простого жирового перерождения печени является биопсия печени.

Как здесь используется, термин «цирроз», определенный гистологически, представляет собой диффузный печеночный процесс, характеризующийся фиброзом и превращением нормальной архитектуры печени в структурно аномальные узелки.

Как здесь используется, термин «сывороточный липид» относится к любому основному липиду, содержащемуся в крови. Сывороточные липиды могут содержаться в крови в свободной форме или в виде части белкового комплекса, например, комплекса липопротеинов. Неограничивающие примеры сывороточных липидов могут включать триглицериды и холестерин, такой как общий холестерин (TG), холестерин липопротеинов низкой плотности (LDL-C), холестерин липопротеинов высокой плотности (HDL-C), холестерин липопротеинов очень низкой плотности (VLDL-C) и холестерин липопротеинов средней плотности (IDL-C).

В одном варианте осуществления субъект, которому окажет положительное действие снижение экспрессии HSD17B13 (и, в некоторых вариантах осуществления, PNPLA3), представляет собой, например, субъекта, который страдает диабетом 2 типа и предиабетом или ожирением; субъекта, у которого высокий уровень жиров в крови, таких как холестерин, или высокое кровяное давление; субъекта, имеющего определенные метаболические расстройства, включая метаболический синдром; субъекта, у которого наблюдается быстрая потеря массы тела; субъекта, у которого имеются определенные инфекции, такие как гепатит С, или субъекта, который подвергался воздействию некоторых токсинов. В одном варианте субъектом, которому окажет положительное действие

снижение экспрессии HSD17B13 (и, в некоторых вариантах осуществления PNPLA3), является, например, субъектом среднего возраста или старше; субъектом латиноамериканского происхождения, белые латиноамериканцы или афроамериканцы; субъектом, принимающим определенные лекарственные препараты, такие как кортикостероиды и противоопухолевые лекарственные средства.

В способах (и применениях) по изобретению, которые включают введение субъекту первого средства на основе дцРНК, нацеленного на HSD17B13, и второго средства на основе дцРНК, нацеленного на PNPLA3, первое и второе средства на основе дцРНК можно формулировать в одной и той же композиции или в разных композициях, и можно вводить субъекту в одной и той же композиции или в отдельных композициях.

В одном варианте осуществления «иРНК» для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой «средство для РНКи двойного нацеливания». Термин «средство для РНКи двойного нацеливания» относится к молекуле, содержащей первое средство на основе иРНК, включающее комплекс молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющий дуплексную структуру, включающую две антипараллельные и по существу комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, называемые имеющими «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию по отношению к первой РНК-мишени, т. е. к гену HSD17B13, ковалентно присоединенному к молекуле, содержащей второе средство на основе дцРНК, содержаще комплекс молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющий дуплексную структуру, включающую две антипараллельные и по существу комплементарные цепи нуклеиновых кислот, называемые имеющими «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию по отношению ко второй РНК-мишени, т. е. к гену PNPLA3. В некоторых вариантах осуществления изобретения «средство для РНКи двойного нацеливания» запускает деградацию первой и второй РНК-мишени, например мРНК, посредством посттранскрипционного механизма сайленсинга гена, называемого здесь РНК-интерференцией или РНКи.

Средство на основе дцРНК можно вводить субъекту в дозе примерно от 0,1 мг/кг до примерно 50 мг/кг. Обычно подходящая доза находится в диапазоне примерно от 0,1 мг/кг до примерно 5,0 мг/кг, предпочтительно примерно от 0,3 мг/кг до примерно 3,0 мг/кг.

иРНК можно вводить внутривенной инфузией в течение определенного периода времени на регулярной основе. В некоторых вариантах осуществления после начальной схемы лечения лечение можно проводить реже.

Введение иРНК может снизить уровни HSD17B13, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте организма пациента по меньшей мере примерно на 5%, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 , 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 , 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 39, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64 , 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или по меньшей мере примерно 99% или более. В предпочтительном варианте осуществления введение иРНК может снизить уровни HSD17B13, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте организма

пациента по меньшей мере на 20%.

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

Перед введением полной дозы иРНК пациентам можно ввести меньшую дозу, такую как 5%, для оценки реакции на инфузию, и контролировать проявление побочных эффектов, таких как аллергическая реакция. В другом примере за пациентом можно наблюдать на предмет нежелательных иммуностимулирующих эффектов, таких как повышенные уровни цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Альтернативно иРНК можно вводить подкожно, т. е. подкожной инъекцией. Можно использовать одну или несколько инъекций для доставки субъекту желаемой суточной дозы иРНК. Инъекции можно повторять в течение определенного периода времени. Введение можно повторять на регулярной основе. В некоторых вариантах осуществления после начальной схемы лечения лечение можно проводить реже. Схема с повторными введениями может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, через день или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят примерно один раз в неделю, один раз в 7-10 дней, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели, один раз в 5 недель, один раз в 6 недель, один раз в 7 недель, один раз в 8 недель, один раз в 9 недель, один раз в 10 недель, один раз в 11 недель, один раз в 12 недель, один раз в месяц, один раз в 2 месяца, один раз в 3 месяца (один раз в квартал), один раз в 4 месяца, один раз в 5 месяцев или один раз в 6 месяцев.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции, описанной здесь, так что экспрессия гена-мишени HSD17B13 снижается на период времени примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24 ч, 28, 32 или примерно 36 ч. В одном варианте осуществления экспрессия гена-мишени HSD17B13 снижается на продолжительный период времени по меньшей мере примерно на два, три, четыре дня или более, например, примерно на одну неделю, две недели, три недели или четыре недели или дольше.

В еще одном варианте осуществления способ включает введение композиции, описанной здесь, так что экспрессия гена-мишени PNPLA3 снижается на период времени примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24 ч, 28, 32 или примерно 36 ч. В одном варианте осуществления экспрессия гена-мишени PNPLA3 снижается на продолжительный период времени по меньшей мере примерно на два, три, четыре дня или более, например, примерно на одну неделю, две недели, три недели или четыре недели или дольше.

Предпочтительно иРНК, используемые в способах и композициях, описанных здесь,

специфически нацелены на РНК (первичные или процессированные) гена-мишени HSD17B13 (и, в некоторых вариантах осуществления, гена PNPLA3). Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с использованием иРНК могут быть получены и выполнены, как здесь описано.

Введение дцРНК способами по изобретению может приводить к снижению тяжести, признаков, симптомов и/или маркеров такого заболевания или нарушения у пациента с нарушением метаболизма липидов. Под «снижением» в этом контексте подразумевается статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например по меньшей мере примерно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или примерно 100%.

Эффективность лечения или профилактики заболевания можно оценить, например, определением прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, ослабления боли, улучшения качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимой для поддержания терапевтического эффекта, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, соответствующего данному заболеванию, для которого проводят лечение или на которое направлена профилактика. Специалисту в данной области хорошо известно, как проводить наблюдение за эффективностью лечения или профилактики посредством измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения нарушения метаболизма липидов можно оценить, например, периодическим наблюдением за одним или более уровнями липидов в сыворотке крови. Сравнение последних показаний с начальными показаниями служит для врача показателем, является ли лечение эффективным. Специалист в данной области может проводить наблюдение за эффективностью лечения или профилактики посредством измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Относительно введения иРНК или ее фармацевтической композиции, то «эффективная в отношении» нарушения метаболизма липидов означает, что введение принятым в клинической практике способом приводит к положительному действию по меньшей мере для статистически значимой популяции пациентов, такому как ослабление симптомов, выздоровление, снижение тяжести заболевания, увеличение продолжительности жизни, улучшение качества жизни или другому эффекту, общепризнанному как положительный врачами, занимающимися лечением нарушения метаболизма липидов и родственными факторами.

Лечебное или профилактическое действие выявляют, когда наблюдают статистически значимое улучшение одного или более параметров статуса заболевания, или по отсутствию ухудшения или прогрессирования симптомов, где их в ином случае ожидали. В качестве примера, благоприятное изменение по меньшей мере на 10% измеряемого параметра заболевания и предпочтительно по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50% или более может свидетельствовать об эффективности лечения. Эффективность для данного лекарственного средства иРНК или состава такого лекарственного средства также можно оценивать с использованием экспериментальной модели на животных для данного заболевания, как известно в данной области.

Изобретение также обеспечивает способы применения средства на основе иРНК или фармацевтической композиции по изобретению, например, для лечения субъекта, которому будет полезно снижение и/или ингибирование экспрессии HSD17B13 или HSD17B13, например, субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13, в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими методами, например, с известными фармацевтическими препаратами и/или известными терапевтическими методами, например, такими как, те, которые в настоящее время используются для лечения этих расстройств. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам применения средства на основе иРНК или фармацевтической композиции по изобретению и средства на основе иРНК, нацеленного на PNPLA3, например, для лечения субъекта, которому было бы полезно снижение и/или ингибирование экспрессии HSD17B13 и PNPLA3, например, субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13, (например, NASH), в комбинации с другими фармацевтическими препаратами и/или другими терапевтическими методами, например, с известными фармацевтическими препаратами и/или известными терапевтическими методами, такими как, например, те, которые в настоящее время используются для лечения этих заболеваний. Например, в некоторых вариантах осуществления средство на основе иРНК или фармацевтическая композиция по изобретению вводят в комбинации, например, с пиридоксином, ингибитором АПФ (ингибиторами ангиотензинпревращающего фермента), например, с беназеприлом для снижения артериального давления, например, с диуретиками, бета-блокаторами, ингибиторами АПФ, блокаторами рецепторов ангиотензина II, блокаторами кальциевых каналов, альфа-блокаторами, антагонистами рецепторов альфа-2, комбинированными альфа- и бета-блокаторами, центральными агонистами, периферическими адренергическими ингибиторами и сосудорасширяющими средствами; или агентами для снижения холестерина, например статинами, селективными ингибиторами абсорбции холестерина, смолами; гиполипидемической терапии; сенсибилизаторами инсулина, такими как пиоглитазон, агонист PPARγ; агонисты glp-1r, такие как лираглутатид; витамин E; ингибиторы SGLT2; или ингибиторы DPPIV; или комбинация любого из вышеперечисленного. В одном варианте осуществления средство на основе иРНК или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению вводится в комбинации с агентом, который ингибирует экспрессию и/или активность гена трансмембранного 6 члена суперсемейства 2 (TM6SF2), например, средство на основе иРНК, которое ингибирует экспрессию гена TM6SF2.

Средство на основе иРНК и дополнительный терапевтический агент и/или лечение можно вводить одновременно и/или в одной и той же комбинации, например, подкожно, или дополнительный терапевтический агент можно вводить как часть отдельной композиции или в отдельное время и/или другим способом, известным в данной области или описанным здесь.

VII. Наборы

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы для осуществления любого из способов по изобретению. Такие наборы включают одно или более средств на основе иРНК и инструкции по применению, например, инструкции по ингибированию экспрессии HSD17B13 в клетке посредством приведения в контакт клетки со средством на основе иРНК или фармацевтической композицией по настоящему изобретению в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии HSD17B13. Наборы могут дополнительно содержать средства для приведения в контакт клетки со средством на основе иРНК (например, инъекционное устройство) или средства для измерения ингибирования HSD17B13 (например, средства для измерения ингибирования мРНК HSD17B13 и/или белка HSD17B13). Такие средства для измерения ингибирования HSD17B13 могут включать средства для получения образца от субъекта, такого как, например, образец плазмы. Наборы по настоящему изобретению могут необязательно дополнительно содержать средства для введения средства(в) на основе иРНК субъекту или средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые здесь, имеют аналогичное значение, как общепринято понимает специалист в данной области, к которой относится данное изобретение. Хотя в практическом осуществлении или тестировании иРНК и способов по изобретению можно использовать способы и вещества, аналогичные или эквивалентные описанным здесь, подходящие способы и вещества описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указанные здесь, в полном объеме включены здесь посредством ссылки. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, имеет преимущественное значение. Кроме того, вещества, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Примеры

Пример 1. Конструирование, синтез и выбор иРНК

В данном примере описаны методы конструирования, синтеза и выбора средства на основе иРНК HSD17B13.

Источник реагентов

Когда источник реагента конкретно не указан здесь, то такой реагент можно получить от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии со стандартом качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

Биоинформатика

Был сконструирован набор миРНК, нацеленных на ген 17-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 13 человека (HSD17B13; номер для доступа NCBI NM_178135.4; NCBI GeneID: 345275), а также на токсикологический видовой ортолог HSD17B13 обезьяны Cynomolgus: XM_005555367.2. с использованием языка R и Python-скриптов. Все конструкции миРНК идеально соответствуют транскрипту HSD17B13

человека, и подмножество либо полностью, либо почти идеально соответствует ортологу обезьяны Cynomolgus. мРНК NM_178135 REFSEQ человека, вариант 4, имеет длину 2397 оснований. Обоснование и метод для набора конструкций миРНК являются следующими: прогнозируемая эффективность для каждой потенциальной 23-мерной миРНК от положения 10 до конца определяли с помощью модели Random forest, полученной из прямого измерения нокдауна мРНК из нескольких тысяч различных конструкций миРНК, нацеленных на разнообразный набор генов позвоночных. Для каждой цепи миРНК использовали пользовательский Python-скрипт методом грубого поиска для измерения количества и положений ошибочных спариваний между миРНК и всеми потенциальными выравниваниями в транскриптоме человека. Дополнительный вес придавали ошибочным спариваниям в затравочной области, определенной здесь как положения 2-9 антисмыслового олигонуклеотида, а также сайту расщепления миРНК, определенному здесь как положения 10-11 антисмыслового олигонуклеотида. Относительный вес ошибочных спариваний составлял 2,8, 1,2, 1 для ошибочных спариваний в затравочной области, сайте расщепления и других положениях до антисмыслового положения 19. Ошибочные спаривания в первом положении не учитывали. Оценка специфичности была рассчитана для каждой цепи суммированием значений каждого взвешенного ошибочного спаривания. Предпочтение отдавалось миРНК, оценка антисмысловой цепи которых у человека и обезьяны Cynomolgus составляла > = 2, и прогнозируемая эффективность составляла > = 50% нокдаун.

Подробный список немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой цепи и последовательностей антисмысловой цепи приведен в таблице 2.

Подробный список модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой цепи и последовательностей антисмысловой цепи приведен в таблице 3.

Скрининг in vitro на клетках Cos-7 (вектор с двойной люциферазой psiCHECK), на первичных гепатоцитах человека и первичных гепатоцитах обезьяны Cynomolgus

Культура клеток и трансфекции:

Клетки Cos-7 (ATCC) трансфектировали добавлением 5 мкл с концентрацией 1 нг/мкл, разведенного в Opti-MEM, вектора HSD17B13 psiCHECK2 (Blue Heron Biotechnology), 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл липофектамина 2000 на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, cat # 11668-019) до 5 мкл дуплексов миРНК на лунку с 4 повторами для каждого дуплекса миРНК в 384-луночный планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляли 35 мкл среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (ThermoFisher), содержащей 5×10^3 клеток. Клетки инкубировали в течение 48 ч, после чего проводили измерения люциферазы светлячка (контроль трансфекции) и люциферазы Renilla (слитой с последовательностью-мишенью). Эксперименты с однократной концентрацией проводили при 50 нМ.

Первичные гепатоциты человека (BioIVT) трансфектировали добавлением 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл RNAiMAX на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, кат. № 13778-150) к 5 мкл дуплексов миРНК на лунку, с 4 повторами для каждого дуплекса миРНК в 384-

луночный планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляли 50 мкл посевной среды InVitroGRO CP (BioIVT), содержащей 15×10^3 клеток. Клетки инкубировали в течение 48 ч перед выделением РНК. Эксперименты с однократной дозой проводили при 50 нМ.

Первичные гепатоциты обезьяны Cynomolgus (BioIVT) трансфектировали добавлением 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл RNAiMAX на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, кат. № 13778-150) к 5 мкл дуплексов миРНК на лунку с 4 повторами для каждого дуплекса миРНК в 384-луночный планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляли 50 мкл посевной среды InVitroGRO CP (BioIVT), содержащей 5×10^3 клеток. Клетки инкубировали в течение 48 ч перед выделением РНК. Эксперименты с однократной дозой проводили при 50 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора для выделения мРНК DYNABEADS:

РНК выделяли с использованием автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с использованием DYNABEAD (Invitrogen, кат. № 61012). Вкратце, 70 мкл буфера для лизиса/связывания и 10 мкл буфера для лизиса, содержащего 3 мкл магнитных шариков, добавляли в планшет с клетками. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, затем магнитные шарики захватывали и удаляли супернатант. Связанную с шариками РНК затем промывали 2 раза 150 мкл буфера для промывания А и один раз буфером для промывания В. Затем шарики промывали 150 мкл буфера для элюирования, повторно захватывали и удаляли супернатант.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК ABI High capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, кат. № 4368813):

К РНК, выделенной как описано выше, добавляли 10 мкл мастер-смеси, содержащей 1 мкл 10× буфера, 0,4 мкл 25× dNTP, 1 мкл 10× случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H_2O на реакцию. Планшеты герметично закрывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, и затем в течение 2 ч при 37°С.

ПЦР в режиме реального времени:

2 мкл кДНК и 5 мкл мастер-смеси зонда Lightcycler 480 (Roche Cat # 04887301001) добавляли либо к 0,5 мкл зонда TaqMan для человеческого GAPDH (4326317E), либо к 0,5 мкл HSD17B13 человеческого зонда (Hs01068199_m1, Thermo) или 0,5 мкл Cyno GAPDH и 0,5 мкл зонда HSD17B13 Cyno (Mf02888851_m1, Thermo) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche кат. №04887301001). ПЦР в режиме реального времени проводили в системе LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали не менее двух раз, и данные нормализовали для клеток, трансфектированных нецелевой контрольной миРНК. Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием метода ΔΔCt и нормализовали по результатам анализов, проведенных с клетками, трансфектированными нецелевой контрольной миРНК.

Результаты

В таблице 4 приведены результаты скрининга однократной дозы 50 нМ на клетках Cos-7 (вектор двойной люциферазы psiCHECK2), трансфектированных указанными средствами на основе иРНК. Данные выражены в процентах оставшихся транскриптов относительно необработанных клеток.

В таблице 5 приведены результаты скрининга однократной дозы 50 нМ на первичных гепатоцитах человека, трансфектированных указанными средствами на основе иРНК. Данные выражены в процентах оставшихся транскриптов относительно необработанных клеток.

В таблице 6 приведены результаты скрининга однократной дозы 50 нМ на первичных гепатоцитах обезьяны Cynomolgus, трансфектированных указанными средствами на основе иРНК. Данные выражены в процентах оставшихся транскриптов относительно необработанных клеток.

Таблица 1: Сокращенные обозначения нуклеотидных мономеров, использованных в представлении последовательностей нуклеиновой кислоты.

Будет понятно, что эти мономеры, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, связаны между собой 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Таблица 1

Сокращенное обозначение	**Нуклеотид(ы)**
A	Аденозин-3’-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3’-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3’-фосфоротиоат
Af	2’-фтораденозин-3’-фосфат
Afs	2’-фтораденозин-3’-фосфоротиоат
As	аденозин-3’-фосфоротиоат
C	цитидин-3’-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3’-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфоротиоат
Cf	2’-фторцитидин-3’-фосфат
Cfs	2’-фторцитидин-3’-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3’-фосфоротиоат
G	гуанозин-3’-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3’-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3’-фосфоротиоат
Gf	2’-фторгуанозин-3’-фосфат
Gfs	2’-фторгуанозин-3’-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3’-фосфоротиоат
T	5’-метилуридин-3’-фосфат
Tf	2’-фтор-5-метилуридин-3’-фосфат
Tfs	2’-фтор-5-метилуридин-3’-фосфоротиоат
Ts	5-метилуридин-3’-фосфоротиоат
U	уридин-3’-фосфат
Uf	2’-фторуридин-3’-фосфат
Ufs	2’-фторуридин-3’-фосфоротиоат
Us	уридин-3’-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-O-метиладенозин-3’-фосфат
as	2'-O-метиладенозин-3’-фосфоротиоат
c	2'-O-метилцитидин-3’-фосфат
cs	2'-O-метилцитидин-3’-фосфоротиоат

g	2'-O-метилгуанозин-3’-фосфат
gs	2'-O-метилгуанозин-3’-фосфоротиоат
t	2’-O-метил-5-метилуридин-3’-фосфат
ts	2’-O-метил-5-метилуридин-3’-фосфоротиоат
u	2'-O-метилуридин-3’-фосфат
us	2'-O-метилуридин-3’-фосфоротиоат
s	фосфоротиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)амидодеканоил)]-4-гидроксипролинол
P	фосфат
VP	винилфосфат
dA	2’-дезоксиаденозин-3’-фосфат
dAs	2’-дезоксиаденозин-3’-фосфоротиоат
dC	2’-дезоксицитидин-3’-фосфат
dCs	2’-дезоксицитидин-3’-фосфоротиоат
dG	2’-дезоксигуанозин-3’-фосфат
dGs	2’-дезоксигуанозин-3’-фосфоротиоат
dT	2’-дезокситимидин-3’-фосфат
dTs	2’-дезокситимидин-3’-фосфоротиоат
dU	2’-дезоксиуридин
dUs	2’-дезоксиуридин-3’-фосфоротиоат
Y34	2-гидроксиметилтетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (без азотистого основания 2'-OMe фураноза)
Y44	инвертированная без азотистого основания ДНК (2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат)
(Agn)	аденозингликоль нуклеиновая кислота (GNA)
(Cgn)	цитидингликоль нуклеиновая кислота (GNA)
(Ggn)	гуанозингликоль нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	тимидингликоль нуклеиновая кислота (GNA) S-изомер
(Aam)	2’-O-(N-метилацетамид)аденозин-3’-фосфат
(Aams)	2’-O-(N-метилацетамид)аденозин-3’-фосфоротиоат
(Gam)	2’-O-(N-метилацетамид)гуанозин-3’-фосфат
(Gams)	2’-O-(N-метилацетамид)гуанозин-3’-фосфоротиоат
(Tam)	2’-O-(N-метилацетамид)тимидин-3’-фосфат
(Tams)	2’-O-(N-метилацетамид)тимидин-3’-фосфоротиоат

(Aeo)	2’-O-метоксиэтиладенозин-3’-фосфат
(Aeos)	2’-O-метоксиэтиладенозин-3’-фосфоротиоат
(Geo)	2’-O-метоксиэтилгуанозин -3’-фосфат
(Geos)	2’-O- метоксиэтилгуанозин-3’-фосфоротиоат
(Teo)	2’-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3’-фосфат
(Teos)	2’-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3’-фосфоротиоат
(m5Ceo)	2’-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3’-фосфат
(m5Ceos)	2’-O-метоксиэтил-5-метлцитидин-3’-фосфоротиоат
(A3m)	3’-O-метиладенозин-2’-фосфат
(A3mx)	3’-O-метилксилофуранозиладенозин-2’-фосфат
(G3m)	3’-O-метилгуанозин-2’-фосфат
(G3mx)	3’-O- метилксилофуранозилгуанозин-2’-фосфат
(C3m)	3’-O-метилцитидин-2’-фосфат
(C3mx)	3’-O-метилксилофуранозилцитидин-2’-фосфат
(U3m)	3’-O-метилуридин-2’-фосфат
U3mx)	3’-O- метилксилофуранозилуридин-2’-фосфат
(m5Cam)	2’-O-(N-меилацетамид)-5-метилцитидин-3’-фосфат
(m5Cams)	2’-O-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3’-фосфоротиоат
(Chd)	2'-O-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-O-гексадецилцитидин-3'-фосфоротиоат
(Uhd)	2'-O-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-O-гексадецилуридин-3'-фосфоротиоат
(pshe)	гидроксиэтилфосфоротиоат

[1]Химическая структура L96 является следующей:

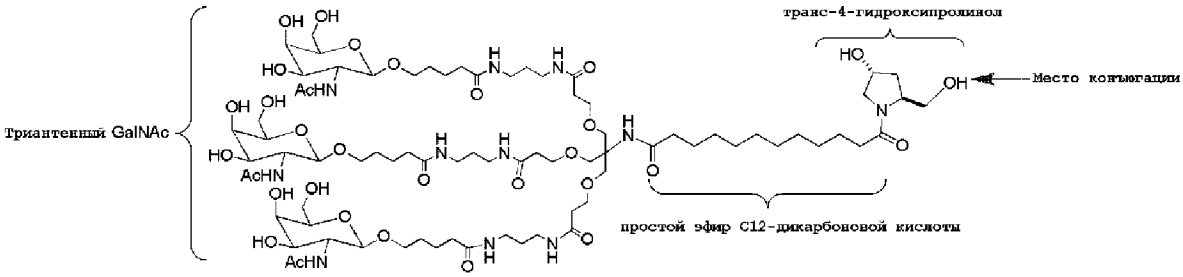


Таблица 2

Немодифицированные последовательности HSD17B13

Название дуплекса	SEQ ID NO:	Последовательность смысловой цепи 5’ к 3’	Пределы в NM_178135.4	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой цепи 5’ к 3’	Пределы в NM_178135.4
AD-238911.1	3003	CAGUACCUCCUCCCUAGGACU	4-24	3299	AGUCCUAGGGAGGAGGUACUGUC	2-24
AD-238912.1	3004	AGUACCUCCUCCCUAGGACUA	5-25	3300	UAGUCCUAGGGAGGAGGUACUGU	3-25
AD-238913.1	3005	GUACCUCCUCCCUAGGACUAA	6-26	3301	UUAGUCCUAGGGAGGAGGUACUG	4-26
AD-238929.1	3006	ACUACACAAGGACUGAACCAA	22-42	3302	UUGGUUCAGUCCUUGUGUAGUCC	20-42
AD-238930.1	3007	CUACACAAGGACUGAACCAGA	23-43	3303	UCUGGUUCAGUCCUUGUGUAGUC	21-43
AD-238932.1	3008	ACACAAGGACUGAACCAGAAA	25-45	3304	UUUCUGGUUCAGUCCUUGUGUAG	23-45
AD-238960.1	3009	CAGAGCAAAGCCAUGAACAUA	54-74	3305	UAUGUUCAUGGCUUUGCUCUGUC	52-74
AD-238979.1	3010	UCAUCCUAGAAAUCCUUCUGA	73-93	3306	UCAGAAGGAUUUCUAGGAUGAUG	71-93
AD-238991.1	3011	UCCUUCUGCUUCUGAUCACCA	85-105	3307	UGGUGAUCAGAAGCAGAAGGAUU	83-105

AD-239009.1	3012	CCAUCAUCUACUCCUACUUGA	103-123	3308	UCAAGUAGGAGUAGAUGAUGGUG	101-123
AD-239015.1	3013	UCUACUCCUACUUGGAGUCGU	109-129	3309	ACGACUCCAAGUAGGAGUAGAUG	107-129
AD-239016.1	3014	CUACUCCUACUUGGAGUCGUU	110-130	3310	AACGACUCCAAGUAGGAGUAGAU	108-130
AD-239017.1	3015	UACUCCUACUUGGAGUCGUUA	111-131	3311	UAACGACUCCAAGUAGGAGUAGA	109-131
AD-239018.1	3016	ACUCCUACUUGGAGUCGUUGA	112-132	3312	UCAACGACUCCAAGUAGGAGUAG	110-132
AD-239019.1	3017	CUCCUACUUGGAGUCGUUGGU	113-133	3313	ACCAACGACUCCAAGUAGGAGUA	111-133
AD-239020.1	3018	UCCUACUUGGAGUCGUUGGUA	114-134	3314	UACCAACGACUCCAAGUAGGAGU	112-134
AD-239031.1	3019	GUCGUUGGUGAAGUUUUUCAU	125-145	3315	AUGAAAAACUUCACCAACGACUC	123-145
AD-239062.1	3020	GAGAUUGUUCUCAUUACUGGA	174-194	3316	UCCAGUAAUGAGAACAAUCUCCC	172-194
AD-239066.1	3021	UUGUUCUCAUUACUGGAGCUA	178-198	3317	UAGCUCCAGUAAUGAGAACAAUC	176-198
AD-239103.1	3022	GCAGACUACUUAUGAAUUUGA	215-235	3318	UCAAAUUCAUAAGUAGUCUGCCU	213-235

AD-239110.1	3023	ACUUAUGAAUUUGCAAAACGA	222-242	3319	UCGUUUUGCAAAUUCAUAAGUAG	220-242
AD-239118.1	3024	AUUUGCAAAACGACAGAGCAU	230-250	3320	AUGCUCUGUCGUUUUGCAAAUUC	228-250
AD-239119.1	3025	UUUGCAAAACGACAGAGCAUA	231-251	3321	UAUGCUCUGUCGUUUUGCAAAUU	229-251
AD-239131.1	3026	CAGAGCAUAUUGGUUCUGUGA	243-263	3322	UCACAGAACCAAUAUGCUCUGUC	241-263
AD-239132.1	3027	AGAGCAUAUUGGUUCUGUGGA	244-264	3323	UCCACAGAACCAAUAUGCUCUGU	242-264
AD-239133.1	3028	GAGCAUAUUGGUUCUGUGGGA	245-265	3324	UCCCACAGAACCAAUAUGCUCUG	243-265
AD-239146.1	3029	CUGUGGGAUAUUAAUAAGCGA	258-278	3325	UCGCUUAUUAAUAUCCCACAGAA	256-278
AD-239155.1	3030	AUUAAUAAGCGCGGUGUGGAA	267-287	3326	UUCCACACCGCGCUUAUUAAUAU	265-287
AD-239156.1	3031	UUAAUAAGCGCGGUGUGGAGA	268-288	3327	UCUCCACACCGCGCUUAUUAAUA	266-288
AD-239177.1	3032	AAACUGCAGCUGAGUGCCGAA	289-309	3328	UUCGGCACUCAGCUGCAGUUUCC	287-309
AD-239178.1	3033	AACUGCAGCUGAGUGCCGAAA	290-310	3329	UUUCGGCACUCAGCUGCAGUUUC	288-310

AD-239179.1	3034	ACUGCAGCUGAGUGCCGAAAA	291-311	3330	UUUUCGGCACUCAGCUGCAGUUU	289-311
AD-239180.1	3035	CUGCAGCUGAGUGCCGAAAAC	292-312	3331	GUUUUCGGCACUCAGCUGCAGUU	290-312
AD-239181.1	3036	UGCAGCUGAGUGCCGAAAACU	293-313	3332	AGUUUUCGGCACUCAGCUGCAGU	291-313
AD-239182.1	3037	GCAGCUGAGUGCCGAAAACUA	294-314	3333	UAGUUUUCGGCACUCAGCUGCAG	292-314
AD-239183.1	3038	CAGCUGAGUGCCGAAAACUAA	295-315	3334	UUAGUUUUCGGCACUCAGCUGCA	293-315
AD-239185.1	3039	GCUGAGUGCCGAAAACUAGGA	297-317	3335	UCCUAGUUUUCGGCACUCAGCUG	295-317
AD-239186.1	3040	CUGAGUGCCGAAAACUAGGCA	298-318	3336	UGCCUAGUUUUCGGCACUCAGCU	296-318
AD-239187.1	3041	UGAGUGCCGAAAACUAGGCGU	299-319	3337	ACGCCUAGUUUUCGGCACUCAGC	297-319
AD-239188.1	3042	GAGUGCCGAAAACUAGGCGUA	300-320	3338	UACGCCUAGUUUUCGGCACUCAG	298-320
AD-239189.1	3043	AGUGCCGAAAACUAGGCGUCA	301-321	3339	UGACGCCUAGUUUUCGGCACUCA	299-321
AD-239190.1	3044	GUGCCGAAAACUAGGCGUCAA	302-322	3340	UUGACGCCUAGUUUUCGGCACUC	300-322

AD-239191.1	3045	UGCCGAAAACUAGGCGUCACU	303-323	3341	AGUGACGCCUAGUUUUCGGCACU	301-323
AD-239192.1	3046	GCCGAAAACUAGGCGUCACUA	304-324	3342	UAGUGACGCCUAGUUUUCGGCAC	302-324
AD-239193.1	3047	CCGAAAACUAGGCGUCACUGA	305-325	3343	UCAGUGACGCCUAGUUUUCGGCA	303-325
AD-239194.1	3048	CGAAAACUAGGCGUCACUGCA	306-326	3344	UGCAGUGACGCCUAGUUUUCGGC	304-326
AD-239196.1	3049	AAAACUAGGCGUCACUGCGCA	308-328	3345	UGCGCAGUGACGCCUAGUUUUCG	306-328
AD-239198.1	3050	AACUAGGCGUCACUGCGCAUA	310-330	3346	UAUGCGCAGUGACGCCUAGUUUU	308-330
AD-239199.1	3051	ACUAGGCGUCACUGCGCAUGA	311-331	3347	UCAUGCGCAGUGACGCCUAGUUU	309-331
AD-239203.1	3052	GGCGUCACUGCGCAUGCGUAU	315-335	3348	AUACGCAUGCGCAGUGACGCCUA	313-335
AD-239214.1	3053	GCAUGCGUAUGUGGUAGACUA	326-346	3349	UAGUCUACCACAUACGCAUGCGC	324-346
AD-239215.1	3054	CAUGCGUAUGUGGUAGACUGA	327-347	3350	UCAGUCUACCACAUACGCAUGCG	325-347
AD-239239.1	3055	AACAGAGAAGAGAUCUAUCGA	351-371	3351	UCGAUAGAUCUCUUCUCUGUUGC	349-371

AD-239240.1	3056	ACAGAGAAGAGAUCU AUCGCU	352-372	3352	AGCGAUAGAUCUCUUCUCU GUUG	350-372
AD-239241.1	3057	CAGAGAAGAGAUCUA UCGCUA	353-373	3353	UAGCGAUAGAUCUCUUCUC UGUU	351-373
AD-239242.1	3058	AGAGAAGAGAUCUAU CGCUCU	354-374	3354	AGAGCGAUAGAUCUCUUCU CUGU	352-374
AD-239243.1	3059	GAGAAGAGAUCUAUC GCUCUA	355-375	3355	UAGAGCGAUAGAUCUCUUC UCUG	353-375
AD-239245.1	3060	GAAGAGAUCUAUCGCU CUCUA	357-377	3356	UAGAGAGCGAUAGAUCUCU UCUC	355-377
AD-239246.1	3061	AAGAGAUCUAUCGCUC UCUAA	358-378	3357	UUAGAGAGCGAUAGAUCUC UUCU	356-378
AD-239247.1	3062	AGAGAUCUAUCGCUCU CUAAA	359-379	3358	UUUAGAGAGCGAUAGAUCU CUUC	357-379
AD-239250.1	3063	GAUCUAUCGCUCUCUA AAUCA	362-382	3359	UGAUUUAGAGAGCGAUAGA UCUC	360-382
AD-239251.1	3064	AUCUAUCGCUCUCUAA AUCAA	363-383	3360	UUGAUUUAGAGAGCGAUAG AUCU	361-383
AD-239253.1	3065	CUAUCGCUCUCUAAAU CAGGU	365-385	3361	ACCUGAUUUAGAGAGCGAU AGAU	363-385
AD-239254.1	3066	UAUCGCUCUCUAAAUC AGGUA	366-386	3362	UACCUGAUUUAGAGAGCGA UAGA	364-386

AD-239255.1	3067	AUCGCUCUCUAAAUCAGGUGA	367-387	3363	UCACCUGAUUUAGAGAGCGAUAG	365-387
AD-239290.1	3068	GAUGUAACAAUCGUGGUGAAU	402-422	3364	AUUCACCACGAUUGUUACAUCAC	400-422
AD-239291.1	3069	AUGUAACAAUCGUGGUGAAUA	403-423	3365	UAUUCACCACGAUUGUUACAUCA	401-423
AD-239292.1	3070	UGUAACAAUCGUGGUGAAUAA	404-424	3366	UUAUUCACCACGAUUGUUACAUC	402-424
AD-239293.1	3071	GUAACAAUCGUGGUGAAUAAU	405-425	3367	AUUAUUCACCACGAUUGUUACAU	403-425
AD-239304.1	3072	GGUGAAUAAUGCUGGGACAGU	416-436	3368	ACUGUCCCAGCAUUAUUCACCAC	414-436
AD-239312.1	3073	AUGCUGGGACAGUAUAUCCAA	424-444	3369	UUGGAUAUACUGUCCCAGCAUUA	422-444
AD-239313.1	3074	UGCUGGGACAGUAUAUCCAGA	425-445	3370	UCUGGAUAUACUGUCCCAGCAUU	423-445
AD-239314.1	3075	GCUGGGACAGUAUAUCCAGCA	426-446	3371	UGCUGGAUAUACUGUCCCAGCAU	424-446
AD-239316.1	3076	UGGGACAGUAUAUCCAGCCGA	428-448	3372	UCGGCUGGAUAUACUGUCCCAGC	426-448
AD-239317.1	3077	GGGACAGUAUAUCCAGCCGAU	429-449	3373	AUCGGCUGGAUAUACUGUCCCAG	427-449

AD-239318.1	3078	GGACAGUAUAUCCAGCCGAUA	430-450	3374	UAUCGGCUGGAUAUACUGUCCCA	428-450
AD-239321.1	3079	CAGUAUAUCCAGCCGAUCUUA	433-453	3375	UAAGAUCGGCUGGAUAUACUGUC	431-453
AD-239332.1	3080	GCCGAUCUUCUCAGCACCAAA	444-464	3376	UUUGGUGCUGAGAAGAUCGGCUG	442-464
AD-239337.1	3081	UCUUCUCAGCACCAAGGAUGA	449-469	3377	UCAUCCUUGGUGCUGAGAAGAUC	447-469
AD-239348.1	3082	CCAAGGAUGAAGAGAUUACCA	460-480	3378	UGGUAAUCUCUUCAUCCUUGGUG	458-480
AD-239362.1	3083	AUUACCAAGACAUUUGAGGUA	474-494	3379	UACCUCAAAUGUCUUGGUAAUCU	472-494
AD-239366.1	3084	CCAAGACAUUUGAGGUCAACA	478-498	3380	UGUUGACCUCAAAUGUCUUGGUA	476-498
AD-239368.1	3085	AAGACAUUUGAGGUCAACAUA	480-500	3381	UAUGUUGACCUCAAAUGUCUUGG	478-500
AD-239372.1	3086	CAUUUGAGGUCAACAUCCUAA	484-504	3382	UUAGGAUGUUGACCUCAAAUGUC	482-504
AD-239373.1	3087	AUUUGAGGUCAACAUCCUAGA	485-505	3383	UCUAGGAUGUUGACCUCAAAUGU	483-505
AD-239379.1	3088	GGUCAACAUCCUAGGACAUUU	491-511	3384	AAAUGUCCUAGGAUGUUGACCUC	489-511

AD-239380.1	3089	GUCAACAUCCUAGGAC AUUUU	492-512	3385	AAAAUGUCCUAGGAUGUUG ACCU	490-512
AD-239387.1	3090	UCCUAGGACAUUUUUG GAUCA	499-519	3386	UGAUCCAAAAAUGUCCUAG GAUG	497-519
AD-239397.1	3091	UUUUUGGAUCACAAA AGCACU	509-529	3387	AGUGCUUUUGUGAUCCAAA AAUG	507-529
AD-239411.1	3092	AAGCACUUCUUCCAUC GAUGA	523-543	3388	UCAUCGAUGGAAGAAGUGC UUUU	521-543
AD-239412.1	3093	AGCACUUCUUCCAUCG AUGAU	524-544	3389	AUCAUCGAUGGAAGAAGUG CUUU	522-544
AD-239431.1	3094	AUGGAGAGAAAUCAU GGCCAA	543-563	3390	UUGGCCAUGAUUUCUCUCC AUCA	541-563
AD-239433.1	3095	GGAGAGAAAUCAUGG CCACAU	545-565	3391	AUGUGGCCAUGAUUUCUCU CCAU	543-565
AD-239436.1	3096	GAGAAAUCAUGGCCAC AUCGU	548-568	3392	ACGAUGUGGCCAUGAUUUC UCUC	546-568
AD-239437.1	3097	AGAAAUCAUGGCCACA UCGUA	549-569	3393	UACGAUGUGGCCAUGAUUU CUCU	547-569
AD-239438.1	3098	GAAAUCAUGGCCACAU CGUCA	550-570	3394	UGACGAUGUGGCCAUGAUU UCUC	548-570
AD-239439.1	3099	AAAUCAUGGCCACAUC GUCAA	551-571	3395	UUGACGAUGUGGCCAUGAU UUCU	549-571

AD-239450.1	3100	ACAUCGUCACAGUGGCUUCAA	562-582	3396	UUGAAGCCACUGUGACGAUGUGG	560-582
AD-239451.1	3101	CAUCGUCACAGUGGCUUCAGU	563-583	3397	ACUGAAGCCACUGUGACGAUGUG	561-583
AD-239452.1	3102	AUCGUCACAGUGGCUUCAGUA	564-584	3398	UACUGAAGCCACUGUGACGAUGU	562-584
AD-239453.1	3103	UCGUCACAGUGGCUUCAGUGU	565-585	3399	ACACUGAAGCCACUGUGACGAUG	563-585
AD-239475.1	3104	CGGCCACGAAGGGAUUCCUUA	587-607	3400	UAAGGAAUCCCUUCGUGGCCGCA	585-607
AD-239476.1	3105	GGCCACGAAGGGAUUCCUUAA	588-608	3401	UUAAGGAAUCCCUUCGUGGCCGC	586-608
AD-239478.1	3106	CCACGAAGGGAUUCCUUACCU	590-610	3402	AGGUAAGGAAUCCCUUCGUGGCC	588-610
AD-239479.1	3107	CACGAAGGGAUUCCUUACCUA	591-611	3403	UAGGUAAGGAAUCCCUUCGUGGC	589-611
AD-239480.1	3108	ACGAAGGGAUUCCUUACCUCA	592-612	3404	UGAGGUAAGGAAUCCCUUCGUGG	590-612
AD-239482.1	3109	GAAGGGAUUCCUUACCUCAUA	594-614	3405	UAUGAGGUAAGGAAUCCCUUCGU	592-614
AD-239483.1	3110	AAGGGAUUCCUUACCUCAUCA	595-615	3406	UGAUGAGGUAAGGAAUCCCUUCG	593-615

AD-239499.1	3111	CAUCCCAUAUUGUUCCAGCAA	611-631	3407	UUGCUGGAACAAUAUGGGAUGAG	609-631
AD-239510.1	3112	GUUCCAGCAAAUUUGCCGCUA	622-642	3408	UAGCGGCAAAUUUGCUGGAACAA	620-642
AD-239520.1	3113	AUUUGCCGCUGUUGGCUUUCA	632-652	3409	UGAAAGCCAACAGCGGCAAAUUU	630-652
AD-239521.1	3114	UUUGCCGCUGUUGGCUUUCAA	633-653	3410	UUGAAAGCCAACAGCGGCAAAUU	631-653
AD-239522.1	3115	UUGCCGCUGUUGGCUUUCACA	634-654	3411	UGUGAAAGCCAACAGCGGCAAAU	632-654
AD-239534.1	3116	GCUUUCACAGAGGUCUGACAU	646-666	3412	AUGUCAGACCUCUGUGAAAGCCA	644-666
AD-239539.1	3117	CACAGAGGUCUGACAUCAGAA	651-671	3413	UUCUGAUGUCAGACCUCUGUGAA	649-671
AD-239544.1	3118	AGGUCUGACAUCAGAACUUCA	656-676	3414	UGAAGUUCUGAUGUCAGACCUCU	654-676
AD-239566.1	3119	GCCUUGGGAAAAACUGGUAUA	678-698	3415	UAUACCAGUUUUUCCCAAGGCCU	676-698
AD-239578.1	3120	ACUGGUAUCAAAACCUCAUGU	690-710	3416	ACAUGAGGUUUUGAUACCAGUUU	688-710
AD-239579.1	3121	CUGGUAUCAAAACCUCAUGUA	691-711	3417	UACAUGAGGUUUUGAUACCAGUU	689-711

AD-239611.1	3122	UUUGUGAAUACUGGGUUCACA	723-743	3418	UGUGAACCCAGUAUUCACAAAAA	721-743
AD-239612.1	3123	UUGUGAAUACUGGGUUCACCA	724-744	3419	UGGUGAACCCAGUAUUCACAAAA	722-744
AD-239613.1	3124	UGUGAAUACUGGGUUCACCAA	725-745	3420	UUGGUGAACCCAGUAUUCACAAA	723-745
AD-239617.1	3125	AAUACUGGGUUCACCAAAAAU	729-749	3421	AUUUUUGGUGAACCCAGUAUUCA	727-749
AD-239618.1	3126	AUACUGGGUUCACCAAAAAUA	730-750	3422	UAUUUUUGGUGAACCCAGUAUUC	728-750
AD-239637.1	3127	UCCAAGCACAAGAUUAUGGCA	749-769	3423	UGCCAUAAUCUUGUGCUUGGAUU	747-769
AD-239641.1	3128	AGCACAAGAUUAUGGCCUGUA	753-773	3424	UACAGGCCAUAAUCUUGUGCUUG	751-773
AD-239642.1	3129	GCACAAGAUUAUGGCCUGUAU	754-774	3425	AUACAGGCCAUAAUCUUGUGCUU	752-774
AD-239643.1	3130	CACAAGAUUAUGGCCUGUAUU	755-775	3426	AAUACAGGCCAUAAUCUUGUGCU	753-775
AD-239645.1	3131	CAAGAUUAUGGCCUGUAUUGA	757-777	3427	UCAAUACAGGCCAUAAUCUUGUG	755-777
AD-239647.1	3132	AGAUUAUGGCCUGUAUUGGAA	759-779	3428	UUCCAAUACAGGCCAUAAUCUUG	757-779

AD-239649.1	3133	AUUAUGGCCUGUAUUGGAGAA	761-781	3429	UUCUCCAAUACAGGCCAUAAUCU	759-781
AD-239650.1	3134	UUAUGGCCUGUAUUGGAGACA	762-782	3430	UGUCUCCAAUACAGGCCAUAAUC	760-782
AD-239653.1	3135	UGGCCUGUAUUGGAGACAGAU	765-785	3431	AUCUGUCUCCAAUACAGGCCAUA	763-785
AD-239654.1	3136	GGCCUGUAUUGGAGACAGAUA	766-786	3432	UAUCUGUCUCCAAUACAGGCCAU	764-786
AD-239662.1	3137	UUGGAGACAGAUGAAGUCGUA	774-794	3433	UACGACUUCAUCUGUCUCCAAUA	772-794
AD-239668.1	3138	ACAGAUGAAGUCGUAAGAAGU	780-800	3434	ACUUCUUACGACUUCAUCUGUCU	778-800
AD-239669.1	3139	CAGAUGAAGUCGUAAGAAGUA	781-801	3435	UACUUCUUACGACUUCAUCUGUC	779-801
AD-239670.1	3140	AGAUGAAGUCGUAAGAAGUCU	782-802	3436	AGACUUCUUACGACUUCAUCUGU	780-802
AD-239671.1	3141	GAUGAAGUCGUAAGAAGUCUA	783-803	3437	UAGACUUCUUACGACUUCAUCUG	781-803
AD-239674.1	3142	GAAGUCGUAAGAAGUCUGAUA	786-806	3438	UAUCAGACUUCUUACGACUUCAU	784-806
AD-239676.1	3143	AGUCGUAAGAAGUCUGAUAGA	788-808	3439	UCUAUCAGACUUCUUACGACUUC	786-808

AD-239681.1	3144	UAAGAAGUCUGAUAG AUGGAA	793-813	3440	UUCCAUCUAUCAGACUUCU UACG	791-813
AD-239682.1	3145	AAGAAGUCUGAUAGA UGGAAU	794-814	3441	AUUCCAUCUAUCAGACUUC UUAC	792-814
AD-239684.1	3146	GAAGUCUGAUAGAUG GAAUAA	796-816	3442	UUAUUCCAUCUAUCAGACU UCUU	794-816
AD-239685.1	3147	AAGUCUGAUAGAUGG AAUACU	797-817	3443	AGUAUUCCAUCUAUCAGAC UUCU	795-817
AD-239697.1	3148	UGGAAUACUUACCAAU AAGAA	809-829	3444	UUCUUAUUGGUAAGUAUUC CAUC	807-829
AD-239713.1	3149	AAUGAUUUUUGUUCC AUCGUA	830-850	3445	UACGAUGGAACAAAAAUCA UUUU	828-850
AD-239714.1	3150	AUGAUUUUUGUUCCA UCGUAU	831-851	3446	AUACGAUGGAACAAAAAUC AUUU	829-851
AD-239717.1	3151	AUUUUUGUUCCAUCGU AUAUA	834-854	3447	UAUAUACGAUGGAACAAAA AUCA	832-854
AD-239721.1	3152	UUGUUCCAUCGUAUAU CAAUA	838-858	3448	UAUUGAUAUACGAUGGAAC AAAA	836-858
AD-239723.1	3153	GUUCCAUCGUAUAUCA AUAUA	840-860	3449	UAUAUUGAUAUACGAUGGA ACAA	838-860
AD-239724.1	3154	UUCCAUCGUAUAUCAA UAUCU	841-861	3450	AGAUAUUGAUAUACGAUGG AACA	839-861

AD-239725.1	3155	UCCAUCGUAUAUCAAUAUCUU	842-862	3451	AAGAUAUUGAUAUACGAUGGAAC	840-862
AD-239726.1	3156	CCAUCGUAUAUCAAUAUCUUU	843-863	3452	AAAGAUAUUGAUAUACGAUGGAA	841-863
AD-239755.1	3157	ACAGAAGUUUCUUCCUGAACA	872-892	3453	UGUUCAGGAAGAAACUUCUGUAG	870-892
AD-239757.1	3158	AGAAGUUUCUUCCUGAACGCA	874-894	3454	UGCGUUCAGGAAGAAACUUCUGU	872-894
AD-239759.1	3159	AAGUUUCUUCCUGAACGCGCA	876-896	3455	UGCGCGUUCAGGAAGAAACUUCU	874-896
AD-239761.1	3160	GUUUCUUCCUGAACGCGCCUA	878-898	3456	UAGGCGCGUUCAGGAAGAAACUU	876-898
AD-239764.1	3161	UCUUCCUGAACGCGCCUCAGA	881-901	3457	UCUGAGGCGCGUUCAGGAAGAAA	879-901
AD-239778.1	3162	CCUCAGCGAUUUUAAAUCGUA	895-915	3458	UACGAUUUAAAAUCGCUGAGGCG	893-915
AD-239779.1	3163	CUCAGCGAUUUUAAAUCGUAU	896-916	3459	AUACGAUUUAAAAUCGCUGAGGC	894-916
AD-239780.1	3164	UCAGCGAUUUUAAAUCGUAUA	897-917	3460	UAUACGAUUUAAAAUCGCUGAGG	895-917
AD-239781.1	3165	CAGCGAUUUUAAAUCGUAUGA	898-918	3461	UCAUACGAUUUAAAAUCGCUGAG	896-918

AD-239782.1	3166	AGCGAUUUUAAAUCG UAUGCA	899-919	3462	UGCAUACGAUUUAAAAUCG CUGA	897-919
AD-239783.1	3167	GCGAUUUUAAAUCGU AUGCAA	900-920	3463	UUGCAUACGAUUUAAAAUC GCUG	898-920
AD-239784.1	3168	CGAUUUUAAAUCGUA UGCAGA	901-921	3464	UCUGCAUACGAUUUAAAAU CGCU	899-921
AD-239785.1	3169	GAUUUUAAAUCGUAU GCAGAA	902-922	3465	UUCUGCAUACGAUUUAAAA UCGC	900-922
AD-239786.1	3170	AUUUUAAAUCGUAUG CAGAAU	903-923	3466	AUUCUGCAUACGAUUUAAA AUCG	901-923
AD-239787.1	3171	UUUUAAAUCGUAUGC AGAAUA	904-924	3467	UAUUCUGCAUACGAUUUAA AAUC	902-924
AD-239791.1	3172	AAAUCGUAUGCAGAA UAUUCA	908-928	3468	UGAAUAUUCUGCAUACGAU UUAA	906-928
AD-239793.1	3173	AUCGUAUGCAGAAUA UUCAAU	910-930	3469	AUUGAAUAUUCUGCAUACG AUUU	908-930
AD-239806.1	3174	UAUUCAAUUUGAAGC AGUGGU	923-943	3470	ACCACUGCUUCAAAUUGAA UAUU	921-943
AD-239839.1	3175	GAAUAAAUAAGCUCCA GCCAA	967-987	3471	UUGGCUGGAGCUUAUUUAU UCAU	965-987
AD-239840.1	3176	AAUAAAUAAGCUCCAG CCAGA	968-988	3472	UCUGGCUGGAGCUUAUUUA UUCA	966-988

AD-239854.1	3177	AGCCAGAGAUGUAUGCAUGAU	982-1002	3473	AUCAUGCAUACAUCUCUGGCUGG	980-1002
AD-239855.1	3178	GCCAGAGAUGUAUGCAUGAUA	983-1003	3474	UAUCAUGCAUACAUCUCUGGCUG	981-1003
AD-239876.1	3179	AUAUGAAUAGUUUCGAAUCAA	1007-1027	3475	UUGAUUCGAAACUAUUCAUAUCA	1005-1027
AD-239877.1	3180	UAUGAAUAGUUUCGAAUCAAU	1008-1028	3476	AUUGAUUCGAAACUAUUCAUAUC	1006-1028
AD-239881.1	3181	AAUAGUUUCGAAUCAAUGCUA	1012-1032	3477	UAGCAUUGAUUCGAAACUAUUCA	1010-1032
AD-239905.1	3182	UUCAGUCCUGAUAAUAUUAAA	1054-1074	3478	UUUAAUAUUAUCAGGACUGAAAA	1052-1074
AD-239914.1	3183	AAAAACAUUGGUUUGGCACUA	1072-1092	3479	UAGUGCCAAACCAAUGUUUUUAA	1070-1092
AD-239915.1	3184	AAAACAUUGGUUUGGCACUAA	1073-1093	3480	UUAGUGCCAAACCAAUGUUUUUA	1071-1093
AD-239941.1	3185	GUCAAACGAACAAGAUUAAUU	1099-1119	3481	AAUUAAUCUUGUUCGUUUGACUG	1097-1119
AD-239944.1	3186	AAACGAACAAGAUUAAUUACA	1102-1122	3482	UGUAAUUAAUCUUGUUCGUUUGA	1100-1122
AD-239945.1	3187	AACGAACAAGAUUAAUUACCU	1103-1123	3483	AGGUAAUUAAUCUUGUUCGUUUG	1101-1123

AD-239946.1	3188	ACGAACAAGAUUAAUUACCUA	1104-1124	3484	UAGGUAAUUAAUCUUGUUCGUUU	1102-1124
AD-239947.1	3189	CGAACAAGAUUAAUUACCUGU	1105-1125	3485	ACAGGUAAUUAAUCUUGUUCGUU	1103-1125
AD-239977.1	3190	UCUCAAGAAUAUUUACGUAGU	1135-1155	3486	ACUACGUAAAUAUUCUUGAGAAA	1133-1155
AD-239979.1	3191	UCAAGAAUAUUUACGUAGUUU	1137-1157	3487	AAACUACGUAAAUAUUCUUGAGA	1135-1157
AD-239980.1	3192	CAAGAAUAUUUACGUAGUUUU	1138-1158	3488	AAAACUACGUAAAUAUUCUUGAG	1136-1158
AD-239998.1	3193	UUUCAUAGGUCUGUUUUUCCU	1157-1177	3489	AGGAAAAACAGACCUAUGAAAAA	1155-1177
AD-240019.1	3194	UUCAUGCCUCUUAAAAACUUA	1178-1198	3490	UAAGUUUUUAAGAGGCAUGAAAG	1176-1198
AD-240031.1	3195	AAAAACUUCUGUGCUUACAUA	1190-1210	3491	UAUGUAAGCACAGAAGUUUUUAA	1188-1210
AD-240032.1	3196	AAAACUUCUGUGCUUACAUAA	1191-1211	3492	UUAUGUAAGCACAGAAGUUUUUA	1189-1211
AD-240033.1	3197	AAACUUCUGUGCUUACAUAAA	1192-1212	3493	UUUAUGUAAGCACAGAAGUUUUU	1190-1212
AD-240064.1	3198	UUUUUCCAUUUAAAGGUGGAA	1245-1265	3494	UUCCACCUUUAAAUGGAAAAAUA	1243-1265

AD-240090.1	3199	CUACCUCCCUAAAAGUAAAUA	1271-1291	3495	UAUUUACUUUUAGGGAGGUAGCU	1269-1291
AD-240091.1	3200	UACCUCCCUAAAAGUAAAUAA	1272-1292	3496	UUAUUUACUUUUAGGGAGGUAGC	1270-1292
AD-240108.1	3201	UACAAAGAGAACUUAUUUACA	1290-1310	3497	UGUAAAUAAGUUCUCUUUGUAUU	1288-1310
AD-240117.1	3202	AACUUAUUUACACAGGGAAGA	1299-1319	3498	UCUUCCCUGUGUAAAUAAGUUCU	1297-1319
AD-240124.1	3203	UUACACAGGGAAGGUUUAAGA	1306-1326	3499	UCUUAAACCUUCCCUGUGUAAAU	1304-1326
AD-240125.1	3204	UACACAGGGAAGGUUUAAGAA	1307-1327	3500	UUCUUAAACCUUCCCUGUGUAAA	1305-1327
AD-240126.1	3205	ACACAGGGAAGGUUUAAGACU	1308-1328	3501	AGUCUUAAACCUUCCCUGUGUAA	1306-1328
AD-240135.1	3206	AGGUUUAAGACUGUUCAAGUA	1317-1337	3502	UACUUGAACAGUCUUAAACCUUC	1315-1337
AD-240138.1	3207	UUUAAGACUGUUCAAGUAGCA	1320-1340	3503	UGCUACUUGAACAGUCUUAAACC	1318-1340
AD-240140.1	3208	UAAGACUGUUCAAGUAGCAUU	1322-1342	3504	AAUGCUACUUGAACAGUCUUAAA	1320-1342
AD-240142.1	3209	AGACUGUUCAAGUAGCAUUCA	1324-1344	3505	UGAAUGCUACUUGAACAGUCUUA	1322-1344

AD-240145.1	3210	CUGUUCAAGUAGCAUUCCAAU	1327-1347	3506	AUUGGAAUGCUACUUGAACAGUC	1325-1347
AD-240147.1	3211	GUUCAAGUAGCAUUCCAAUCU	1329-1349	3507	AGAUUGGAAUGCUACUUGAACAG	1327-1349
AD-240148.1	3212	UUCAAGUAGCAUUCCAAUCUA	1330-1350	3508	UAGAUUGGAAUGCUACUUGAACA	1328-1350
AD-240154.1	3213	UAGCAUUCCAAUCUGUAGCCA	1336-1356	3509	UGGCUACAGAUUGGAAUGCUACU	1334-1356
AD-240155.1	3214	AGCAUUCCAAUCUGUAGCCAU	1337-1357	3510	AUGGCUACAGAUUGGAAUGCUAC	1335-1357
AD-240156.1	3215	GCAUUCCAAUCUGUAGCCAUA	1338-1358	3511	UAUGGCUACAGAUUGGAAUGCUA	1336-1358
AD-240171.1	3216	GCCAUGCCACAGAAUAUCAAA	1353-1373	3512	UUUGAUAUUCUGUGGCAUGGCUA	1351-1373
AD-240172.1	3217	CCAUGCCACAGAAUAUCAACA	1354-1374	3513	UGUUGAUAUUCUGUGGCAUGGCU	1352-1374
AD-240192.1	3218	AAGAACACAGAAUGAGUGCAA	1374-1394	3514	UUGCACUCAUUCUGUGUUCUUGU	1372-1394
AD-240227.1	3219	GUUUCAGCAGGCAGCUUUAUA	1409-1429	3515	UAUAAAGCUGCCUGCUGAAACUU	1407-1429
AD-240228.1	3220	UUUCAGCAGGCAGCUUUAUCU	1410-1430	3516	AGAUAAAGCUGCCUGCUGAAACU	1408-1430

AD-240237.1	3221	GCAGCUUUAUCUCAACCUGGA	1419-1439	3517	UCCAGGUUGAGAUAAAGCUGCCU	1417-1439
AD-240245.1	3222	AUCUCAACCUGGACAUAUUUU	1427-1447	3518	AAAAUAUGUCCAGGUUGAGAUAA	1425-1447
AD-240276.1	3223	AUUUGAAAGAUUUCCCUAGCA	1458-1478	3519	UGCUAGGGAAAUCUUUCAAAUGC	1456-1478
AD-240278.1	3224	UUGAAAGAUUUCCCUAGCCUA	1460-1480	3520	UAGGCUAGGGAAAUCUUUCAAAU	1458-1480
AD-240279.1	3225	UGAAAGAUUUCCCUAGCCUCU	1461-1481	3521	AGAGGCUAGGGAAAUCUUUCAAA	1459-1481
AD-240280.1	3226	GAAAGAUUUCCCUAGCCUCUU	1462-1482	3522	AAGAGGCUAGGGAAAUCUUUCAA	1460-1482
AD-240308.1	3227	CAUUAGCCCAAAACGGUGCAA	1490-1510	3523	UUGCACCGUUUUGGGCUAAUGAA	1488-1510
AD-240309.1	3228	AUUAGCCCAAAACGGUGCAAA	1491-1511	3524	UUUGCACCGUUUUGGGCUAAUGA	1489-1511
AD-240310.1	3229	UUAGCCCAAAACGGUGCAACU	1492-1512	3525	AGUUGCACCGUUUUGGGCUAAUG	1490-1512
AD-240311.1	3230	UAGCCCAAAACGGUGCAACUA	1493-1513	3526	UAGUUGCACCGUUUUGGGCUAAU	1491-1513
AD-240312.1	3231	AGCCCAAAACGGUGCAACUCU	1494-1514	3527	AGAGUUGCACCGUUUUGGGCUAA	1492-1514

AD-240313.1	3232	GCCCAAAACGGUGCAACUCUA	1495-1515	3528	UAGAGUUGCACCGUUUUGGGCUA	1493-1515
AD-240315.1	3233	CCAAAACGGUGCAACUCUAUU	1497-1517	3529	AAUAGAGUUGCACCGUUUUGGGC	1495-1517
AD-240317.1	3234	AAAACGGUGCAACUCUAUUCU	1499-1519	3530	AGAAUAGAGUUGCACCGUUUUGG	1497-1519
AD-240318.1	3235	AAACGGUGCAACUCUAUUCUA	1500-1520	3531	UAGAAUAGAGUUGCACCGUUUUG	1498-1520
AD-240319.1	3236	AACGGUGCAACUCUAUUCUGA	1501-1521	3532	UCAGAAUAGAGUUGCACCGUUUU	1499-1521
AD-240322.1	3237	GGUGCAACUCUAUUCUGGACU	1504-1524	3533	AGUCCAGAAUAGAGUUGCACCGU	1502-1524
AD-240324.1	3238	UGCAACUCUAUUCUGGACUUU	1506-1526	3534	AAAGUCCAGAAUAGAGUUGCACC	1504-1526
AD-240326.1	3239	CAACUCUAUUCUGGACUUUAU	1508-1528	3535	AUAAAGUCCAGAAUAGAGUUGCA	1506-1528
AD-240327.1	3240	AACUCUAUUCUGGACUUUAUU	1509-1529	3536	AAUAAAGUCCAGAAUAGAGUUGC	1507-1529
AD-240333.1	3241	AUUCUGGACUUUAUUACUUGA	1515-1535	3537	UCAAGUAAUAAAGUCCAGAAUAG	1513-1535
AD-240364.1	3242	UGUAUAACUCUGAAGUCCACA	1546-1566	3538	UGUGGACUUCAGAGUUAUACAGA	1544-1566

AD-240365.1	3243	GUAUAACUCUGAAGUCCACCA	1547-1567	3539	UGGUGGACUUCAGAGUUAUACAG	1545-1567
AD-240375.1	3244	GAAGUCCACCAAAAGUGGACA	1557-1577	3540	UGUCCACUUUUGGUGGACUUCAG	1555-1577
AD-240378.1	3245	GUCCACCAAAAGUGGACCCUA	1560-1580	3541	UAGGGUCCACUUUUGGUGGACUU	1558-1580
AD-240381.1	3246	CACCAAAAGUGGACCCUCUAU	1563-1583	3542	AUAGAGGGUCCACUUUUGGUGGA	1561-1583
AD-240382.1	3247	ACCAAAAGUGGACCCUCUAUA	1564-1584	3543	UAUAGAGGGUCCACUUUUGGUGG	1562-1584
AD-240383.1	3248	CCAAAAGUGGACCCUCUAUAU	1565-1585	3544	AUAUAGAGGGUCCACUUUUGGUG	1563-1585
AD-240385.1	3249	AAAAGUGGACCCUCUAUAUUU	1567-1587	3545	AAAUAUAGAGGGUCCACUUUUGG	1565-1587
AD-240386.1	3250	AAAGUGGACCCUCUAUAUUUA	1568-1588	3546	UAAAUAUAGAGGGUCCACUUUUG	1566-1588
AD-240387.1	3251	AAGUGGACCCUCUAUAUUUCA	1569-1589	3547	UGAAAUAUAGAGGGUCCACUUUU	1567-1589
AD-240419.1	3252	AUACAUUAUGAAAGGUGACCA	1612-1632	3548	UGGUCACCUUUCAUAAUGUAUCU	1610-1632
AD-240420.1	3253	UACAUUAUGAAAGGUGACCGA	1613-1633	3549	UCGGUCACCUUUCAUAAUGUAUC	1611-1633

AD-240421.1	3254	ACAUUAUGAAAGGUG ACCGAA	1614-1634	3550	UUCGGUCACCUUUCAUAAU GUAU	1612-1634
AD-240422.1	3255	CAUUAUGAAAGGUGA CCGACU	1615-1635	3551	AGUCGGUCACCUUUCAUAA UGUA	1613-1635
AD-240423.1	3256	AUUAUGAAAGGUGAC CGACUA	1616-1636	3552	UAGUCGGUCACCUUUCAUA AUGU	1614-1636
AD-240431.1	3257	AGGUGACCGACUCUAU UUUAA	1624-1644	3553	UUAAAAUAGAGUCGGUCAC CUUU	1622-1644
AD-240446.1	3258	AUCUCAGAAUUUUAA GUUCUA	1645-1665	3554	UAGAACUUAAAAUUCUGAG AUUU	1643-1665
AD-240474.1	3259	CUUUCAUAUAUCCUUG GUCCA	1699-1719	3555	UGGACCAAGGAUAUAUGAA AGCA	1697-1719
AD-240475.1	3260	UUUCAUAUAUCCUUGG UCCCA	1700-1720	3556	UGGGACCAAGGAUAUAUGA AAGC	1698-1720
AD-240476.1	3261	UUCAUAUAUCCUUGGU CCCAA	1701-1721	3557	UUGGGACCAAGGAUAUAUG AAAG	1699-1721
AD-240490.1	3262	GUCCCAGAGAUGUUUA GACAA	1715-1735	3558	UUGUCUAAACAUCUCUGGG ACCA	1713-1735
AD-240494.1	3263	CAGAGAUGUUUAGAC AAUUUU	1719-1739	3559	AAAAUUGUCUAAACAUCUC UGGG	1717-1739
AD-240495.1	3264	AGAGAUGUUUAGACA AUUUUA	1720-1740	3560	UAAAAUUGUCUAAACAUCU CUGG	1718-1740

AD-240501.1	3265	GUUUAGACAAUUUUAGGCUCA	1726-1746	3561	UGAGCCUAAAAUUGUCUAAACAU	1724-1746
AD-240502.1	3266	UUUAGACAAUUUUAGGCUCAA	1727-1747	3562	UUGAGCCUAAAAUUGUCUAAACA	1725-1747
AD-240503.1	3267	UUAGACAAUUUUAGGCUCAAA	1728-1748	3563	UUUGAGCCUAAAAUUGUCUAAAC	1726-1748
AD-240504.1	3268	UAGACAAUUUUAGGCUCAAAA	1729-1749	3564	UUUUGAGCCUAAAAUUGUCUAAA	1727-1749
AD-240505.1	3269	AGACAAUUUUAGGCUCAAAAA	1730-1750	3565	UUUUUGAGCCUAAAAUUGUCUAA	1728-1750
AD-240507.1	3270	ACAAUUUUAGGCUCAAAAAUU	1732-1752	3566	AAUUUUUGAGCCUAAAAUUGUCU	1730-1752
AD-240512.1	3271	UUUAGGCUCAAAAAUUAAAGA	1737-1757	3567	UCUUUAAUUUUUGAGCCUAAAAU	1735-1757
AD-240513.1	3272	UUAGGCUCAAAAAUUAAAGCU	1738-1758	3568	AGCUUUAAUUUUUGAGCCUAAAA	1736-1758
AD-240514.1	3273	UAGGCUCAAAAAUUAAAGCUA	1739-1759	3569	UAGCUUUAAUUUUUGAGCCUAAA	1737-1759
AD-240538.1	3274	CAGGAAAAGGAACUGUACUGA	1763-1783	3570	UCAGUACAGUUCCUUUUCCUGUG	1761-1783
AD-240540.1	3275	GGAAAAGGAACUGUACUGGCU	1765-1785	3571	AGCCAGUACAGUUCCUUUUCCUG	1763-1785

AD-240542.1	3276	AAAAGGAACUGUACUGGCUAU	1767-1787	3572	AUAGCCAGUACAGUUCCUUUUCC	1765-1787
AD-240545.1	3277	AGGAACUGUACUGGCUAUUAA	1770-1790	3573	UUAAUAGCCAGUACAGUUCCUUU	1768-1790
AD-240546.1	3278	GGAACUGUACUGGCUAUUACA	1771-1791	3574	UGUAAUAGCCAGUACAGUUCCUU	1769-1791
AD-240779.1	3279	UAAUCCGACUCCCACUACAUA	2181-2201	3575	UAUGUAGUGGGAGUCGGAUUAUU	2179-2201
AD-240782.1	3280	UCCGACUCCCACUACAUCAAA	2184-2204	3576	UUUGAUGUAGUGGGAGUCGGAUU	2182-2204
AD-240787.1	3281	CUCCCACUACAUCAAGACUAA	2189-2209	3577	UUAGUCUUGAUGUAGUGGGAGUC	2187-2209
AD-240788.1	3282	UCCCACUACAUCAAGACUAAU	2190-2210	3578	AUUAGUCUUGAUGUAGUGGGAGU	2188-2210
AD-240789.1	3283	CCCACUACAUCAAGACUAAUA	2191-2211	3579	UAUUAGUCUUGAUGUAGUGGGAG	2189-2211
AD-240790.1	3284	CCACUACAUCAAGACUAAUCU	2192-2212	3580	AGAUUAGUCUUGAUGUAGUGGGA	2190-2212
AD-240792.1	3285	ACUACAUCAAGACUAAUCUUA	2194-2214	3581	UAAGAUUAGUCUUGAUGUAGUGG	2192-2214
AD-240793.1	3286	CUACAUCAAGACUAAUCUUGU	2195-2215	3582	ACAAGAUUAGUCUUGAUGUAGUG	2193-2215
AD-240794.1	3287	UACAUCAAGACUAAUC	2196-2216	3583	AACAAGAUUAGUCUUGAUG	2194-2216

		UUGUU			UAGU	
AD-240795.1	3288	ACAUCAAGACUAAUCUUGUUU	2197-2217	3584	AAACAAGAUUAGUCUUGAUGUAG	2195-2217
AD-240826.1	3289	GUAUUAUAGAAUGCUUUUGCA	2234-2254	3585	UGCAAAAGCAUUCUAUAAUACAU	2232-2254
AD-240830.1	3290	UAUAGAAUGCUUUUGCAUGGA	2238-2258	3586	UCCAUGCAAAAGCAUUCUAUAAU	2236-2258
AD-240833.1	3291	AGAAUGCUUUUGCAUGGACUA	2241-2261	3587	UAGUCCAUGCAAAAGCAUUCUAU	2239-2261
AD-240834.1	3292	GAAUGCUUUUGCAUGGACUAU	2242-2262	3588	AUAGUCCAUGCAAAAGCAUUCUA	2240-2262
AD-240837.1	3293	UGCUUUUGCAUGGACUAUCCU	2245-2265	3589	AGGAUAGUCCAUGCAAAAGCAUU	2243-2265
AD-240839.1	3294	CUUUUGCAUGGACUAUCCUCU	2247-2267	3590	AGAGGAUAGUCCAUGCAAAAGCA	2245-2267
AD-240843.1	3295	UGCAUGGACUAUCCUCUUGUU	2251-2271	3591	AACAAGAGGAUAGUCCAUGCAAA	2249-2271
AD-240844.1	3296	GCAUGGACUAUCCUCUUGUUU	2252-2272	3592	AAACAAGAGGAUAGUCCAUGCAA	2250-2272
AD-240871.1	3297	AAAUAACCUCUUGUAGUUAUA	2349-2369	3593	UAUAACUACAAGAGGUUAUUUUU	2347-2369
AD-240875.1	3298	AACCUCUUGUAGUUAUAAAAU	2353-2373	3594	AUUUUAUAACUACAAGAGGUUAU	2351-2373

Таблица 3

Модифицированные последовательности HSD17B13

Название дуплекса	SEQ ID NO:	Последовательность смысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Последовательность цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишени
AD-238911.1	3595	csasguacCfuCfCfUfcccuaggacuL96	3891	asGfsuccUfaGfGfgaggAfgGfuacugsusc	4187	GACAGUACCUCCUCCCUAGGACU
AD-238912.1	3596	asgsuaccUfcCfUfCfccuaggacuaL96	3892	usAfsgucCfuAfGfggagGfaGfguacusgsu	4188	ACAGUACCUCCUCCCUAGGACUA
AD-238913.1	3597	gsusaccuCfcUfCfCfcuaggacuaaL96	3893	usUfsaguCfcUfAfgggaGfgAfgguacsusg	4189	CAGUACCUCCUCCCUAGGACUAC
AD-238929.1	3598	ascsuacaCfaAfGfGfacugaaccaaL96	3894	usUfsgguUfcAfGfuccuUfgUfguaguscsc	4190	GGACUACACAAGGACUGAACCAG
AD-238930.1	3599	csusacacAfaGfGfAfcugaaccagaL96	3895	usCfsuggUfuCfAfguccUfuGfuguagsusc	4191	GACUACACAAGGACUGAACCAGA
AD-238932.1	3600	ascsacaaGfgAfCfUfgaaccagaaaL96	3896	usUfsucuGfgUfUfcaguCfcUfugugusasg	4192	CUACACAAGGACUGAACCAGAAG
AD-238960.1	3601	csasgagcAfaAfGfCfcaugaacauaL96	3897	usAfsuguUfcAfUfggcuUfuGfcucugsusc	4193	GACAGAGCAAAGCCAUGAACAUC
AD-238979.1	3602	uscsauccUfaGfAfAfauccuucugaL96	3898	usCfsagaAfgGfAfuuucUfaGfgaugasusg	4194	CAUCAUCCUAGAAAUCCUUCUGC
AD-238991.1	3603	uscscuucUfgCfUfUfcugauccaccaL96	3899	usGfsgugAfuCfAfgaagCfaGfaaggasusu	4195	AAUCCUUCUGCUUCUGAUCACCA

AD-239009.1	3604	cscsaucaUfcUfAfCfuccuacuugaL96	3900	usCfsaagUfaGfGfaguaGfaUfgauggsusg	4196	CACCAUCAUCUACUCCUACUUGG
AD-239015.1	3605	uscsuacuCfcUfAfCfuuggagucguL96	3901	asCfsgacUfcCfAfaguaGfgAfguagasusg	4197	CAUCUACUCCUACUUGGAGUCGU
AD-239016.1	3606	csusacucCfuAfCfUfuggagucguuL96	3902	asAfscgaCfuCfCfaaguAfgGfaguagsasu	4198	AUCUACUCCUACUUGGAGUCGUU
AD-239017.1	3607	usascuccUfaCfUfUfggagucguuaL96	3903	usAfsacgAfcUfCfcaagUfaGfgaguasgsa	4199	UCUACUCCUACUUGGAGUCGUUG
AD-239018.1	3608	ascsuccuAfcUfUfGfgagucguugaL96	3904	usCfsaacGfaCfUfccaaGfuAfggagusasg	4200	CUACUCCUACUUGGAGUCGUUGG
AD-239019.1	3609	csusccuaCfuUfGfGfagucguugguL96	3905	asCfscaaCfgAfCfuccaAfgUfaggagsusa	4201	UACUCCUACUUGGAGUCGUUGGU
AD-239020.1	3610	uscscuacUfuGfGfAfgucguugguaL96	3906	usAfsccaAfcGfAfcuccAfaGfuaggasgsu	4202	ACUCCUACUUGGAGUCGUUGGUG
AD-239031.1	3611	gsuscguuGfgUfGfAfaguuuuucauL96	3907	asUfsgaaAfaAfCfuucaCfcAfacgacsusc	4203	GAGUCGUUGGUGAAGUUUUUCAU
AD-239062.1	3612	gsasgauuGfuUfCfUfcauuacuggaL96	3908	usCfscagUfaAfUfgagaAfcAfaucucscsc	4204	GGGAGAUUGUUCUCAUUACUGGA
AD-239066.1	3613	ususguucUfcAfUfUfacuggagcuaL96	3909	usAfsgcuCfcAfGfuaauGfaGfaacaasusc	4205	GAUUGUUCUCAUUACUGGAGCUG
AD-239103.1	3614	gscsagacUfaCfUfUfaugaauuugaL96	3910	usCfsaaaUfuCfAfuaagUfaGfucugcscsu	4206	AGGCAGACUACUUAUGAAUUUGC

AD-239110.1	3615	ascsuuauGfaAfUfUfugcaaaacgaL96	3911	usCfsguuUfuGfCfaaauUfcAfuaagusasg	4207	CUACUUAUGAAUUUGCAAAACGA
AD-239118.1	3616	asusuugcAfaAfAfCfgacagagcauL96	3912	asUfsgcuCfuGfUfcguuUfuGfcaaaususc	4208	GAAUUUGCAAAACGACAGAGCAU
AD-239119.1	3617	ususugcaAfaAfCfGfacagagcauaL96	3913	usAfsugcUfcUfGfucguUfuUfgcaaasusu	4209	AAUUUGCAAAACGACAGAGCAUA
AD-239131.1	3618	csasgagcAfuAfUfUfgguucugugaL96	3914	usCfsacaGfaAfCfcaauAfuGfcucugsusc	4210	GACAGAGCAUAUUGGUUCUGUGG
AD-239132.1	3619	asgsagcaUfaUfUfGfguucugguggaL96	3915	usCfscacAfgAfAfccaaUfaUfgcucusgsu	4211	ACAGAGCAUAUUGGUUCUGUGGG
AD-239133.1	3620	gsasgcauAfuUfGfGfuucuggugggaL96	3916	usCfsccaCfaGfAfaccaAfuAfugcucsusg	4212	CAGAGCAUAUUGGUUCUGUGGGA
AD-239146.1	3621	csusguggGfaUfAfUfuaauaagcgaL96	3917	usCfsgcuUfaUfUfaauaUfcCfcacagsasa	4213	UUCUGUGGGAUAUUAAUAAGCGC
AD-239155.1	3622	asusuaauAfaGfCfGfcggugggaaL96	3918	usUfsccaCfaCfCfgcgcUfuAfuuaausasu	4214	AUAUUAAUAAGCGCGGUGUGGAG
AD-239156.1	3623	ususaauaAfgCfGfCfggugggagaL96	3919	usCfsuccAfcAfCfcgcgCfuUfauuaasusa	4215	UAUUAAUAAGCGCGGUGUGGAGG
AD-239177.1	3624	asasacugCfaGfCfUfgagugccgaaL96	3920	usUfscggCfaCfUfcagcUfgCfaguuuscsc	4216	GGAAACUGCAGCUGAGUGCCGAA
AD-239178.1	3625	asascugcAfgCfUfGfagugccgaaaL96	3921	usUfsucgGfcAfCfucagCfuGfcaguususc	4217	GAAACUGCAGCUGAGUGCCGAAA

AD-239179.1	3626	ascsugcaGfcUfGfAfgugccg aaaaL96	3922	usUfsuucGfgCfAfcucaGfcU fgcagususu	4218	AAACUGCAGCUGAGUGCC GAAAA
AD-239180.1	3627	csusgcagCfuGfAfGfugccga aaacL96	3923	gsUfsuuuCfgGfCfacucAfgC fugcagsusu	4219	AACUGCAGCUGAGUGCCG AAAAC
AD-239181.1	3628	usgscagcUfgAfGfUfgccgaa aacuL96	3924	asGfsuuuUfcGfGfcacuCfaGf cugcasgsu	4220	ACUGCAGCUGAGUGCCGA AAACU
AD-239182.1	3629	gscsagcuGfaGfUfGfccgaaa acuaL96	3925	usAfsguuUfuCfGfgcacUfcA fgcugcsasg	4221	CUGCAGCUGAGUGCCGAA AACUA
AD-239183.1	3630	csasgcugAfgUfGfCfcgaaaa cuaaL96	3926	usUfsaguUfuUfCfggcaCfuC fagcugscsa	4222	UGCAGCUGAGUGCCGAAA ACUAG
AD-239185.1	3631	gscsugagUfgCfCfGfaaaacu aggaL96	3927	usCfscuaGfuUfUfucggCfaCf ucagcsusg	4223	CAGCUGAGUGCCGAAAAC UAGGC
AD-239186.1	3632	csusgaguGfcCfGfAfaaacua ggcaL96	3928	usGfsccuAfgUfUfuucgGfcA fcucagscsu	4224	AGCUGAGUGCCGAAAACU AGGCG
AD-239187.1	3633	usgsagugCfcGfAfAfaacuag gcguL96	3929	asCfsgccUfaGfUfuuucGfgCf acucasgsc	4225	GCUGAGUGCCGAAAACUA GGCGU
AD-239188.1	3634	gsasgugcCfgAfAfAfacuagg cguaL96	3930	usAfscgcCfuAfGfuuuuCfgG fcacucsasg	4226	CUGAGUGCCGAAAACUAG GCGUC
AD-239189.1	3635	asgsugccGfaAfAfAfcuaggc gucaL96	3931	usGfsacgCfcUfAfguuuUfcG fgcacuscsa	4227	UGAGUGCCGAAAACUAGG CGUCA
AD-239190.1	3636	gsusgccgAfaAfAfCfuaggcg ucaaL96	3932	usUfsgacGfcCfUfaguuUfuC fggcacsusc	4228	GAGUGCCGAAAACUAGGC GUCAC

AD-239191.1	3637	usgsccgaAfaAfCfUfaggcgucacuL96	3933	asGfsugaCfgCfCfuaguUfuUfcggcascsu	4229	AGUGCCGAAAACUAGGCGUCACU
AD-239192.1	3638	gscscgaaAfaCfUfAfggcgucacuaL96	3934	usAfsgugAfcGfCfcuagUfuUfucggcsasc	4230	GUGCCGAAAACUAGGCGUCACUG
AD-239193.1	3639	cscsgaaaAfcUfAfGfgcgucacugaL96	3935	usCfsaguGfaCfGfccuaGfuUfuucggscsa	4231	UGCCGAAAACUAGGCGUCACUGC
AD-239194.1	3640	csgsaaaaCfuAfGfGfcgucacugcaL96	3936	usGfscagUfgAfCfgccuAfgUfuuucgsgsc	4232	GCCGAAAACUAGGCGUCACUGCG
AD-239196.1	3641	asasaacuAfgGfCfGfucacugcgcaL96	3937	usGfscgcAfgUfGfacgcCfuAfguuuuscsg	4233	CGAAAACUAGGCGUCACUGCGCA
AD-239198.1	3642	asascuagGfcGfUfCfacugcgcauaL96	3938	usAfsugcGfcAfGfugacGfcCfuaguususu	4234	AAAACUAGGCGUCACUGCGCAUG
AD-239199.1	3643	ascsuaggCfgUfCfAfcugcgcaugaL96	3939	usCfsaugCfgCfAfgugaCfgCfcuagususu	4235	AAACUAGGCGUCACUGCGCAUGC
AD-239203.1	3644	gsgscgucAfcUfGfCfgcaugcguauL96	3940	asUfsacgCfaUfGfcgcaGfuGfacgccsusa	4236	UAGGCGUCACUGCGCAUGCGUAU
AD-239214.1	3645	gscsaugcGfuAfUfGfugguagacuaL96	3941	usAfsgucUfaCfCfacauAfcGfcaugcsgsc	4237	GCGCAUGCGUAUGUGGUAGACUG
AD-239215.1	3646	csasugcgUfaUfGfUfgguagacugaL96	3942	usCfsaguCfuAfCfcacaUfaCfgcaugscsg	4238	CGCAUGCGUAUGUGGUAGACUGC
AD-239239.1	3647	asascagaGfaAfGfAfgaucuaucgaL96	3943	usCfsgauAfgAfUfcucuUfcUfcuguusgsc	4239	GCAACAGAGAAGAGAUCUAUCGC

AD-239240.1	3648	ascsagagAfaGfAfGfaucuaucgcuL96	3944	asGfscgaUfaGfAfucucUfuCfucugususg	4240	CAACAGAGAAGAGAUCUAUCGCU
AD-239241.1	3649	csasgagaAfgAfGfAfucuaucgcuaL96	3945	usAfsgcgAfuAfGfaucuCfuUfcucugsusu	4241	AACAGAGAAGAGAUCUAUCGCUC
AD-239242.1	3650	asgsagaaGfaGfAfUfcuaucgcucuL96	3946	asGfsagcGfaUfAfgaucUfcUfucucusgsu	4242	ACAGAGAAGAGAUCUAUCGCUCU
AD-239243.1	3651	gsasgaagAfgAfUfCfuaucgcucuaL96	3947	usAfsgagCfgAfUfagauCfuCfuucucsusg	4243	CAGAGAAGAGAUCUAUCGCUCUC
AD-239245.1	3652	gsasagagAfuCfUfAfucgcucucuaL96	3948	usAfsgagAfgCfGfauagAfuCfucuucsusc	4244	GAGAAGAGAUCUAUCGCUCUCUA
AD-239246.1	3653	asasgagaUfcUfAfUfcgcucucuaaL96	3949	usUfsagaGfaGfCfgauaGfaUfcucuuscsu	4245	AGAAGAGAUCUAUCGCUCUCUAA
AD-239247.1	3654	asgsagauCfuAfUfCfgcucucuaaaL96	3950	usUfsuagAfgAfGfcgauAfgAfucucususc	4246	GAAGAGAUCUAUCGCUCUCUAAA
AD-239250.1	3655	gsasucuaUfcGfCfUfcucuaaaucaL96	3951	usGfsauuUfaGfAfgagcGfaUfagaucsusc	4247	GAGAUCUAUCGCUCUCUAAAUCA
AD-239251.1	3656	asuscuauCfgCfUfCfucuaaaucaaL96	3952	usUfsgauUfuAfGfagagCfgAfuagauscsu	4248	AGAUCUAUCGCUCUCUAAAUCAG
AD-239253.1	3657	csusaucgCfuCfUfCfuaaaucagguL96	3953	asCfscugAfuUfUfagagAfgCfgauagsasu	4249	AUCUAUCGCUCUCUAAAUCAGGU
AD-239254.1	3658	usasucgcUfcUfCfUfaaaucagguaL96	3954	usAfsccuGfaUfUfuagaGfaGfcgauasgsa	4250	UCUAUCGCUCUCUAAAUCAGGUG

AD-239255.1	3659	asuscgcuCfuCfUfAfaaucaggugaL96	3955	usCfsaccUfgAfUfuuagAfgAfgcgausasg	4251	CUAUCGCUCUCUAAAUCAGGUGA
AD-239290.1	3660	gsasuguaAfcAfAfUfcgugggugaauL96	3956	asUfsucaCfcAfCfgauuGfuUfacaucsasc	4252	GUGAUGUAACAAUCGUGGUGAAU
AD-239291.1	3661	asusguaaCfaAfUfCfguggugaauaL96	3957	usAfsuucAfcCfAfcgauUfgUfuacauscsa	4253	UGAUGUAACAAUCGUGGUGAAUA
AD-239292.1	3662	usgsuaacAfaUfCfGfugggugaauaaL96	3958	usUfsauuCfaCfCfacgaUfuGfuuacasusc	4254	GAUGUAACAAUCGUGGUGAAUAA
AD-239293.1	3663	gsusaacaAfuCfGfUfggugaauaauL96	3959	asUfsuauUfcAfCfcacgAfuUfguuacsasu	4255	AUGUAACAAUCGUGGUGAAUAAU
AD-239304.1	3664	gsgsugaaUfaAfUfGfcugggacaguL96	3960	asCfsuguCfcCfAfgcauUfaUfucaccsasc	4256	GUGGUGAAUAAUGCUGGGACAGU
AD-239312.1	3665	asusgcugGfgAfCfAfguauauccaaL96	3961	usUfsggaUfaUfAfcuguCfcCfagcaususa	4257	UAAUGCUGGGACAGUAUAUCCAG
AD-239313.1	3666	usgscuggGfaCfAfGfuauauccagaL96	3962	usCfsuggAfuAfUfacugUfcCfcagcasusu	4258	AAUGCUGGGACAGUAUAUCCAGC
AD-239314.1	3667	gscsugggAfcAfGfUfauauccagcaL96	3963	usGfscugGfaUfAfuacuGfuCfccagcsasu	4259	AUGCUGGGACAGUAUAUCCAGCC
AD-239316.1	3668	usgsggacAfgUfAfUfauccagccgaL96	3964	usCfsggcUfgGfAfuauaCfuGfucccasgsc	4260	GCUGGGACAGUAUAUCCAGCCGA
AD-239317.1	3669	gsgsgacaGfuAfUfAfuccagccgauL96	3965	asUfscggCfuGfGfauauAfcUfgucccsasg	4261	CUGGGACAGUAUAUCCAGCCGAU

AD-239318.1	3670	gsgsacagUfaUfAfUfccagccgauaL96	3966	usAfsucgGfcUfGfgauaUfaCfuguccscsa	4262	UGGGACAGUAUAUCCAGCCGAUC
AD-239321.1	3671	csasguauAfuCfCfAfgccgaucuuaL96	3967	usAfsagaUfcGfGfcuggAfuAfuacugsusc	4263	GACAGUAUAUCCAGCCGAUCUUC
AD-239332.1	3672	gscscgauCfuUfCfUfcagcaccaaaL96	3968	usUfsuggUfgCfUfgagaAfgAfucggcsusg	4264	CAGCCGAUCUUCUCAGCACCAAG
AD-239337.1	3673	uscsuucuCfaGfCfAfccaaggaugaL96	3969	usCfsaucCfuUfGfgugcUfgAfgaagasusc	4265	GAUCUUCUCAGCACCAAGGAUGA
AD-239348.1	3674	cscsaaggAfuGfAfAfgagauuaccaL96	3970	usGfsguaAfuCfUfcuucAfuCfcuuggsusg	4266	CACCAAGGAUGAAGAGAUUACCA
AD-239362.1	3675	asusuaccAfaGfAfCfauuugagguaL96	3971	usAfsccuCfaAfAfugucUfuGfguaauscsu	4267	AGAUUACCAAGACAUUUGAGGUC
AD-239366.1	3676	cscsaagaCfaUfUfUfgaggucaacaL96	3972	usGfsuugAfcCfUfcaaaUfgUfcuuggsusa	4268	UACCAAGACAUUUGAGGUCAACA
AD-239368.1	3677	asasgacaUfuUfGfAfggucaacauaL96	3973	usAfsuguUfgAfCfcucaAfaUfgucuusgsg	4269	CCAAGACAUUUGAGGUCAACAUC
AD-239372.1	3678	csasuuugAfgGfUfCfaacauccuaaL96	3974	usUfsaggAfuGfUfugacCfuCfaaaugsusc	4270	GACAUUUGAGGUCAACAUCCUAG
AD-239373.1	3679	asusuugaGfgUfCfAfacauccuagaL96	3975	usCfsuagGfaUfGfuugaCfcUfcaaausgsu	4271	ACAUUUGAGGUCAACAUCCUAGG
AD-239379.1	3680	gsgsucaaCfaUfCfCfuaggacauuuL96	3976	asAfsaugUfcCfUfaggaUfgUfugaccsusc	4272	GAGGUCAACAUCCUAGGACAUUU

AD-239380.1	3681	gsuscaacAfuCfCfUfaggacauuuuL96	3977	asAfsaauGfuCfCfuaggAfuGfuugacscsu	4273	AGGUCAACAUCCUAGGACAUUUU
AD-239387.1	3682	uscscuagGfaCfAfUfuuuuggaucaL96	3978	usGfsaucCfaAfAfaaugUfcCfuaggasusg	4274	CAUCCUAGGACAUUUUUGGAUCA
AD-239397.1	3683	ususuuugGfaUfCfAfcaaaagcacuL96	3979	asGfsugcUfuUfUfgugaUfcCfaaaaasusg	4275	CAUUUUUGGAUCACAAAAGCACU
AD-239411.1	3684	asasgcacUfuCfUfUfccaucgaugaL96	3980	usCfsaucGfaUfGfgaagAfaGfugcuususu	4276	AAAAGCACUUCUUCCAUCGAUGA
AD-239412.1	3685	asgscacuUfcUfUfCfcaucgaugauL96	3981	asUfscauCfgAfUfggaaGfaAfgugcususu	4277	AAAGCACUUCUUCCAUCGAUGAU
AD-239431.1	3686	asusggagAfgAfAfAfucauggccaaL96	3982	usUfsggcCfaUfGfauuuCfuCfuccauscsa	4278	UGAUGGAGAGAAAUCAUGGCCAC
AD-239433.1	3687	gsgsagagAfaAfUfCfauggccacauL96	3983	asUfsgugGfcCfAfugauUfuCfucuccsasu	4279	AUGGAGAGAAAUCAUGGCCACAU
AD-239436.1	3688	gsasgaaaUfcAfUfGfgccacaucguL96	3984	asCfsgauGfuGfGfccauGfaUfuucucsusc	4280	GAGAGAAAUCAUGGCCACAUCGU
AD-239437.1	3689	asgsaaauCfaUfGfGfccacaucguaL96	3985	usAfscgaUfgUfGfgccaUfgAfuuucuscsu	4281	AGAGAAAUCAUGGCCACAUCGUC
AD-239438.1	3690	gsasaaucAfuGfGfCfcacaucgucaL96	3986	usGfsacgAfuGfUfggccAfuGfauuucsusc	4282	GAGAAAUCAUGGCCACAUCGUCA
AD-239439.1	3691	asasaucaUfgGfCfCfacaucgucaaL96	3987	usUfsgacGfaUfGfuggcCfaUfgauuuscsu	4283	AGAAAUCAUGGCCACAUCGUCAC

AD-239450.1	3692	ascsaucgUfcAfCfAfguggcuucaaL96	3988	usUfsgaaGfcCfAfcuguGfaCfgaugusgsg	4284	CCACAUCGUCACAGUGGCUUCAG
AD-239451.1	3693	csasucguCfaCfAfGfuggcuucaguL96	3989	asCfsugaAfgCfCfacugUfgAfcgaugsusg	4285	CACAUCGUCACAGUGGCUUCAGU
AD-239452.1	3694	asuscgucAfcAfGfUfggcuucaguaL96	3990	usAfscugAfaGfCfcacuGfuGfacgausgsu	4286	ACAUCGUCACAGUGGCUUCAGUG
AD-239453.1	3695	uscsgucaCfaGfUfGfgcuucaguguL96	3991	asCfsacuGfaAfGfccacUfgUfgacgasusg	4287	CAUCGUCACAGUGGCUUCAGUGU
AD-239475.1	3696	csgsgccaCfgAfAfGfggauccuuaL96	3992	usAfsaggAfaUfCfccuuCfgUfggccgscsa	4288	UGCGGCCACGAAGGGAUUCCUUA
AD-239476.1	3697	gsgsccacGfaAfGfGfgauuccuuaaL96	3993	usUfsaagGfaAfUfcccuUfcGfuggccsgsc	4289	GCGGCCACGAAGGGAUUCCUUAC
AD-239478.1	3698	cscsacgaAfgGfGfAfuuccuuaccuL96	3994	asGfsguaAfgGfAfauccCfuUfcguggscsc	4290	GGCCACGAAGGGAUUCCUUACCU
AD-239479.1	3699	csascgaaGfgGfAfUfuccuuaccuaL96	3995	usAfsgguAfaGfGfaaucCfcUfucgugsgsc	4291	GCCACGAAGGGAUUCCUUACCUC
AD-239480.1	3700	ascsgaagGfgAfUfUfccuuaccucaL96	3996	usGfsaggUfaAfGfgaauCfcCfuucgusgsg	4292	CCACGAAGGGAUUCCUUACCUCA
AD-239482.1	3701	gsasagggAfuUfCfCfuuaccucauaL96	3997	usAfsugaGfgUfAfaggaAfuCfccuucsgsu	4293	ACGAAGGGAUUCCUUACCUCAUC
AD-239483.1	3702	asasgggaUfuCfCfUfuaccucaucaL96	3998	usGfsaugAfgGfUfaaggAfaUfcccuuscsg	4294	CGAAGGGAUUCCUUACCUCAUCC

AD-239499.1	3703	csasucccAfuAfUfUfguuccagcaaL96	3999	usUfsgcuGfgAfAfcaauAfuGfggaugsasg	4295	CUCAUCCCAUAUUGUUCCAGCAA
AD-239510.1	3704	gsusuccaGfcAfAfAfuuugccgcuaL96	4000	usAfsgcgGfcAfAfauuuGfcUfggaacsasa	4296	UUGUUCCAGCAAAUUUGCCGCUG
AD-239520.1	3705	asusuugcCfgCfUfGfuuggcuuucaL96	4001	usGfsaaaGfcCfAfacagCfgGfcaaaususu	4297	AAAUUUGCCGCUGUUGGCUUUCA
AD-239521.1	3706	ususugccGfcUfGfUfuggcuuucaaL96	4002	usUfsgaaAfgCfCfaacaGfcGfgcaaasusu	4298	AAUUUGCCGCUGUUGGCUUUCAC
AD-239522.1	3707	ususgccgCfuGfUfUfggcuucacaL96	4003	usGfsugaAfaGfCfcaacAfgCfggcaasasu	4299	AUUUGCCGCUGUUGGCUUUCACA
AD-239534.1	3708	gscsuuucAfcAfGfAfggucugacauL96	4004	asUfsgucAfgAfCfcucuGfuGfaaagcscsa	4300	UGGCUUUCACAGAGGUCUGACAU
AD-239539.1	3709	csascagaGfgUfCfUfgacaucagaaL96	4005	usUfscugAfuGfUfcagaCfcUfcugugsasa	4301	UUCACAGAGGUCUGACAUCAGAA
AD-239544.1	3710	asgsgucuGfaCfAfUfcagaacuucaL96	4006	usGfsaagUfuCfUfgaugUfcAfgaccuscsu	4302	AGAGGUCUGACAUCAGAACUUCA
AD-239566.1	3711	gscscuugGfgAfAfAfaacugguauaL96	4007	usAfsuacCfaGfUfuuuuCfcCfaaggcscsu	4303	AGGCCUUGGGAAAAACUGGUAUC
AD-239578.1	3712	ascsugguAfuCfAfAfaaccucauguL96	4008	asCfsaugAfgGfUfuuugAfuAfccagususu	4304	AAACUGGUAUCAAAACCUCAUGU
AD-239579.1	3713	csusgguaUfcAfAfAfaccucauguaL96	4009	usAfscauGfaGfGfuuuuGfaUfaccagsusu	4305	AACUGGUAUCAAAACCUCAUGUC

AD-239611.1	3714	ususugugAfaUfAfCfugggucacaL96	4010	usGfsugaAfcCfCfaguaUfuCfacaaasasa	4306	UUUUUGUGAAUACUGGGUUCACC
AD-239612.1	3715	ususgugaAfuAfCfUfggguuccaccaL96	4011	usGfsgugAfaCfCfcaguAfuUfcacaasasa	4307	UUUUGUGAAUACUGGGUUCACCA
AD-239613.1	3716	usgsugaaUfaCfUfGfgguuccaccaaL96	4012	usUfsgguGfaAfCfccagUfaUfucacasasa	4308	UUUGUGAAUACUGGGUUCACCAA
AD-239617.1	3717	asasuacuGfgGfUfUfcaccaaaaauL96	4013	asUfsuuuUfgGfUfgaacCfcAfguauuscsa	4309	UGAAUACUGGGUUCACCAAAAAU
AD-239618.1	3718	asusacugGfgUfUfCfaccaaaauaL96	4014	usAfsuuuUfuGfGfugaaCfcCfaguaususc	4310	GAAUACUGGGUUCACCAAAAAUC
AD-239637.1	3719	uscscaagCfaCfAfAfgauuauggcaL96	4015	usGfsccaUfaAfUfcuugUfgCfuuggasusu	4311	AAUCCAAGCACAAGAUUAUGGCC
AD-239641.1	3720	asgscacaAfgAfUfUfauggccuguaL96	4016	usAfscagGfcCfAfuaauCfuUfgugcususg	4312	CAAGCACAAGAUUAUGGCCUGUA
AD-239642.1	3721	gscsacaaGfaUfUfAfuggccuguauL96	4017	asUfsacaGfgCfCfauaaUfcUfugugcsusu	4313	AAGCACAAGAUUAUGGCCUGUAU
AD-239643.1	3722	csascaagAfuUfAfUfggccuguauuL96	4018	asAfsuacAfgGfCfcauaAfuCfuugugscsu	4314	AGCACAAGAUUAUGGCCUGUAUU
AD-239645.1	3723	csasagauUfaUfGfGfccuguauugaL96	4019	usCfsaauAfcAfGfgccaUfaAfucuugsusg	4315	CACAAGAUUAUGGCCUGUAUUGG
AD-239647.1	3724	asgsauuaUfgGfCfCfuguauuggaaL96	4020	usUfsccaAfuAfCfaggcCfaUfaaucususg	4316	CAAGAUUAUGGCCUGUAUUGGAG

AD-239649.1	3725	asusuaugGfcCfUfGfuauugg agaaL96	4021	usUfscucCfaAfUfacagGfcCf auaauscsu	4317	AGAUUAUGGCCUGUAUUG GAGAC
AD-239650.1	3726	ususauggCfcUfGfUfauugg agacaL96	4022	usGfsucuCfcAfAfuacaGfgCf cauaasusc	4318	GAUUAUGGCCUGUAUUGG AGACA
AD-239653.1	3727	usgsgccuGfuAfUfUfggaga cagauL96	4023	asUfscugUfcUfCfcaauAfcAf ggccasusa	4319	UAUGGCCUGUAUUGGAGA CAGAU
AD-239654.1	3728	gsgsccugUfaUfUfGfgagaca gauaL96	4024	usAfsucuGfuCfUfccaaUfaCf aggccsasu	4320	AUGGCCUGUAUUGGAGAC AGAUG
AD-239662.1	3729	ususggagAfcAfGfAfugaag ucguaL96	4025	usAfscgaCfuUfCfaucuGfuCf uccaasusa	4321	UAUUGGAGACAGAUGAA GUCGUA
AD-239668.1	3730	ascsagauGfaAfGfUfcguaag aaguL96	4026	asCfsuucUfuAfCfgacuUfcAf ucuguscsu	4322	AGACAGAUGAAGUCGUAA GAAGU
AD-239669.1	3731	csasgaugAfaGfUfCfguaaga aguaL96	4027	usAfscuuCfuUfAfcgacUfuC faucugsusc	4323	GACAGAUGAAGUCGUAAG AAGUC
AD-239670.1	3732	asgsaugaAfgUfCfGfuaagaa gucuL96	4028	asGfsacuUfcUfUfacgaCfuUf caucusgsu	4324	ACAGAUGAAGUCGUAAGA AGUCU
AD-239671.1	3733	gsasugaaGfuCfGfUfaagaag ucuaL96	4029	usAfsgacUfuCfUfuacgAfcU fucaucsusg	4325	CAGAUGAAGUCGUAAGAA GUCUG
AD-239674.1	3734	gsasagucGfuAfAfGfaagucu gauaL96	4030	usAfsucaGfaCfUfucuuAfcG facuucsasu	4326	AUGAAGUCGUAAGAAGUC UGAUA
AD-239676.1	3735	asgsucguAfaGfAfAfgucug auagaL96	4031	usCfsuauCfaGfAfcuucUfuA fcgacususc	4327	GAAGUCGUAAGAAGUCUG AUAGA

AD-239681.1	3736	usasagaaGfuCfUfGfauagauggaaL96	4032	usUfsccaUfcUfAfucagAfcUfucuuascsg	4328	CGUAAGAAGUCUGAUAGAUGGAA
AD-239682.1	3737	asasgaagUfcUfGfAfuagauggaauL96	4033	asUfsuccAfuCfUfaucaGfaCfuucuusasc	4329	GUAAGAAGUCUGAUAGAUGGAAU
AD-239684.1	3738	gsasagucUfgAfUfAfgauggaauaaL96	4034	usUfsauuCfcAfUfcuauCfaGfacuucsusu	4330	AAGAAGUCUGAUAGAUGGAAUAC
AD-239685.1	3739	asasgucuGfaUfAfGfauggaauacuL96	4035	asGfsuauUfcCfAfucuaUfcAfgacuuscsu	4331	AGAAGUCUGAUAGAUGGAAUACU
AD-239697.1	3740	usgsgaauAfcUfUfAfccaauaagaaL96	4036	usUfscuuAfuUfGfguaaGfuAfuuccasusc	4332	GAUGGAAUACUUACCAAUAAGAA
AD-239713.1	3741	asasugauUfuUfUfGfuuccaucguaL96	4037	usAfscgaUfgGfAfacaaAfaAfucauususu	4333	AAAAUGAUUUUUGUUCCAUCGUA
AD-239714.1	3742	asusgauuUfuUfGfUfuccaucguauL96	4038	asUfsacgAfuGfGfaacaAfaAfaucaususu	4334	AAAUGAUUUUUGUUCCAUCGUAU
AD-239717.1	3743	asusuuuuGfuUfCfCfaucguauauaL96	4039	usAfsuauAfcGfAfuggaAfcAfaaaauscsa	4335	UGAUUUUUGUUCCAUCGUAUAUC
AD-239721.1	3744	ususguucCfaUfCfGfuauaucaauaL96	4040	usAfsuugAfuAfUfacgaUfgGfaacaasasa	4336	UUUUGUUCCAUCGUAUAUCAAUA
AD-239723.1	3745	gsusuccaUfcGfUfAfuaucaauauaL96	4041	usAfsuauUfgAfUfauacGfaUfggaacsasa	4337	UUGUUCCAUCGUAUAUCAAUAUC
AD-239724.1	3746	ususccauCfgUfAfUfaucaauaucuL96	4042	asGfsauaUfuGfAfuauaCfgAfuggaascsa	4338	UGUUCCAUCGUAUAUCAAUAUCU

AD-239725.1	3747	uscscaucGfuAfUfAfucaaua ucuuL96	4043	asAfsgauAfuUfGfauauAfcG fauggasasc	4339	GUUCCAUCGUAUAUCAAU AUCUU
AD-239726.1	3748	cscsaucgUfaUfAfUfcaauau cuuuL96	4044	asAfsagaUfaUfUfgauaUfaCf gauggsasa	4340	UUCCAUCGUAUAUCAAUA UCUUU
AD-239755.1	3749	ascsagaaGfuUfUfCfuuccug aacaL96	4045	usGfsuucAfgGfAfagaaAfcU fucugusasg	4341	CUACAGAAGUUUCUUCCU GAACG
AD-239757.1	3750	asgsaaguUfuCfUfUfccugaa cgcaL96	4046	usGfscguUfcAfGfgaagAfaA fcuucusgsu	4342	ACAGAAGUUUCUUCCUGA ACGCG
AD-239759.1	3751	asasguuuCfuUfCfCfugaacg cgcaL96	4047	usGfscgcGfuUfCfaggaAfgA faacuuscsu	4343	AGAAGUUUCUUCCUGAAC GCGCC
AD-239761.1	3752	gsusuucuUfcCfUfGfaacgcg ccuaL96	4048	usAfsggcGfcGfUfucagGfaA fgaaacsusu	4344	AAGUUUCUUCCUGAACGC GCCUC
AD-239764.1	3753	uscsuuccUfgAfAfCfgcgccu cagaL96	4049	usCfsugaGfgCfGfcguuCfaG fgaagasasa	4345	UUUCUUCCUGAACGCGCC UCAGC
AD-239778.1	3754	cscsucagCfgAfUfUfuuaaau cguaL96	4050	usAfscgaUfuUfAfaaauCfgCf ugaggscsg	4346	CGCCUCAGCGAUUUUAAA UCGUA
AD-239779.1	3755	csuscagcGfaUfUfUfuaaauc guauL96	4051	asUfsacgAfuUfUfaaaaUfcGf cugagsgsc	4347	GCCUCAGCGAUUUUAAAU CGUAU
AD-239780.1	3756	uscsagcgAfuUfUfUfaaaucg uauaL96	4052	usAfsuacGfaUfUfuaaaAfuCf gcugasgsg	4348	CCUCAGCGAUUUUAAAUC GUAUG
AD-239781.1	3757	csasgcgaUfuUfUfAfaaucgu augaL96	4053	usCfsauaCfgAfUfuuaaAfaUf cgcugsasg	4349	CUCAGCGAUUUUAAAUCG UAUGC

AD-239782.1	3758	asgscgauUfuUfAfAfaucgua ugcaL96	4054	usGfscauAfcGfAfuuuaAfaA fucgcusgsa	4350	UCAGCGAUUUUAAAUCGU AUGCA
AD-239783.1	3759	gscsgauuUfuAfAfAfucgua ugcaaL96	4055	usUfsgcaUfaCfGfauuuAfaA faucgcsusg	4351	CAGCGAUUUUAAAUCGUA UGCAG
AD-239784.1	3760	csgsauuuUfaAfAfUfcguau gcagaL96	4056	usCfsugcAfuAfCfgauuUfaA faaucgscsu	4352	AGCGAUUUUAAAUCGUAU GCAGA
AD-239785.1	3761	gsasuuuuAfaAfUfCfguaug cagaaL96	4057	usUfscugCfaUfAfcgauUfuA faaaucsgsc	4353	GCGAUUUUAAAUCGUAUG CAGAA
AD-239786.1	3762	asusuuuaAfaUfCfGfuaugca gaauL96	4058	asUfsucuGfcAfUfacgaUfuU faaaauscsg	4354	CGAUUUUAAAUCGUAUGC AGAAU
AD-239787.1	3763	ususuuaaAfuCfGfUfaugcag aauaL96	4059	usAfsuucUfgCfAfuacgAfuU fuaaaasusc	4355	GAUUUUAAAUCGUAUGCA GAAUA
AD-239791.1	3764	asasaucgUfaUfGfCfagaaua uucaL96	4060	usGfsaauAfuUfCfugcaUfaCf gauuusasa	4356	UUAAAUCGUAUGCAGAAU AUUCA
AD-239793.1	3765	asuscguaUfgCfAfGfaauauu caauL96	4061	asUfsugaAfuAfUfucugCfaU facgaususu	4357	AAAUCGUAUGCAGAAUAU UCAAU
AD-239806.1	3766	usasuucaAfuUfUfGfaagcag ugguL96	4062	asCfscacUfgCfUfucaaAfuUf gaauasusu	4358	AAUAUUCAAUUUGAAGCA GUGGU
AD-239839.1	3767	gsasauaaAfuAfAfGfcuccag ccaaL96	4063	usUfsggcUfgGfAfgcuuAfuU fuauucsasu	4359	AUGAAUAAAUAAGCUCCA GCCAG
AD-239840.1	3768	asasuaaaUfaAfGfCfuccagc cagaL96	4064	usCfsuggCfuGfGfagcuUfaU fuuauuscsa	4360	UGAAUAAAUAAGCUCCAG CCAGA

AD-239854.1	3769	asgsccagAfgAfUfGfuaugcaugauL96	4065	asUfscauGfcAfUfacauCfuCfuggcusgsg	4361	CCAGCCAGAGAUGUAUGCAUGAU
AD-239855.1	3770	gscscagaGfaUfGfUfaugcaugauaL96	4066	usAfsucaUfgCfAfuacaUfcUfcuggcsusg	4362	CAGCCAGAGAUGUAUGCAUGAUA
AD-239876.1	3771	asusaugaAfuAfGfUfuucgaaucaaL96	4067	usUfsgauUfcGfAfaacuAfuUfcauauscsa	4363	UGAUAUGAAUAGUUUCGAAUCAA
AD-239877.1	3772	usasugaaUfaGfUfUfucgaaucaauL96	4068	asUfsugaUfuCfGfaaacUfaUfucauasusc	4364	GAUAUGAAUAGUUUCGAAUCAAU
AD-239881.1	3773	asasuaguUfuCfGfAfaucaaugcuaL96	4069	usAfsgcaUfuGfAfuucgAfaAfcuauuscsa	4365	UGAAUAGUUUCGAAUCAAUGCUG
AD-239905.1	3774	ususcaguCfcUfGfAfuaauauuaaaL96	4070	usUfsuaaUfaUfUfaucaGfgAfcugaasasa	4366	UUUUCAGUCCUGAUAAUAUUAAA
AD-239914.1	3775	asasaaacAfuUfGfGfuuuggcacuaL96	4071	usAfsgugCfcAfAfaccaAfuGfuuuuusasa	4367	UUAAAAACAUUGGUUUGGCACUA
AD-239915.1	3776	asasaacaUfuGfGfUfuuggcacuaaL96	4072	usUfsaguGfcCfAfaaccAfaUfguuuususa	4368	UAAAAACAUUGGUUUGGCACUAG
AD-239941.1	3777	gsuscaaaCfgAfAfCfaagauuaauuL96	4073	asAfsuuaAfuCfUfuguuCfgUfuugacsusg	4369	CAGUCAAACGAACAAGAUUAAUU
AD-239944.1	3778	asasacgaAfcAfAfGfauuaauuacaL96	4074	usGfsuaaUfuAfAfucuuGfuUfcguuusgsa	4370	UCAAACGAACAAGAUUAAUUACC
AD-239945.1	3779	asascgaaCfaAfGfAfuuaaauuaccuL96	4075	asGfsguaAfuUfAfaucuUfgUfucguususg	4371	CAAACGAACAAGAUUAAUUACCU

AD-239946.1	3780	ascsgaacAfaGfAfUfuaauuaccuaL96	4076	usAfsgguAfaUfUfaaucUfuGfuucgususu	4372	AAACGAACAAGAUUAAUUACCUG
AD-239947.1	3781	csgsaacaAfgAfUfUfaauuaccuguL96	4077	asCfsaggUfaAfUfuaauCfuUfguucgsusu	4373	AACGAACAAGAUUAAUUACCUGU
AD-239977.1	3782	uscsucaaGfaAfUfAfuuuacguaguL96	4078	asCfsuacGfuAfAfauauUfcUfugagasasa	4374	UUUCUCAAGAAUAUUUACGUAGU
AD-239979.1	3783	uscsaagaAfuAfUfUfuacguaguuuL96	4079	asAfsacuAfcGfUfaaauAfuUfcuugasgsa	4375	UCUCAAGAAUAUUUACGUAGUUU
AD-239980.1	3784	csasagaaUfaUfUfUfacguaguuuuL96	4080	asAfsaacUfaCfGfuaaaUfaUfucuugsasg	4376	CUCAAGAAUAUUUACGUAGUUUU
AD-239998.1	3785	ususucauAfgGfUfCfuguuuuccuL96	4081	asGfsgaaAfaAfCfagacCfuAfugaaasasa	4377	UUUUUCAUAGGUCUGUUUUUCCU
AD-240019.1	3786	ususcaugCfcUfCfUfuaaaaacuuaL96	4082	usAfsaguUfuUfUfaagaGfgCfaugaasasg	4378	CUUUCAUGCCUCUUAAAAACUUC
AD-240031.1	3787	asasaaacUfuCfUfGfugcuuacauaL96	4083	usAfsuguAfaGfCfacagAfaGfuuuuusasa	4379	UUAAAAACUUCUGUGCUUACAUA
AD-240032.1	3788	asasaacuUfcUfGfUfgcuuacauaaL96	4084	usUfsaugUfaAfGfcacaGfaAfguuuususa	4380	UAAAAACUUCUGUGCUUACAUAA
AD-240033.1	3789	asasacuuCfuGfUfGfcuuacauaaaL96	4085	usUfsuauGfuAfAfgcacAfgAfaguuususu	4381	AAAAACUUCUGUGCUUACAUAAA
AD-240064.1	3790	ususuuucCfaUfUfUfaaagguggaaL96	4086	usUfsccaCfcUfUfuaaaUfgGfaaaaasusa	4382	UAUUUUUCCAUUUAAAGGUGGAC

AD-240090.1	3791	csusaccuCfcCfUfAfaaaguaaauaL96	4087	usAfsuuuAfcUfUfuuagGfgAfgguagscsu	4383	AGCUACCUCCCUAAAAGUAAAUA
AD-240091.1	3792	usasccucCfcUfAfAfaaguaaauaaL96	4088	usUfsauuUfaCfUfuuuaGfgGfagguasgsc	4384	GCUACCUCCCUAAAAGUAAAUAC
AD-240108.1	3793	usascaaaGfaGfAfAfcuuauuuacaL96	4089	usGfsuaaAfuAfAfguucUfcUfuuguasusu	4385	AAUACAAAGAGAACUUAUUUACA
AD-240117.1	3794	asascuuaUfuUfAfCfacagggaagaL96	4090	usCfsuucCfcUfGfuguaAfaUfaaguuscsu	4386	AGAACUUAUUUACACAGGGAAGG
AD-240124.1	3795	ususacacAfgGfGfAfagguuuaagaL96	4091	usCfsuuaAfaCfCfuuccCfuGfuguaasasu	4387	AUUUACACAGGGAAGGUUUAAGA
AD-240125.1	3796	usascacaGfgGfAfAfgguuuaagaaL96	4092	usUfscuuAfaAfCfcuucCfcUfguguasasa	4388	UUUACACAGGGAAGGUUUAAGAC
AD-240126.1	3797	ascsacagGfgAfAfGfguuuaagacuL96	4093	asGfsucuUfaAfAfccuuCfcCfugugusasa	4389	UUACACAGGGAAGGUUUAAGACU
AD-240135.1	3798	asgsguuuAfaGfAfCfuguucaaguaL96	4094	usAfscuuGfaAfCfagucUfuAfaaccususc	4390	GAAGGUUUAAGACUGUUCAAGUA
AD-240138.1	3799	ususuaagAfcUfGfUfucaaguagcaL96	4095	usGfscuaCfuUfGfaacaGfuCfuuaaascsc	4391	GGUUUAAGACUGUUCAAGUAGCA
AD-240140.1	3800	usasagacUfgUfUfCfaaguagcauuL96	4096	asAfsugcUfaCfUfugaaCfaGfucuuasasa	4392	UUUAAGACUGUUCAAGUAGCAUU
AD-240142.1	3801	asgsacugUfuCfAfAfguagcauucaL96	4097	usGfsaauGfcUfAfcuugAfaCfagucususa	4393	UAAGACUGUUCAAGUAGCAUUCC

AD-240145.1	3802	csusguucAfaGfUfAfgcauuccaauL96	4098	asUfsuggAfaUfGfcuacUfuGfaacagsusc	4394	GACUGUUCAAGUAGCAUUCCAAU
AD-240147.1	3803	gsusucaaGfuAfGfCfauuccaaucuL96	4099	asGfsauuGfgAfAfugcuAfcUfugaacsasg	4395	CUGUUCAAGUAGCAUUCCAAUCU
AD-240148.1	3804	ususcaagUfaGfCfAfuuccaaucuaL96	4100	usAfsgauUfgGfAfaugcUfaCfuugaascsa	4396	UGUUCAAGUAGCAUUCCAAUCUG
AD-240154.1	3805	usasgcauUfcCfAfAfucuguagccaL96	4101	usGfsgcuAfcAfGfauugGfaAfugcuascsu	4397	AGUAGCAUUCCAAUCUGUAGCCA
AD-240155.1	3806	asgscauuCfcAfAfUfcuguagccauL96	4102	asUfsggcUfaCfAfgauuGfgAfaugcusasc	4398	GUAGCAUUCCAAUCUGUAGCCAU
AD-240156.1	3807	gscsauucCfaAfUfCfuguagccauaL96	4103	usAfsuggCfuAfCfagauUfgGfaaugcsusa	4399	UAGCAUUCCAAUCUGUAGCCAUG
AD-240171.1	3808	gscscaugCfcAfCfAfgaauaucaaaL96	4104	usUfsugaUfaUfUfcuguGfgCfauggcsusa	4400	UAGCCAUGCCACAGAAUAUCAAC
AD-240172.1	3809	cscsaugcCfaCfAfGfaauaucaacaL96	4105	usGfsuugAfuAfUfucugUfgGfcauggscsu	4401	AGCCAUGCCACAGAAUAUCAACA
AD-240192.1	3810	asasgaacAfcAfGfAfaugagugcaaL96	4106	usUfsgcaCfuCfAfuucuGfuGfuucuusgsu	4402	ACAAGAACACAGAAUGAGUGCAC
AD-240227.1	3811	gsusuucaGfcAfGfGfcagcuuuauaL96	4107	usAfsuaaAfgCfUfgccuGfcUfgaaacsusu	4403	AAGUUUCAGCAGGCAGCUUUAUC
AD-240228.1	3812	ususucagCfaGfGfCfagcuuuaucuL96	4108	asGfsauaAfaGfCfugccUfgCfugaaascsu	4404	AGUUUCAGCAGGCAGCUUUAUCU

AD-240237.1	3813	gscsagcuUfuAfUfCfucaaccuggaL96	4109	usCfscagGfuUfGfagauAfaAfgcugcscsu	4405	AGGCAGCUUUAUCUCAACCUGGA
AD-240245.1	3814	asuscucaAfcCfUfGfgacauauuuuL96	4110	asAfsaauAfuGfUfccagGfuUfgagausasa	4406	UUAUCUCAACCUGGACAUAUUUU
AD-240276.1	3815	asusuugaAfaGfAfUfuucccuagcaL96	4111	usGfscuaGfgGfAfaaucUfuUfcaaausgsc	4407	GCAUUUGAAAGAUUUCCCUAGCC
AD-240278.1	3816	ususgaaaGfaUfUfUfcccuagccuaL96	4112	usAfsggcUfaGfGfgaaaUfcUfuucaasasu	4408	AUUUGAAAGAUUUCCCUAGCCUC
AD-240279.1	3817	usgsaaagAfuUfUfCfccuagccucuL96	4113	asGfsaggCfuAfGfggaaAfuCfuuucasasa	4409	UUUGAAAGAUUUCCCUAGCCUCU
AD-240280.1	3818	gsasaagaUfuUfCfCfcuagccucuuL96	4114	asAfsgagGfcUfAfgggaAfaUfcuuucsasa	4410	UUGAAAGAUUUCCCUAGCCUCUU
AD-240308.1	3819	csasuuagCfcCfAfAfaacgggugcaaL96	4115	usUfsgcaCfcGfUfuuugGfgCfuaaugsasa	4411	UUCAUUAGCCCAAAACGGUGCAA
AD-240309.1	3820	asusuagcCfcAfAfAfacggugcaaaL96	4116	usUfsugcAfcCfGfuuuuGfgGfcuaausgsa	4412	UCAUUAGCCCAAAACGGUGCAAC
AD-240310.1	3821	ususagccCfaAfAfAfcggugcaacuL96	4117	asGfsuugCfaCfCfguuuUfgGfgcuaasusg	4413	CAUUAGCCCAAAACGGUGCAACU
AD-240311.1	3822	usasgcccAfaAfAfCfggugcaacuaL96	4118	usAfsguuGfcAfCfcguuUfuGfggcuasasu	4414	AUUAGCCCAAAACGGUGCAACUC
AD-240312.1	3823	asgscccaAfaAfCfGfgugcaacucuL96	4119	asGfsaguUfgCfAfccguUfuUfgggcusasa	4415	UUAGCCCAAAACGGUGCAACUCU

AD-240313.1	3824	gscsccaaAfaCfGfGfugcaacucuaL96	4120	usAfsgagUfuGfCfaccgUfuUfugggcsusa	4416	UAGCCCAAAACGGUGCAACUCUA
AD-240315.1	3825	cscsaaaaCfgGfUfGfcaacucuauuL96	4121	asAfsuagAfgUfUfgcacCfgUfuuuggsgsc	4417	GCCCAAAACGGUGCAACUCUAUU
AD-240317.1	3826	asasaacgGfuGfCfAfacucuauucuL96	4122	asGfsaauAfgAfGfuugcAfcCfguuuusgsg	4418	CCAAAACGGUGCAACUCUAUUCU
AD-240318.1	3827	asasacggUfgCfAfAfcucuaucuaL96	4123	usAfsgaaUfaGfAfguugCfaCfcguuususg	4419	CAAAACGGUGCAACUCUAUUCUG
AD-240319.1	3828	asascgguGfcAfAfCfucuauucugaL96	4124	usCfsagaAfuAfGfaguuGfcAfccguususu	4420	AAAACGGUGCAACUCUAUUCUGG
AD-240322.1	3829	gsgsugcaAfcUfCfUfauucuggacuL96	4125	asGfsuccAfgAfAfuagaGfuUfgcaccsgsu	4421	ACGGUGCAACUCUAUUCUGGACU
AD-240324.1	3830	usgscaacUfcUfAfUfucuggacuuuL96	4126	asAfsaguCfcAfGfaauaGfaGfuugcascsc	4422	GGUGCAACUCUAUUCUGGACUUU
AD-240326.1	3831	csasacucUfaUfUfCfuggacuuuauL96	4127	asUfsaaaGfuCfCfagaaUfaGfaguugscsa	4423	UGCAACUCUAUUCUGGACUUUAU
AD-240327.1	3832	asascucuAfuUfCfUfggacuuuauuL96	4128	asAfsuaaAfgUfCfcagaAfuAfgaguusgsc	4424	GCAACUCUAUUCUGGACUUUAUU
AD-240333.1	3833	asusucugGfaCfUfUfuauuacuugaL96	4129	usCfsaagUfaAfUfaaagUfcCfagaausasg	4425	CUAUUCUGGACUUUAUUACUUGA
AD-240364.1	3834	usgsuauaAfcUfCfUfgaaguccacaL96	4130	usGfsuggAfcUfUfcagaGfuUfauacasgsa	4426	UCUGUAUAACUCUGAAGUCCACC

AD-240365.1	3835	gsusauaaCfuCfUfGfaaguccaccaL96	4131	usGfsgugGfaCfUfucagAfgUfuauacsasg	4427	CUGUAUAACUCUGAAGUCCACCA
AD-240375.1	3836	gsasagucCfaCfCfAfaaagugggacaL96	4132	usGfsuccAfcUfUfuuggUfgGfacuucsasg	4428	CUGAAGUCCACCAAAAGUGGACC
AD-240378.1	3837	gsusccacCfaAfAfAfguggaccuaL96	4133	usAfsgggUfcCfAfcuuuUfgGfuggacsusu	4429	AAGUCCACCAAAAGUGGACCCUC
AD-240381.1	3838	csasccaaAfaGfUfGfgacccucuauL96	4134	asUfsagaGfgGfUfccacUfuUfuggugsgsa	4430	UCCACCAAAAGUGGACCCUCUAU
AD-240382.1	3839	ascscaaaAfgUfGfGfacccucuauaL96	4135	usAfsuagAfgGfGfuccaCfuUfuuggusgsg	4431	CCACCAAAAGUGGACCCUCUAUA
AD-240383.1	3840	cscsaaaaGfuGfGfAfcccucuauauL96	4136	asUfsauaGfaGfGfguccAfcUfuuuggsusg	4432	CACCAAAAGUGGACCCUCUAUAU
AD-240385.1	3841	asasaaguGfgAfCfCfcucuauauuuL96	4137	asAfsauaUfaGfAfggguCfcAfcuuuusgsg	4433	CCAAAAGUGGACCCUCUAUAUUU
AD-240386.1	3842	asasagugGfaCfCfCfucuauauuuaL96	4138	usAfsaauAfuAfGfagggUfcCfacuuususg	4434	CAAAAGUGGACCCUCUAUAUUUC
AD-240387.1	3843	asasguggAfcCfCfUfcuauauuucaL96	4139	usGfsaaaUfaUfAfgaggGfuCfcacuususu	4435	AAAAGUGGACCCUCUAUAUUUCC
AD-240419.1	3844	asusacauUfaUfGfAfaaggugaccaL96	4140	usGfsgucAfcCfUfuucaUfaAfuguauscsu	4436	AGAUACAUUAUGAAAGGUGACCG
AD-240420.1	3845	usascauuAfuGfAfAfaggugaccgaL96	4141	usCfsgguCfaCfCfuuucAfuAfauguasusc	4437	GAUACAUUAUGAAAGGUGACCGA

AD-240421.1	3846	ascsauuaUfgAfAfAfggugaccgaaL96	4142	usUfscggUfcAfCfcuuuCfaUfaaugusasu	4438	AUACAUUAUGAAAGGUGACCGAC
AD-240422.1	3847	csasuuauGfaAfAfGfgugaccgacuL96	4143	asGfsucgGfuCfAfccuuUfcAfuaaugsusa	4439	UACAUUAUGAAAGGUGACCGACU
AD-240423.1	3848	asusuaugAfaAfGfGfugaccgacuaL96	4144	usAfsgucGfgUfCfaccuUfuCfauaausgsu	4440	ACAUUAUGAAAGGUGACCGACUC
AD-240431.1	3849	asgsgugaCfcGfAfCfucuauuuuaaL96	4145	usUfsaaaAfuAfGfagucGfgUfcaccususu	4441	AAAGGUGACCGACUCUAUUUUAA
AD-240446.1	3850	asuscucaGfaAfUfUfuuaaguucuaL96	4146	usAfsgaaCfuUfAfaaauUfcUfgagaususu	4442	AAAUCUCAGAAUUUUAAGUUCUA
AD-240474.1	3851	csusuucaUfaUfAfUfccuugguccaL96	4147	usGfsgacCfaAfGfgauaUfaUfgaaagscsa	4443	UGCUUUCAUAUAUCCUUGGUCCC
AD-240475.1	3852	ususucauAfuAfUfCfcuuggucccaL96	4148	usGfsggaCfcAfAfggauAfuAfugaaasgsc	4444	GCUUUCAUAUAUCCUUGGUCCCA
AD-240476.1	3853	ususcauaUfaUfCfCfuugguccaaL96	4149	usUfsgggAfcCfAfaggaUfaUfaugaasasg	4445	CUUUCAUAUAUCCUUGGUCCCAG
AD-240490.1	3854	gsuscccaGfaGfAfUfguuuagacaaL96	4150	usUfsgucUfaAfAfcaucUfcUfgggacscsa	4446	UGGUCCCAGAGAUGUUUAGACAA
AD-240494.1	3855	csasgagaUfgUfUfUfagacaauuuuL96	4151	asAfsaauUfgUfCfuaaaCfaUfcucugsgsg	4447	CCCAGAGAUGUUUAGACAAUUUU
AD-240495.1	3856	asgsagauGfuUfUfAfgacaauuuuaL96	4152	usAfsaaaUfuGfUfcuaaAfcAfucucusgsg	4448	CCAGAGAUGUUUAGACAAUUUUA

AD-240501.1	3857	gsusuuagAfcAfAfUfuuuaggcucaL96	4153	usGfsagcCfuAfAfaauuGfuCfuaaacsasu	4449	AUGUUUAGACAAUUUUAGGCUCA
AD-240502.1	3858	ususuagaCfaAfUfUfuuaggcucaaL96	4154	usUfsgagCfcUfAfaaauUfgUfcuaaascsa	4450	UGUUUAGACAAUUUUAGGCUCAA
AD-240503.1	3859	ususagacAfaUfUfUfuaggcucaaaL96	4155	usUfsugaGfcCfUfaaaaUfuGfucuaasasc	4451	GUUUAGACAAUUUUAGGCUCAAA
AD-240504.1	3860	usasgacaAfuUfUfUfaggcucaaaaL96	4156	usUfsuugAfgCfCfuaaaAfuUfgucuasasa	4452	UUUAGACAAUUUUAGGCUCAAAA
AD-240505.1	3861	asgsacaaUfuUfUfAfggcucaaaaaL96	4157	usUfsuuuGfaGfCfcuaaAfaUfugucusasa	4453	UUAGACAAUUUUAGGCUCAAAAA
AD-240507.1	3862	ascsaauuUfuAfGfGfcucaaaaauuL96	4158	asAfsuuuUfuGfAfgccuAfaAfauuguscsu	4454	AGACAAUUUUAGGCUCAAAAAUU
AD-240512.1	3863	ususuaggCfuCfAfAfaaauuaaagaL96	4159	usCfsuuuAfaUfUfuuugAfgCfcuaaasasu	4455	AUUUUAGGCUCAAAAAUUAAAGC
AD-240513.1	3864	ususaggcUfcAfAfAfaauuaaagcuL96	4160	asGfscuuUfaAfUfuuuuGfaGfccuaasasa	4456	UUUUAGGCUCAAAAAUUAAAGCU
AD-240514.1	3865	usasggcuCfaAfAfAfauuaaagcuaL96	4161	usAfsgcuUfuAfAfuuuuUfgAfgccuasasa	4457	UUUAGGCUCAAAAAUUAAAGCUA
AD-240538.1	3866	csasggaaAfaGfGfAfacuguacugaL96	4162	usCfsaguAfcAfGfuuccUfuUfuccugsusg	4458	CACAGGAAAAGGAACUGUACUGG
AD-240540.1	3867	gsgsaaaaGfgAfAfCfuguacuggcuL96	4163	asGfsccaGfuAfCfaguuCfcUfuuuccsusg	4459	CAGGAAAAGGAACUGUACUGGCU

AD-240542.1	3868	asasaaggAfaCfUfGfuacuggcuauL96	4164	asUfsagcCfaGfUfacagUfuCfcuuuuscsc	4460	GGAAAAGGAACUGUACUGGCUAU
AD-240545.1	3869	asgsgaacUfgUfAfCfuggcauuuaaL96	4165	usUfsaauAfgCfCfaguaCfaGfuuccususu	4461	AAAGGAACUGUACUGGCUAUUAC
AD-240546.1	3870	gsgsaacuGfuAfCfUfggcauuacaL96	4166	usGfsuaaUfaGfCfcaguAfcAfguuccsusu	4462	AAGGAACUGUACUGGCUAUUACA
AD-240779.1	3871	usasauccGfaCfUfCfccacuacauaL96	4167	usAfsuguAfgUfGfggagUfcGfgauuasusu	4463	AAUAAUCCGACUCCCACUACAUC
AD-240782.1	3872	uscscgacUfcCfCfAfcuacaucaaaL96	4168	usUfsugaUfgUfAfguggGfaGfucggasusu	4464	AAUCCGACUCCCACUACAUCAAG
AD-240787.1	3873	csuscccaCfuAfCfAfucaagacuaaL96	4169	usUfsaguCfuUfGfauguAfgUfgggagsusc	4465	GACUCCCACUACAUCAAGACUAA
AD-240788.1	3874	uscsccacUfaCfAfUfcaagacuaauL96	4170	asUfsuagUfcUfUfgaugUfaGfugggasgsu	4466	ACUCCCACUACAUCAAGACUAAU
AD-240789.1	3875	cscscacuAfcAfUfCfaagacuaauaL96	4171	usAfsuuaGfuCfUfugauGfuAfgugggsasg	4467	CUCCCACUACAUCAAGACUAAUC
AD-240790.1	3876	cscsacuaCfaUfCfAfagacuaaucuL96	4172	asGfsauuAfgUfCfuugaUfgUfaguggsgsa	4468	UCCCACUACAUCAAGACUAAUCU
AD-240792.1	3877	ascsuacaUfcAfAfGfacuaaucuuaL96	4173	usAfsagaUfuAfGfucuuGfaUfguagusgsg	4469	CCACUACAUCAAGACUAAUCUUG
AD-240793.1	3878	csusacauCfaAfGfAfcuaaucuuguL96	4174	asCfsaagAfuUfAfgucuUfgAfuguagsusg	4470	CACUACAUCAAGACUAAUCUUGU
AD-240794.1	3879	usascaucAfaGfAfCfuaaucu	4175	asAfscaaGfaUfUfagucUfuGf	4471	ACUACAUCAAGACUAAUC

		uguuL96		auguasgsu		UUGUU
AD-240795.1	3880	ascsaucaAfgAfCfUfaaucuu guuuL96	4176	asAfsacaAfgAfUfuaguCfuU fgaugusasg	4472	CUACAUCAAGACUAAUCU UGUUU
AD-240826.1	3881	gsusauuaUfaGfAfAfugcuu uugcaL96	4177	usGfscaaAfaGfCfauucUfaUf aauacsasu	4473	AUGUAUUAUAGAAUGCU UUUGCA
AD-240830.1	3882	usasuagaAfuGfCfUfuuugca uggaL96	4178	usCfscauGfcAfAfaagcAfuUf cuauasasu	4474	AUUAUAGAAUGCUUUUGC AUGGA
AD-240833.1	3883	asgsaaugCfuUfUfUfgcaugg acuaL96	4179	usAfsgucCfaUfGfcaaaAfgCf auucusasu	4475	AUAGAAUGCUUUUGCAUG GACUA
AD-240834.1	3884	gsasaugcUfuUfUfGfcaugga cuauL96	4180	asUfsaguCfcAfUfgcaaAfaGf cauucsusa	4476	UAGAAUGCUUUUGCAUGG ACUAU
AD-240837.1	3885	usgscuuuUfgCfAfUfggacu auccuL96	4181	asGfsgauAfgUfCfcaugCfaAf aagcasusu	4477	AAUGCUUUUGCAUGGACU AUCCU
AD-240839.1	3886	csusuuugCfaUfGfGfacuauc cucuL96	4182	asGfsaggAfuAfGfuccaUfgC faaaagscsa	4478	UGCUUUUGCAUGGACUAU CCUCU
AD-240843.1	3887	usgscaugGfaCfUfAfuccucu uguuL96	4183	asAfscaaGfaGfGfauagUfcCf augcasasa	4479	UUUGCAUGGACUAUCCUC UUGUU
AD-240844.1	3888	gscsauggAfcUfAfUfccucuu guuuL96	4184	asAfsacaAfgAfGfgauaGfuCf caugcsasa	4480	UUGCAUGGACUAUCCUCU UGUUU
AD-240871.1	3889	asasauaaCfcUfCfUfuguagu uauaL96	4185	usAfsuaaCfuAfCfaagaGfgUf uauuususu	4481	AAAAAUAACCUCUUGUAG UUAUA
AD-240875.1	3890	asasccucUfuGfUfAfguuaua aaauL96	4186	asUfsuuuAfuAfAfcuacAfaG fagguusasu	4482	AUAACCUCUUGUAGUUAU AAAAU

Таблица 4

Скрининг HSD17B13 in vitro в концентрации 50 nM на клетках Cos-7 (вектор с двойной люциферазой psiCHECK2)

Название дуплекса	% оставшихся транскриптов человека 50 нМ	STDEV 50 нМ
AD-238911.1	56,0	9,0
AD-238912.1	103,7	14,5
AD-238913.1	51,6	9,4
AD-238929.1	51,8	10,1
AD-238930.1	63,6	6,7
AD-238932.1	53,7	10,3
AD-238960.1	35,1	3,6
AD-238979.1	25,6	4,7
AD-238991.1	31,8	2,0
AD-239009.1	81,1	15,9
AD-239015.1	94,7	11,3
AD-239016.1	63,8	4,5
AD-239017.1	45,4	9,9
AD-239018.1	68,7	10,7
AD-239019.1	36,9	7,4
AD-239020.1	52,7	5,1
AD-239031.1	19,4	2,5
AD-239062.1	33,5	6,4
AD-239066.1	45,5	3,8
AD-239103.1	12,8	1,3
AD-239110.1	14,0	2,1
AD-239118.1	57,0	8,6
AD-239119.1	38,6	1,6
AD-239131.1	65,9	9,1
AD-239132.1	39,4	13,4
AD-239133.1	31,7	3,2
AD-239146.1	13,5	1,6
AD-239155.1	27,5	1,9

AD-239156.1	81,1	12,5
AD-239177.1	27,7	5,2
AD-239178.1	60,6	7,0
AD-239179.1	42,9	8,4
AD-239180.1	83,8	16,0
AD-239181.1	43,2	8,0
AD-239182.1	34,0	5,5
AD-239183.1	24,3	3,1
AD-239185.1	82,9	12,6
AD-239186.1	89,0	9,8
AD-239187.1	85,1	18,1
AD-239188.1	64,5	3,0
AD-239189.1	70,7	8,9
AD-239190.1	91,9	7,9
AD-239191.1	58,9	10,3
AD-239192.1	60,7	17,3
AD-239193.1	61,9	8,1
AD-239194.1	74,4	6,2
AD-239196.1	94,7	17,1
AD-239198.1	100,9	22,5
AD-239199.1	47,3	12,8
AD-239203.1	40,4	2,3
AD-239214.1	33,3	6,2
AD-239215.1	38,9	8,4
AD-239239.1	53,4	7,2
AD-239240.1	27,8	1,8
AD-239241.1	51,4	11,1
AD-239242.1	17,8	2,1
AD-239243.1	54,1	12,2
AD-239245.1	51,6	9,6
AD-239246.1	21,8	4,1
AD-239247.1	30,9	5,0
AD-239250.1	54,2	8,4
AD-239251.1	15,9	6,0

AD-239253.1	22,4	5,0
AD-239254.1	47,2	15,2
AD-239255.1	49,1	5,7
AD-239290.1	31,4	8,3
AD-239291.1	27,9	8,6
AD-239292.1	30,2	4,2
AD-239293.1	51,8	16,1
AD-239304.1	61,4	11,8
AD-239312.1	99,1	12,9
AD-239313.1	95,8	5,0
AD-239314.1	84,2	4,7
AD-239316.1	52,2	2,2
AD-239317.1	27,7	4,6
AD-239318.1	33,6	8,4
AD-239321.1	37,5	3,1
AD-239332.1	28,5	5,9
AD-239337.1	52,0	17,0
AD-239348.1	26,0	4,3
AD-239362.1	49,7	7,9
AD-239366.1	68,4	10,0
AD-239368.1	26,9	3,5
AD-239372.1	48,0	6,3
AD-239373.1	50,8	12,0
AD-239379.1	21,5	6,9
AD-239380.1	18,1	3,2
AD-239387.1	16,6	1,6
AD-239397.1	15,3	2,3
AD-239411.1	46,6	12,2
AD-239412.1	76,0	19,4
AD-239431.1	60,2	8,3
AD-239433.1	58,5	11,7
AD-239436.1	77,6	5,7
AD-239437.1	46,9	6,2
AD-239438.1	89,3	27,8

AD-239439.1	61,7	13,6
AD-239450.1	67,4	4,5
AD-239451.1	38,9	7,3
AD-239452.1	84,0	17,0
AD-239453.1	69,1	4,1
AD-239475.1	77,3	13,1
AD-239476.1	67,4	15,1
AD-239478.1	79,3	6,2
AD-239479.1	58,0	4,6
AD-239480.1	26,6	2,8
AD-239482.1	24,3	5,8
AD-239483.1	39,7	8,7
AD-239499.1	53,4	11,4
AD-239510.1	64,1	7,5
AD-239520.1	21,1	3,2
AD-239521.1	26,4	7,7
AD-239522.1	34,2	4,4
AD-239534.1	64,5	14,1
AD-239539.1	68,8	10,5
AD-239544.1	48,5	10,2
AD-239566.1	43,3	5,3
AD-239578.1	19,3	1,8
AD-239579.1	67,0	7,5
AD-239611.1	43,1	10,0
AD-239612.1	54,7	2,8
AD-239613.1	69,7	12,4
AD-239617.1	108,1	8,3
AD-239618.1	32,5	8,9
AD-239637.1	29,8	7,2
AD-239641.1	52,6	8,7
AD-239642.1	11,4	2,0
AD-239643.1	17,2	5,2
AD-239645.1	30,5	8,5
AD-239647.1	33,6	4,5

AD-239649.1	38,4	2,2
AD-239650.1	79,5	16,5
AD-239653.1	42,8	7,3
AD-239654.1	74,4	7,0
AD-239662.1	26,8	7,9
AD-239668.1	27,3	3,8
AD-239669.1	27,7	6,0
AD-239670.1	23,1	3,0
AD-239671.1	21,1	7,9
AD-239674.1	16,4	4,9
AD-239676.1	31,3	6,6
AD-239681.1	19,4	5,5
AD-239682.1	39,9	2,9
AD-239684.1	56,3	9,9
AD-239685.1	29,4	6,0
AD-239697.1	26,9	2,2
AD-239713.1	28,4	4,6
AD-239714.1	10,4	1,1
AD-239717.1	18,3	1,5
AD-239721.1	14,4	3,7
AD-239723.1	54,7	4,1
AD-239724.1	18,5	4,7
AD-239725.1	27,2	7,2
AD-239726.1	29,8	4,7
AD-239755.1	14,3	11,2
AD-239757.1	36,0	4,1
AD-239759.1	23,8	5,5
AD-239761.1	73,7	8,8
AD-239764.1	91,7	7,8
AD-239778.1	25,3	8,7
AD-239779.1	20,0	4,1
AD-239780.1	28,9	7,3
AD-239781.1	14,1	3,5
AD-239782.1	22,3	3,8

AD-239783.1	10,1	1,7
AD-239784.1	16,6	5,5
AD-239785.1	15,0	3,4
AD-239786.1	11,9	0,8
AD-239787.1	8,6	2,1
AD-239791.1	15,8	2,3
AD-239793.1	9,9	0,5
AD-239806.1	33,1	11,4
AD-239839.1	40,2	8,9
AD-239840.1	47,9	5,6
AD-239854.1	27,8	9,0
AD-239855.1	16,6	1,4
AD-239876.1	25,6	10,2
AD-239877.1	8,9	0,9
AD-239881.1	11,1	2,7
AD-239905.1	18,2	1,8
AD-239914.1	28,2	4,6
AD-239915.1	37,4	8,6
AD-239941.1	18,0	6,7
AD-239944.1	35,4	5,9
AD-239945.1	18,5	2,6
AD-239946.1	19,5	6,6
AD-239947.1	17,5	4,3
AD-239977.1	13,7	2,7
AD-239979.1	12,5	3,8
AD-239980.1	12,9	2,6
AD-239998.1	32,1	2,1
AD-240019.1	25,1	3,2
AD-240031.1	12,4	2,4
AD-240032.1	30,6	3,2
AD-240033.1	30,8	1,5
AD-240064.1	19,6	4,1
AD-240090.1	96,3	8,5
AD-240091.1	53,6	4,7

AD-240108.1	29,4	1,9
AD-240117.1	85,3	10,6
AD-240124.1	78,2	7,7
AD-240125.1	82,3	17,8
AD-240126.1	56,2	2,0
AD-240135.1	33,4	13,3
AD-240138.1	35,3	4,7
AD-240140.1	12,7	3,5
AD-240142.1	15,9	3,9
AD-240145.1	15,1	1,1
AD-240147.1	24,6	3,7
AD-240148.1	18,9	4,5
AD-240154.1	62,0	4,5
AD-240155.1	24,9	5,6
AD-240156.1	22,8	5,7
AD-240171.1	28,6	5,1
AD-240172.1	36,6	5,3
AD-240192.1	32,6	3,8
AD-240227.1	54,8	10,6
AD-240228.1	51,8	10,9
AD-240237.1	44,2	10,9
AD-240245.1	85,3	14,5
AD-240276.1	27,6	5,2
AD-240278.1	16,7	2,8
AD-240279.1	16,6	7,6
AD-240280.1	13,2	3,3
AD-240308.1	40,6	5,6
AD-240309.1	59,7	8,3
AD-240310.1	43,0	15,0
AD-240311.1	85,9	12,1
AD-240312.1	58,6	8,7
AD-240313.1	32,1	2,0
AD-240315.1	36,0	6,5
AD-240317.1	28,0	1,8

AD-240318.1	18,9	2,2
AD-240319.1	49,2	4,4
AD-240322.1	47,2	7,2
AD-240324.1	31,4	1,6
AD-240326.1	21,3	3,6
AD-240327.1	24,9	5,4
AD-240333.1	12,0	2,4
AD-240364.1	57,4	7,4
AD-240365.1	92,1	2,3
AD-240375.1	97,7	21,7
AD-240378.1	41,5	5,6
AD-240381.1	22,4	7,1
AD-240382.1	22,5	5,9
AD-240383.1	27,0	3,2
AD-240385.1	23,2	4,1
AD-240386.1	29,9	3,4
AD-240387.1	45,7	5,2
AD-240419.1	76,4	17,2
AD-240420.1	50,1	8,4
AD-240421.1	40,9	6,3
AD-240422.1	44,9	11,0
AD-240423.1	30,4	6,5
AD-240431.1	28,7	3,5
AD-240446.1	13,9	1,7
AD-240474.1	41,8	5,0
AD-240475.1	70,9	15,3
AD-240476.1	15,7	3,4
AD-240490.1	27,9	6,3
AD-240494.1	13,8	4,5
AD-240495.1	19,6	0,9
AD-240501.1	47,6	5,9
AD-240502.1	18,7	3,8
AD-240503.1	19,6	7,0
AD-240504.1	17,2	2,6

AD-240505.1	18,3	3,4
AD-240507.1	23,8	3,3
AD-240512.1	24,6	2,4
AD-240513.1	70,6	9,0
AD-240514.1	22,4	3,1
AD-240538.1	40,7	4,2
AD-240540.1	46,7	8,3
AD-240542.1	21,1	4,0
AD-240545.1	26,7	4,4
AD-240546.1	35,2	3,1
AD-240779.1	31,2	4,4
AD-240782.1	27,9	2,8
AD-240787.1	27,4	4,6
AD-240788.1	16,9	3,9
AD-240789.1	32,5	2,9
AD-240790.1	18,9	5,1
AD-240792.1	28,4	9,9
AD-240793.1	22,4	1,9
AD-240794.1	13,9	1,1
AD-240795.1	25,9	5,2
AD-240826.1	15,2	1,9
AD-240830.1	32,1	7,2
AD-240833.1	25,1	5,0
AD-240834.1	15,3	3,1
AD-240837.1	29,2	5,8
AD-240839.1	14,3	2,6
AD-240843.1	8,4	1,7
AD-240844.1	33,8	8,1
AD-240871.1	18,9	3,2
AD-240875.1	18,0	1,6

Таблица 5

Скрининг HSD17B13 in vitro в концентрации 50 нМ на первичных гепатоцитах человека

Название дуплекса	% оставшихся транскриптов человека 50 нМ	STDEV 50 нМ
AD-238911.1	116,8	40,6
AD-238912.1	83,9	15,4
AD-238913.1	96,3	14,1
AD-238929.1	82,9	14,7
AD-238930.1	86,4	6,6
AD-238932.1	72,4	23,3
AD-238960.1	64,8	28,2
AD-238979.1	48,1	25,1
AD-238991.1	31,3	7,3
AD-239009.1	34,1	9,3
AD-239015.1	90,4	15,8
AD-239016.1	51,7	13,0
AD-239017.1	31,8	10,1
AD-239018.1	75,5	16,0
AD-239019.1	56,0	22,6
AD-239020.1	59,9	19,3
AD-239031.1	46,6	17,3
AD-239062.1	61,9	21,9
AD-239066.1	61,1	17,3
AD-239103.1	41,0	21,7
AD-239110.1	31,8	7,7
AD-239118.1	48,3	3,7
AD-239119.1	56,2	12,7
AD-239131.1	75,2	18,1
AD-239132.1	90,1	34,9
AD-239133.1	52,0	10,7
AD-239146.1	72,1	35,4
AD-239155.1	39,1	9,8

AD-239156.1	79,3	24,4
AD-239177.1	55,1	15,6
AD-239178.1	72,0	21,4
AD-239179.1	57,8	10,5
AD-239180.1	36,3	8,4
AD-239181.1	60,6	19,7
AD-239182.1	42,4	6,4
AD-239183.1	29,3	13,1
AD-239185.1	68,4	21,1
AD-239186.1	87,7	23,4
AD-239187.1	83,2	14,4
AD-239188.1	54,2	13,2
AD-239189.1	74,5	31,3
AD-239190.1	57,4	3,5
AD-239191.1	49,8	21,9
AD-239192.1	33,9	13,5
AD-239193.1	96,3	36,6
AD-239194.1	63,1	18,3
AD-239196.1	43,5	11,6
AD-239198.1	93,8	8,0
AD-239199.1	44,2	21,5
AD-239203.1	68,2	19,0
AD-239214.1	40,3	8,3
AD-239215.1	71,6	25,3
AD-239239.1	53,9	32,4
AD-239240.1	23,8	6,5
AD-239241.1	56,2	10,0
AD-239242.1	46,0	15,0
AD-239243.1	97,6	73,4
AD-239245.1	84,7	9,2
AD-239246.1	37,6	11,2
AD-239247.1	36,5	15,9
AD-239250.1	34,1	6,8
AD-239251.1	19,3	3,7

AD-239253.1	26,3	6,9
AD-239254.1	52,5	13,7
AD-239255.1	52,8	18,1
AD-239290.1	46,3	30,0
AD-239291.1	53,1	25,1
AD-239292.1	49,8	18,6
AD-239293.1	49,5	15,6
AD-239304.1	32,9	10,3
AD-239312.1	83,1	13,5
AD-239313.1	57,4	16,5
AD-239314.1	85,7	13,7
AD-239316.1	50,9	32,4
AD-239317.1	28,0	3,5
AD-239318.1	64,4	26,9
AD-239321.1	34,8	6,9
AD-239332.1	42,0	13,9
AD-239337.1	29,1	11,0
AD-239348.1	22,5	10,5
AD-239362.1	67,8	29,4
AD-239366.1	67,1	26,2
AD-239368.1	41,2	17,8
AD-239372.1	46,4	6,0
AD-239373.1	27,8	4,1
AD-239379.1	19,4	5,7
AD-239380.1	26,5	9,0
AD-239387.1	30,5	14,6
AD-239397.1	18,9	5,4
AD-239411.1	41,8	17,0
AD-239412.1	79,2	22,8
AD-239431.1	39,5	15,3
AD-239433.1	36,9	12,1
AD-239436.1	101,1	17,3
AD-239437.1	37,6	20,8
AD-239438.1	54,0	9,7

AD-239439.1	31,8	6,5
AD-239450.1	67,0	22,6
AD-239451.1	42,4	15,3
AD-239452.1	57,4	3,0
AD-239453.1	45,9	5,9
AD-239475.1	27,2	5,0
AD-239476.1	41,4	16,7
AD-239478.1	38,7	5,7
AD-239479.1	44,0	19,6
AD-239480.1	49,2	10,7
AD-239482.1	31,6	9,4
AD-239483.1	37,5	8,3
AD-239499.1	56,0	12,2
AD-239510.1	51,1	20,1
AD-239520.1	26,5	15,5
AD-239521.1	33,4	19,0
AD-239522.1	36,2	18,2
AD-239534.1	30,7	17,4
AD-239539.1	76,9	31,7
AD-239544.1	21,3	10,9
AD-239566.1	39,1	8,1
AD-239578.1	19,9	12,4
AD-239579.1	24,7	6,7
AD-239611.1	38,8	34,7
AD-239612.1	60,9	15,4
AD-239613.1	76,4	15,6
AD-239617.1	186,1	52,1
AD-239618.1	32,0	5,2
AD-239637.1	22,8	2,8
AD-239641.1	35,9	14,0
AD-239642.1	31,5	28,5
AD-239643.1	12,0	1,7
AD-239645.1	29,6	11,6
AD-239647.1	24,9	7,3

AD-239649.1	35,0	4,2
AD-239650.1	51,2	3,7
AD-239653.1	48,8	26,5
AD-239654.1	105,2	35,2
AD-239662.1	27,5	12,0
AD-239668.1	31,5	9,1
AD-239669.1	42,4	24,3
AD-239670.1	53,3	17,1
AD-239671.1	26,2	11,1
AD-239674.1	17,3	9,5
AD-239676.1	42,1	13,1
AD-239681.1	24,9	11,4
AD-239682.1	12,7	4,5
AD-239684.1	15,2	1,4
AD-239685.1	24,9	6,1
AD-239697.1	15,1	6,2
AD-239713.1	24,6	7,4
AD-239714.1	23,6	18,1
AD-239717.1	36,6	33,7
AD-239721.1	7,3	3,4
AD-239723.1	47,2	12,1
AD-239724.1	29,1	7,8
AD-239725.1	17,7	15,4
AD-239726.1	45,9	13,2
AD-239755.1	19,0	4,6
AD-239757.1	28,6	3,2
AD-239759.1	10,7	3,3
AD-239761.1	60,2	11,2
AD-239764.1	56,4	15,6
AD-239778.1	45,9	32,9
AD-239779.1	18,2	12,0
AD-239780.1	34,5	22,1
AD-239781.1	30,1	16,8
AD-239782.1	37,3	12,4

AD-239783.1	13,0	6,8
AD-239784.1	43,1	14,0
AD-239785.1	9,9	8,9
AD-239786.1	16,9	10,0
AD-239787.1	15,9	9,3
AD-239791.1	11,7	5,4
AD-239793.1	11,1	3,2
AD-239806.1	29,4	13,5
AD-239839.1	60,6	13,8
AD-239840.1	36,7	23,2
AD-239854.1	39,0	20,3
AD-239855.1	31,6	5,2
AD-239876.1	34,6	10,8
AD-239877.1	35,8	21,8
AD-239881.1	47,0	11,9
AD-239905.1	36,6	8,2
AD-239914.1	30,4	13,9
AD-239915.1	51,3	25,7
AD-239941.1	111,8	60,8
AD-239944.1	63,6	23,9
AD-239945.1	58,6	23,0
AD-239946.1	65,3	28,6
AD-239947.1	77,7	16,6
AD-239977.1	54,5	16,5
AD-239979.1	61,4	14,4
AD-239980.1	87,8	41,2
AD-239998.1	54,8	14,7
AD-240019.1	76,7	23,6
AD-240031.1	63,1	18,5
AD-240032.1	51,6	13,5
AD-240033.1	69,7	41,4
AD-240064.1	81,0	32,4
AD-240090.1	145,8	80,6
AD-240091.1	75,2	17,1

AD-240108.1	62,2	18,9
AD-240117.1	54,4	2,3
AD-240124.1	63,3	25,7
AD-240125.1	68,6	18,1
AD-240126.1	77,4	10,9
AD-240135.1	64,9	33,1
AD-240138.1	59,3	17,7
AD-240140.1	65,2	21,2
AD-240142.1	42,9	6,6
AD-240145.1	58,2	10,2
AD-240147.1	56,7	14,3
AD-240148.1	35,0	12,2
AD-240154.1	39,2	19,5
AD-240155.1	57,2	22,1
AD-240156.1	71,9	28,3
AD-240171.1	66,4	22,8
AD-240172.1	50,4	12,9
AD-240192.1	43,5	3,8
AD-240227.1	62,1	19,7
AD-240228.1	50,6	12,7
AD-240237.1	67,2	9,5
AD-240245.1	99,3	21,4
AD-240276.1	49,9	16,6
AD-240278.1	31,8	6,1
AD-240279.1	46,2	2,4
AD-240280.1	68,4	16,4
AD-240308.1	72,7	15,4
AD-240309.1	85,8	2,0
AD-240310.1	58,9	16,1
AD-240311.1	74,2	21,0
AD-240312.1	83,3	7,3
AD-240313.1	70,4	15,1
AD-240315.1	66,1	7,6
AD-240317.1	52,0	11,1

AD-240318.1	65,1	24,1
AD-240319.1	38,8	7,7
AD-240322.1	69,9	10,1
AD-240324.1	79,6	37,5
AD-240326.1	29,8	3,0
AD-240327.1	62,6	11,3
AD-240333.1	60,3	31,5
AD-240364.1	81,0	16,8
AD-240365.1	104,1	31,5
AD-240375.1	111,2	18,0
AD-240378.1	85,1	33,8
AD-240381.1	87,8	18,3
AD-240382.1	51,9	9,5
AD-240383.1	45,6	13,2
AD-240385.1	53,5	6,6
AD-240386.1	63,3	6,8
AD-240387.1	75,8	26,0
AD-240419.1	81,2	11,1
AD-240420.1	69,3	32,6
AD-240421.1	93,8	17,0
AD-240422.1	75,6	38,5
AD-240423.1	75,7	14,1
AD-240431.1	53,2	2,4
AD-240446.1	93,2	30,6
AD-240474.1	74,7	22,8
AD-240475.1	74,4	29,5
AD-240476.1	37,2	2,4
AD-240490.1	82,0	34,8
AD-240494.1	62,3	14,1
AD-240495.1	102,5	39,4
AD-240501.1	33,9	4,9
AD-240502.1	40,6	5,7
AD-240503.1	63,4	31,4
AD-240504.1	55,0	7,7

AD-240505.1	73,0	22,1
AD-240507.1	68,3	23,1
AD-240512.1	55,0	19,6
AD-240513.1	54,9	14,8
AD-240514.1	33,8	16,7
AD-240538.1	51,3	13,3
AD-240540.1	72,1	11,2
AD-240542.1	60,0	9,0
AD-240545.1	45,9	23,8
AD-240546.1	46,2	18,4
AD-240779.1	64,8	22,4
AD-240782.1	77,7	20,3
AD-240787.1	59,6	16,9
AD-240788.1	54,2	12,0
AD-240789.1	58,9	24,6
AD-240790.1	54,0	14,7
AD-240792.1	67,2	9,2
AD-240793.1	54,9	14,6
AD-240794.1	69,3	18,8
AD-240795.1	34,5	7,2
AD-240826.1	56,5	16,8
AD-240830.1	63,7	14,4
AD-240833.1	84,9	28,4
AD-240834.1	50,2	15,1
AD-240837.1	46,3	16,3
AD-240839.1	54,9	18,4
AD-240843.1	46,4	13,9
AD-240844.1	38,2	10,3
AD-240871.1	92,8	35,8
AD-240875.1	72,0	13,2

ТАБЛИЦА 6

СКРИНИНГ HSD17B13 IN VITRO В КОНЦЕНТРАЦИИ 50 НМ НА ПЕРВИЧНЫХ ГЕПАТОЦИТАХ ОБЕЗЬЯН CYNOMOLGUS

Название дуплекса	% оставшихся транскриптов обезьяны Cynomolgus 50 нМ	STDEV 50 нМ
AD-238911.1	81,2	8,9
AD-238912.1	87,5	6,8
AD-238913.1	62,3	4,1
AD-238929.1	67,1	22,3
AD-238930.1	42,1	4,0
AD-238932.1	54,8	12,2
AD-238960.1	24,6	5,2
AD-238979.1	11,1	7,5
AD-238991.1	30,8	6,2
AD-239009.1	11,4	1,1
AD-239015.1	21,2	3,0
AD-239016.1	7,2	1,4
AD-239017.1	8,9	1,8
AD-239018.1	39,2	4,6
AD-239019.1	22,0	5,5
AD-239020.1	8,8	2,8
AD-239031.1	19,5	7,5
AD-239062.1	20,6	5,6
AD-239066.1	75,5	16,3
AD-239103.1	88,4	33,4
AD-239110.1	11,2	3,0
AD-239118.1	23,1	6,3
AD-239119.1	23,4	4,2
AD-239131.1	98,9	9,0
AD-239132.1	86,0	18,5
AD-239133.1	24,3	8,7
AD-239146.1	11,4	2,8
AD-239155.1	39,4	21,3
AD-239156.1	52,8	11,0
AD-239177.1	23,1	6,7
AD-239178.1	46,3	4,6

AD-239179.1	40,3	8,7
AD-239180.1	21,8	6,2
AD-239181.1	45,5	5,9
AD-239182.1	17,7	3,8
AD-239183.1	10,6	1,5
AD-239185.1	55,9	7,2
AD-239186.1	77,7	13,0
AD-239187.1	61,1	6,8
AD-239188.1	41,0	1,5
AD-239189.1	11,6	2,1
AD-239190.1	48,8	7,9
AD-239191.1	9,0	4,1
AD-239192.1	35,0	12,1
AD-239193.1	68,1	4,9
AD-239194.1	26,7	1,7
AD-239196.1	56,6	10,2
AD-239198.1	80,5	11,0
AD-239199.1	32,8	4,6
AD-239203.1	36,9	6,3
AD-239214.1	15,3	2,7
AD-239215.1	28,9	6,5
AD-239239.1	17,0	2,8
AD-239240.1	15,6	4,4
AD-239241.1	16,8	9,9
AD-239242.1	16,5	5,9
AD-239243.1	13,3	4,2
AD-239245.1	13,7	2,9
AD-239246.1	12,9	8,2
AD-239247.1	18,0	6,5
AD-239250.1	49,8	6,5
AD-239251.1	6,8	0,5
AD-239253.1	11,5	3,8
AD-239254.1	47,4	4,6
AD-239255.1	16,4	7,2

AD-239290.1	75,5	25,9
AD-239291.1	92,3	27,1
AD-239292.1	9,8	2,7
AD-239293.1	46,8	6,3
AD-239304.1	30,7	8,9
AD-239312.1	15,0	3,2
AD-239313.1	8,7	2,4
AD-239314.1	100,1	18,8
AD-239316.1	40,0	9,5
AD-239317.1	12,3	2,0
AD-239318.1	9,3	1,8
AD-239321.1	9,2	2,4
AD-239332.1	48,0	12,4
AD-239337.1	15,4	7,5
AD-239348.1	21,1	6,0
AD-239362.1	75,3	6,7
AD-239366.1	30,7	11,1
AD-239368.1	24,6	6,2
AD-239372.1	45,5	2,7
AD-239373.1	33,3	7,5
AD-239379.1	8,1	2,6
AD-239380.1	7,2	1,1
AD-239387.1	36,2	5,3
AD-239397.1	12,3	3,4
AD-239411.1	31,6	10,7
AD-239412.1	59,5	7,0
AD-239431.1	13,2	7,9
AD-239433.1	33,0	10,1
AD-239436.1	71,5	14,7
AD-239437.1	10,4	2,6
AD-239438.1	12,3	2,7
AD-239439.1	79,2	11,8
AD-239450.1	61,3	2,2
AD-239451.1	29,7	8,7

AD-239452.1	78,7	17,3
AD-239453.1	38,5	10,6
AD-239475.1	11,4	2,2
AD-239476.1	39,5	6,9
AD-239478.1	59,3	9,4
AD-239479.1	14,7	3,6
AD-239480.1	31,6	6,6
AD-239482.1	13,7	3,3
AD-239483.1	14,1	3,8
AD-239499.1	111,5	13,7
AD-239510.1	16,0	4,0
AD-239520.1	11,3	5,2
AD-239521.1	19,8	3,7
AD-239522.1	12,5	3,8
AD-239534.1	31,1	8,4
AD-239539.1	9,3	3,5
AD-239544.1	24,0	3,2
AD-239566.1	11,9	7,0
AD-239578.1	25,7	5,5
AD-239579.1	28,1	5,9
AD-239611.1	37,4	7,8
AD-239612.1	36,2	8,4
AD-239613.1	13,5	3,3
AD-239617.1	46,2	9,3
AD-239618.1	15,9	1,2
AD-239637.1	33,6	13,4
AD-239641.1	42,3	7,4
AD-239642.1	34,4	5,7
AD-239643.1	9,7	2,0
AD-239645.1	16,1	3,4
AD-239647.1	19,0	4,0
AD-239649.1	70,4	6,0
AD-239650.1	65,8	12,5
AD-239653.1	16,4	3,6

AD-239654.1	18,3	6,5
AD-239662.1	8,4	4,1
AD-239668.1	13,2	4,2
AD-239669.1	53,6	14,0
AD-239670.1	14,4	3,6
AD-239671.1	12,1	2,9
AD-239674.1	14,8	4,0
AD-239676.1	20,9	4,8
AD-239681.1	9,4	0,6
AD-239682.1	8,9	1,3
AD-239684.1	12,0	2,9
AD-239685.1	10,8	3,7
AD-239697.1	11,8	3,3
AD-239713.1	11,4	1,8
AD-239714.1	7,8	2,8
AD-239717.1	10,4	1,5
AD-239721.1	27,2	6,4
AD-239723.1	81,2	14,9
AD-239724.1	11,0	3,7
AD-239725.1	24,1	3,0
AD-239726.1	27,3	7,7
AD-239755.1	7,8	3,3
AD-239757.1	30,3	3,4
AD-239759.1	6,7	1,7
AD-239761.1	49,7	11,8
AD-239764.1	53,5	11,4
AD-239778.1	26,8	7,8
AD-239779.1	63,3	20,5
AD-239780.1	85,5	17,8
AD-239781.1	26,4	6,0
AD-239782.1	22,6	6,7
AD-239783.1	9,7	1,9
AD-239784.1	20,2	3,8
AD-239785.1	23,6	6,7

AD-239786.1	38,3	6,1
AD-239787.1	27,6	2,5
AD-239791.1	17,8	2,1
AD-239793.1	6,8	1,2
AD-239806.1	27,8	2,9
AD-239839.1	11,9	5,6
AD-239840.1	10,3	1,8
AD-239854.1	58,6	8,9
AD-239855.1	23,3	9,3
AD-239876.1	42,8	20,3
AD-239877.1	30,6	10,4
AD-239881.1	53,4	5,5
AD-239905.1	50,1	17,6
AD-239914.1	37,3	5,2
AD-239915.1	34,8	5,7
AD-239941.1	66,8	14,1
AD-239944.1	117,7	12,5
AD-239945.1	23,2	2,7
AD-239946.1	14,0	5,9
AD-239947.1	25,8	1,6
AD-239977.1	27,3	4,4
AD-239979.1	25,5	4,8
AD-239980.1	35,5	6,4
AD-239998.1	32,7	4,0
AD-240019.1	17,9	2,6
AD-240031.1	15,3	1,9
AD-240032.1	23,4	2,4
AD-240033.1	22,2	3,7
AD-240064.1	47,1	5,2
AD-240090.1	25,7	5,9
AD-240091.1	31,4	8,2
AD-240108.1	118,3	27,0
AD-240117.1	56,6	5,6
AD-240124.1	43,5	8,1

AD-240125.1	54,0	6,8
AD-240126.1	30,7	7,0
AD-240135.1	14,7	0,8
AD-240138.1	36,6	13,8
AD-240140.1	33,6	10,9
AD-240142.1	19,4	4,7
AD-240145.1	27,6	9,1
AD-240147.1	18,1	3,4
AD-240148.1	9,0	1,7
AD-240154.1	23,0	1,0
AD-240155.1	18,2	1,7
AD-240156.1	15,1	2,2
AD-240171.1	29,9	6,9
AD-240172.1	31,9	8,0
AD-240192.1	39,7	5,7
AD-240227.1	71,4	15,6
AD-240228.1	35,8	22,3
AD-240237.1	43,3	17,3
AD-240245.1	41,5	5,1
AD-240276.1	20,6	4,4
AD-240278.1	11,6	1,8
AD-240279.1	20,1	0,5
AD-240280.1	51,0	9,5
AD-240308.1	80,5	19,3
AD-240309.1	63,5	10,3
AD-240310.1	45,2	10,3
AD-240311.1	42,6	14,8
AD-240312.1	22,3	1,3
AD-240313.1	21,6	4,5
AD-240315.1	26,4	8,2
AD-240317.1	17,8	3,6
AD-240318.1	20,5	2,5
AD-240319.1	23,5	6,5
AD-240322.1	37,5	2,7

AD-240324.1	37,1	13,9
AD-240326.1	11,2	3,4
AD-240327.1	28,7	4,0
AD-240333.1	32,0	5,8
AD-240364.1	34,1	13,5
AD-240365.1	58,8	18,7
AD-240375.1	86,7	17,8
AD-240378.1	49,8	14,8
AD-240381.1	56,0	12,0
AD-240382.1	35,7	7,9
AD-240383.1	27,5	5,5
AD-240385.1	15,8	2,0
AD-240386.1	18,7	2,0
AD-240387.1	33,3	13,0
AD-240419.1	32,8	4,2
AD-240420.1	31,5	4,5
AD-240421.1	21,5	4,7
AD-240422.1	19,9	4,6
AD-240423.1	13,1	2,3
AD-240431.1	16,1	3,3
AD-240446.1	16,6	3,5
AD-240474.1	28,7	10,8
AD-240475.1	32,7	11,9
AD-240476.1	11,0	1,8
AD-240490.1	38,5	5,6
AD-240494.1	37,3	14,0
AD-240495.1	17,4	4,6
AD-240501.1	29,5	6,7
AD-240502.1	16,3	1,2
AD-240503.1	12,4	2,5
AD-240504.1	15,6	4,4
AD-240505.1	44,8	15,3
AD-240507.1	47,0	12,7
AD-240512.1	31,9	3,9

AD-240513.1	44,2	3,8
AD-240514.1	13,0	2,4
AD-240538.1	35,5	6,4
AD-240540.1	40,0	12,4
AD-240542.1	65,6	15,4
AD-240545.1	18,7	2,3
AD-240546.1	32,4	5,0
AD-240779.1	33,8	8,0
AD-240782.1	33,6	7,3
AD-240787.1	35,4	3,4
AD-240788.1	12,5	1,3
AD-240789.1	42,6	8,0
AD-240790.1	21,9	2,1
AD-240792.1	22,0	2,8
AD-240793.1	22,7	3,7
AD-240794.1	37,5	9,5
AD-240795.1	18,9	1,9
AD-240826.1	38,9	6,9
AD-240830.1	32,9	2,4
AD-240833.1	41,6	9,4
AD-240834.1	17,2	3,6
AD-240837.1	42,1	7,9
AD-240839.1	18,4	3,7
AD-240843.1	17,1	5,9
AD-240844.1	19,8	3,8
AD-240871.1	16,2	2,1
AD-240875.1	48,1	27,7

ПРИМЕР 2. КОНСТРУИРОВАНИЕ, СИНТЕЗ И ВЫБОР иРНК

В данном примере описаны методы конструирования, синтеза и выбора средства на основе иРНК HSD17B13.

БИОИНФОРМАТИКА

Был сконструирован набор миРНК, нацеленных на ген 17-бета-гидроксистероиддегидрогеназы 13 человека (HSD17B13; номер для доступа NCBI NM_178135.4; NCBI GeneID: 345275), а также на токсикологический видовой ортолог HSD17B13 обезьяны Cynomolgus: XM_005555367.2. с использованием языка R и Python-

скриптов. Все конструкции миРНК идеально соответствуют транскрипту HSD17B13 человека, и подмножество либо полностью, либо почти идеально соответствует ортологу обезьяны Cynomolgus. мРНК NM_178135 REFSEQ человека, вариант 4, имеет длину 2397 оснований. Обоснование и метод для набора конструкций миРНК являются следующими: прогнозируемая эффективность для каждой потенциальной 23-мерной миРНК от положения 10 до конца определяли с помощью модели Random forest, полученной из прямого измерения нокдауна мРНК из нескольких тысяч различных конструкций миРНК, нацеленных на разнообразный набор генов позвоночных. Для каждой цепи миРНК использовали пользовательский Python-скрипт методом грубого поиска для измерения количества и положений ошибочных спариваний между миРНК и всеми потенциальными выравниваниями в транскриптоме человека. Дополнительный вес придавали ошибочным спариваниям в затравочной области, определенной здесь как положения 2-9 антисмыслового олигонуклеотида, а также сайту расщепления миРНК, определенному здесь как положения 10-11 антисмыслового олигонуклеотида. Относительный вес ошибочных спариваний составлял 2,8, 1,2, 1 для ошибочных спариваний в затравочной области, сайте расщепления и других положениях до антисмыслового положения 19. Ошибочные спаривания в первом положении не учитывали. Оценка специфичности была рассчитана для каждой цепи суммированием значений каждого взвешенного ошибочного спаривания. Предпочтение отдавалось миРНК, оценка антисмысловой цепи которых у человека и обезьяны Cynomolgus составляла > = 2, и прогнозируемая эффективность составляла > = 50% нокдаун.

Скрининг in vitro на клетках Cos-7 (вектор с двойной люциферазой psiCHECK человеческой HSD17B13) и первичных гепатоцитах обезьяны Cynomolgus

Анализ люциферазы Dual-Glo®

Клетки Cos-7 (ATCC, Manassas, VA) культивировали почти до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в DMEM (ATCC) с добавлением 10% FBS перед их извлечением из планшета трипсинизацией. Опыты с несколькими концентрациями проводили при 10 и 0,1 нМ. миРНК и плазмиды для трансфекции psiCHECK2-HSD17B13 (NM_178135, клонированная в сайты XhoI-NotI) проводили добавлением 5 мкл дуплексов миРНК и 5 мкл (5 нг) плазмиды psiCHECK2-HSD17B13 на лунку вместе с 4,9 мкл Opti-MEMofe плюс 0,1 мкл липофектамина 2000 на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, кат. # 13778-150), и затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем смесь добавляли к клеткам, которые ресуспендировали в 35 мкл свежей полной среды. Трансфектированные клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO2.

Через 48 ч миРНК и плазмиды psiCHECK2-HSD17B13 трансфектировали; измеряли активность люциферазы светлячка (контроль трансфекции) и люциферазы Renilla (слитая с последовательностью-мишенью HSD17B13). Сначала из клеток удаляли среду. Затем измеряли активность люциферазы светлячка, добавляя 20 мкл люциферазного реагента Dual-Glo®, равного объему культуральной среды, в каждую лунку и перемешивали. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин перед измерением

люминесценции (500 нм) на Spectramax (Molecular Devices) для детектирования сигнала люциферазы светлячка. В каждую лунку добавляли 20 мкл реагента Dual-Glo® Stop & Glo® при комнатной температуре, и планшеты инкубировали в течение 10-15 мин перед повторным измерением люминесценции для определения сигнала люциферазы Renilla. Реагент Dual-Glo® Stop & Glo® гасит сигнал люциферазы светлячка и обеспечивает устойчивое свечение люциферазной реакции с Renilla. Активность миРНК определяли нормализацией сигнала люциферазы Renilla (HSD17B13) к сигналу люциферазы светлячка (контроль) в каждой лунке. Затем оценивали величину активности миРНК относительно клеток, которые были трансфектированы тем же вектором, но не были обработаны миРНК или обработаны не целевой миРНК. Все трансфекции выполняли при n=2 или более.

Культура клеток и трансфекции

Первичные гепатоциты обезьяны Cynomolgus (Bioreclamation/IVT) трансфектировали, добавляя 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл RNAiMAX на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, кат. # 13778-150) к 5 мкл дуплексов миРНК на лунку, с 4 повторами для каждого дуплекса миРНК в 384-луночный планшет и инкубировали планшет при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляли 40 мкл посевной среды InVitroGRO CP (Bioreclamation/IVT), содержащей примерно 5×10^3 клеток. Клетки инкубировали в течение 48 ч перед выделением РНК. Опыты с несколькими дозами проводили при 10 и 0,1 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора для выделения мРНК DYNABEADS

РНК выделяли с использованием автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с использованием DYNABEAD (Invitrogen, кат. № 61012). Вкратце, 70 мкл буфера для лизиса/связывания и 10 мкл буфера для лизиса, содержащего 3 мкл магнитных шариков, добавляли в планшет с клетками. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, затем магнитные шарики захватывали и удаляли супернатант. Связанную с шариками РНК затем промывали 2 раза 150 мкл буфера для промывания A и один раз буфером для промывания B. Затем шарики промывали 150 мкл буфера для элюирования, повторно захватывали и удаляли супернатант.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК ABI High capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, кат. № 4368813)

К РНК, выделенной как описано выше, добавляли 10 мкл мастер-смеси, содержащей 1 мкл 10× буфера, 0,4 мкл 25× dNTP, 1 мкл 10-кратных случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H2O на реакцию. Планшеты герметично закрывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, и затем в течение 2 ч при 37°C.

ПЦР в режиме реального времени

2 мкл кДНК добавляли к мастер-смеси, содержащей 0,5 мкл зонда Cyno GAPDH TaqMan (прямой праймер: 5'-GCATCCTGGGCTACACTGA-3'(SEQ ID NO: 4483), обратный

праймер: 5'-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3' (SEQ ID NO : 4484), зонд: 5'HEX-CCAGGTGGTCTCCTCC-3'BHQ-1 (SEQ ID NO: 4485)) и 0,5 мкл зонда для HSD17B13 обезьяны Cynomolgus (Mf02888851_m1) и 5 мкл мастер-смеси зонда Lightcycler 480 (Roche кат. № 04887301001) на лунку в 384-луночном планшете (Roche кат. № 04887301001). ПЦР в режиме реального времени проводили в системе LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали не менее двух раз, и данные нормализовали для клеток, трансфектированных нецелевой контрольной миРНК. Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием метода ΔΔCt и нормализовали по результатам анализов, проведенных с клетками, трансфектированных нецелевой контрольной миРНК.

Результаты

В таблице 7 представлены модифицированные последовательности HSD17B13 ELF7 GNA7. В таблице 8 представлены немодифицированные последовательности HSD17B13 ELF7 GNA7. Результаты с концентрацией 10 нМ скрининга модифицированных последовательностей HSD17B13 ELF7 GNA7 in vitro на клетках Cos-7 и первичных гепатоцитах обезьяны Cynomolgus обощены в таблице 9.

Аналогичным образом в таблице 10 представлены модифицированные последовательности ДНК HSD17B13 NonF. В таблице 11 представлены немодифицированные последовательности ДНК HSD17B13 NonF. В таблице 12 приведены результаты с концентрацией 10 нМ модифицированных последовательностей HSD17B13 NonF ДНК in vitro на клетках Cos-7 и первичных гематоцитах обезьяны Cynomolgus. «NonF» указывает на то, что в этих средствах для РНКи отсутствуют фтор-модификации.

Таблица 7

Модифицированные последовательности HSD17B13 ELF7 GNA7*

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишени 5’ к 3’	SEQ ID NO:
AD-286958.1	asgsuaccUfcCfUfCfccuaggacuaL96	2981	usAfsgucc(Tgn)agggagGfaGfguacusgsu	302	ACAGUACCUCCUCCCUAGGACUA	602
AD-287001.1	uscscuucUfgCfUfUfcugaucaccaL96	2982	usGfsguga(Tgn)cagaagCfaGfaaggasusu	303	AAUCCUUCUGCUUCUGAUCACCA	603
AD-287012.1	csasucauCfuAfCfUfccuacuuggaL96	2983	usCfscaag(Tgn)aggaguAfgAfugaugsgsu	304	ACCAUCAUCUACUCCUACUUGGA	604
AD-287014.1	uscsuacuCfcUfAfCfuuggagucguL96	2984	asCfsgacu(Cgn)caaguaGfgAfguagasusg	305	CAUCUACUCCUACUUGGAGUCGU	605
AD-287015.1	csusacucCfuAfCfUfuggagucguuL96	2985	asAfscgac(Tgn)ccaaguAfgGfaguagsasu	306	AUCUACUCCUACUUGGAGUCGUU	606
AD-287017.1	gsusaccuCfcUfCfCfcuaggacuauL96	2986	asUfsaguc(Cgn)uagggaGfgAfgguacsusg	307	CAGUACCUCCUCCCUAGGACUAC	607
AD-287026.1	ascsacaaGfgAfCfUfgaaccagaauL96	2987	asUfsucug(Ggn)uucaguCfcUfugugusasg	308	CUACACAAGGACUGAACCAGAAG	608
AD-287059.1	ascscaucAfuCfUfAfcuccuacuuuL96	2988	asAfsagua(Ggn)gaguagAfuGfauggusgsa	309	UCACCAUCAUCUACUCCUACUUG	609
AD-287060.1	cscsaucaUfcUfAfCfuccuacuuguL96	2989	asCfsaagu(Agn)ggaguaGfaUfgauggsusg	310	CACCAUCAUCUACUCCUACUUGG	610

AD-287061.1	asuscaucUfaCfUfCfcuacuuggauL96	2990	asUfsccaa(Ggn)uaggagUfaGfaugausgsg	311	CCAUCAUCUACUCCUACUUGGAG	611
AD-287062.1	csasucuaCfuCfCfUfacuuggaguuL96	2991	asAfscucc(Agn)aguaggAfgUfagaugsasu	312	AUCAUCUACUCCUACUUGGAGUC	612
AD-287064.1	usascuccUfaCfUfUfggagucguuuL96	2992	asAfsacga(Cgn)uccaagUfaGfgaguasgsa	313	UCUACUCCUACUUGGAGUCGUUG	613
AD-287065.1	ascsuccuAfcUfUfGfgagucguuguL96	2993	asCfsaacg(Agn)cuccaaGfuAfggagusasg	314	CUACUCCUACUUGGAGUCGUUGG	614
AD-287066.1	csusccuaCfuUfGfGfagucguugguL96	2994	asCfscaac(Ggn)acuccaAfgUfaggagsusa	315	UACUCCUACUUGGAGUCGUUGGU	615
AD-287126.1	uscscuacUfuGfGfAfgucguugguuL96	2995	asAfsccaa(Cgn)gacuccAfaGfuaggasgsu	316	ACUCCUACUUGGAGUCGUUGGUG	616
AD-287200.1	asascugcAfgCfUfGfagugccgaaaL96	2996	usUfsucgg(Cgn)acucagCfuGfcaguusc	317	GAAACUGCAGCUGAGUGCCGAAA	617
AD-287201.1	ascsugcaGfcUfGfAfgugccgaaaaL96	2997	usUfsuucg(Ggn)cacucaGfcUfgcagusu	318	AAACUGCAGCUGAGUGCCGAAAA	618
AD-287202.1	usgscagcUfgAfGfUfgccgaaaacuL96	2998	asGfsuuuu(Cgn)ggcacuCfaGfcugcasgsu	319	ACUGCAGCUGAGUGCCGAAAACU	619
AD-287203.1	gscsagcuGfaGfUfGfccgaaaacuaL96	2999	usAfsguuu(Tgn)cggcacUfcAfgcugcsasg	320	CUGCAGCUGAGUGCCGAAAACUA	620
AD-287205.1	asgsugccGfaAfAfAfcuaggcgucaL96	3000	usGfsacgc(Cgn)uaguuuUfcGfgcacuscsa	321	UGAGUGCCGAAAACUAGGCGUCA	621

AD-287206.1	usgsccgaAfaAfCfUfaggcgucacuL96	3001	asGfsugac(Ggn)ccuaguUfuUfcggcascsu	322	AGUGCCGAAAACUAGGCGUCACU	622
AD-287227.1	csusguggGfaUfAfUfuaauaagcguL96	3002	asCfsgcuu(Agn)uuaauaUfcCfcacagsasa	323	UUCUGUGGGAUAUUAAUAAGCGC	623
AD-287246.1	csusgcagCfuGfAfGfugccgaaaauL96	24	asUfsuuuc(Ggn)gcacucAfgCfugcagsusu	324	AACUGCAGCUGAGUGCCGAAAAC	624
AD-287247.1	csasgcugAfgUfGfCfcgaaaacuauL96	25	asUfsaguu(Tgn)ucggcaCfuCfagcugscsa	325	UGCAGCUGAGUGCCGAAAACUAG	625
AD-287248.1	asgscugaGfuGfCfCfgaaaacuaguL96	26	asCfsuagu(Tgn)uucggcAfcUfcagcusgsc	326	GCAGCUGAGUGCCGAAAACUAGG	626
AD-287249.1	gscsugagUfgCfCfGfaaaacuagguL96	27	asCfscuag(Tgn)uuucggCfaCfucagcsusg	327	CAGCUGAGUGCCGAAAACUAGGC	627
AD-287250.1	csusgaguGfcCfGfAfaaacuaggcuL96	28	asGfsccua(Ggn)uuuucgGfcAfcucagscsu	328	AGCUGAGUGCCGAAAACUAGGCG	628
AD-287251.1	gsasgugcCfgAfAfAfacuaggcguuL96	29	asAfscgcc(Tgn)aguuuuCfgGfcacucsasg	329	CUGAGUGCCGAAAACUAGGCGUC	629
AD-287252.1	gsusgccgAfaAfAfCfuaggcgucauL96	30	asUfsgacg(Cgn)cuaguuUfuCfggcacsusc	330	GAGUGCCGAAAACUAGGCGUCAC	630
AD-287253.1	gscscgaaAfaCfUfAfggcgucacuuL96	31	asAfsguga(Cgn)gccuagUfuUfucggcsasc	331	GUGCCGAAAACUAGGCGUCACUG	631
AD-287254.1	cscsgaaaAfcUfAfGfgcgucacuguL96	32	asCfsagug(Agn)cgccuaGfuUfuucggscsa	332	UGCCGAAAACUAGGCGUCACUGC	632

AD-287258.1	ascsuaggCfgUfCfAfcug cgcauguL96	33	asCfsaugc(Ggn)cagugaCfgCfcuagu susu	333	AAACUAGGCGUCACUGCGC AUGC	633
AD-287287.1	gsasucuaUfcGfCfUfcuc uaaaucaL96	34	usGfsauuu(Agn)gagagcGfaUfagauc susc	334	GAGAUCUAUCGCUCUCUAA AUCA	634
AD-287288.1	csusaucgCfuCfUfCfuaaa ucagguL96	35	asCfscuga(Tgn)uuagagAfgCfgauag sasu	335	AUCUAUCGCUCUCUAAAUC AGGU	635
AD-287289.1	asuscgcuCfuCfUfAfaauc aggugaL96	36	usCfsaccu(Ggn)auuuagAfgAfgcgau sasg	336	CUAUCGCUCUCUAAAUCAG GUGA	636
AD-287290.1	uscsgcucUfcUfAfAfauc aggugaaL96	37	usUfscacc(Tgn)gauuuaGfaGfagcgas usa	337	UAUCGCUCUCUAAAUCAGG UGAA	637
AD-287293.1	uscsucuaAfaUfCfAfggu gaagaaaL96	38	usUfsucuu(Cgn)accugaUfuUfagaga sgsc	338	GCUCUCUAAAUCAGGUGAA GAAA	638
AD-287316.1	gsusggugAfaUfAfAfugc ugggacaL96	39	usGfsuccc(Agn)gcauuaUfuCfaccacs gsa	339	UCGUGGUGAAUAAUGCUG GGACA	639
AD-287320.1	gsasauaaUfgCfUfGfgga caguauaL96	40	usAfsuacu(Ggn)ucccagCfaUfuauuc sasc	340	GUGAAUAAUGCUGGGACA GUAUA	640
AD-287321.1	asasuaauGfcUfGfGfgaca guauauL96	41	asUfsauac(Tgn)gucccaGfcAfuuauus csa	341	UGAAUAAUGCUGGGACAG UAUAU	641
AD-287324.1	gsgsgacaGfuAfUfAfucc agccgauL96	42	asUfscggc(Tgn)ggauauAfcUfguccc sasg	342	CUGGGACAGUAUAUCCAGC CGAU	642
AD-287325.1	gsascaguAfuAfUfCfcag ccgaucuL96	43	asGfsaucg(Ggn)cuggauAfuAfcuguc scsc	343	GGGACAGUAUAUCCAGCCG AUCU	643

AD-287326.1	ascsaguaUfaUfCfCfagccgaucuuL96	44	asAfsgauc(Ggn)gcuggaUfaUfacugu scsc	344	GGACAGUAUAUCCAGCCGAUCUU	644
AD-287327.1	asgsuauaUfcCfAfGfccgaucuucuL96	45	asGfsaaga(Tgn)cggcugGfaUfauacus gsu	345	ACAGUAUAUCCAGCCGAUCUUCU	645
AD-287344.1	asuscuauCfgCfUfCfucuaaaucauL96	46	asUfsgauu(Tgn)agagagCfgAfuagau scsu	346	AGAUCUAUCGCUCUCUAAAUCAG	646
AD-287346.1	usasucgcUfcUfCfUfaaaucagguuL96	47	asAfsccug(Agn)uuuagaGfaGfcgaua sgsa	347	UCUAUCGCUCUCUAAAUCAGGUG	647
AD-287347.1	csgscucuCfuAfAfAfucaggugaauL96	48	asUfsucac(Cgn)ugauuuAfgAfgagcg sasu	348	AUCGCUCUCUAAAUCAGGUGAAG	648
AD-287366.1	csgsugguGfaAfUfAfaugcugggauL96	49	asUfsccca(Ggn)cauuauUfcAfccacgs asu	349	AUCGUGGUGAAUAAUGCUGGGAC	649
AD-287367.1	usgsgugaAfuAfAfUfgcugggacauL96	50	asUfsgucc(Cgn)agcauuAfuUfcaccas csg	350	CGUGGUGAAUAAUGCUGGGACAG	650
AD-287370.1	asusgcugGfgAfCfAfguauauccauL96	51	asUfsggau(Agn)uacuguCfcCfagcau susa	351	UAAUGCUGGGACAGUAUAUCCAG	651
AD-287371.1	usgscuggGfaCfAfGfuauauccaguL96	52	asCfsugga(Tgn)auacugUfcCfcagcas usu	352	AAUGCUGGGACAGUAUAUCCAGC	652
AD-287372.1	gscsugggAfcAfGfUfauauccagcuL96	53	asGfscugg(Agn)uauacuGfuCfccagc sasu	353	AUGCUGGGACAGUAUAUCCAGCC	653
AD-287373.1	csusgggaCfaGfUfAfuauccagccuL96	54	asGfsgcug(Ggn)auauacUfgUfcccag scsa	354	UGCUGGGACAGUAUAUCCAGCCG	654

AD-287374.1	gsgsacagUfaUfAfUfccagccgauuL96	55	asAfsucgg(Cgn)uggauaUfaCfuguccscsa	355	UGGGACAGUAUAUCCAGCCGAUC	655
AD-287375.1	csasguauAfuCfCfAfgccgaucuuuL96	56	asAfsagau(Cgn)ggcuggAfuAfuacugsusc	356	GACAGUAUAUCCAGCCGAUCUUC	656
AD-287391.1	cscsaaggAfuGfAfAfgagauuaccaL96	57	usGfsguaa(Tgn)cucuucAfuCfcuuggsusg	357	CACCAAGGAUGAAGAGAUUACCA	657
AD-287392.1	csasaggaUfgAfAfGfagauuaccaaL96	58	usUfsggua(Agn)ucucuuCfaUfccuugsgsu	358	ACCAAGGAUGAAGAGAUUACCAA	658
AD-287406.1	ususugagGfuCfAfAfcauccuaggaL96	59	usCfscuag(Ggn)auguugAfcCfucaaasusg	359	CAUUUGAGGUCAACAUCCUAGGA	659
AD-287407.1	usgsagguCfaAfCfAfuccuaggacaL96	60	usGfsuccu(Agn)ggauguUfgAfccucasasa	360	UUUGAGGUCAACAUCCUAGGACA	660
AD-287408.1	gsasggucAfaCfAfUfccuaggacauL96	61	asUfsgucc(Tgn)aggaugUfuGfaccucsasa	361	UUGAGGUCAACAUCCUAGGACAU	661
AD-287410.1	gsgsucaaCfaUfCfCfuaggacauuuL96	62	asAfsaugu(Cgn)cuaggaUfgUfugaccsusc	362	GAGGUCAACAUCCUAGGACAUUU	662
AD-287411.1	gsuscaacAfuCfCfUfaggacauuuuL96	63	asAfsaaug(Tgn)ccuaggAfuGfuugacscsu	363	AGGUCAACAUCCUAGGACAUUUU	663
AD-287413.1	ascsauccUfaGfGfAfcauuuuggaL96	64	usCfscaaa(Agn)auguccUfaGfgaugususg	364	CAACAUCCUAGGACAUUUUUGGA	664
AD-287414.1	csasuccuAfgGfAfCfauuuuggauL96	65	asUfsccaa(Agn)aaugucCfuAfggaugsusu	365	AACAUCCUAGGACAUUUUUGGAU	665

AD-287415.1	uscscuagGfaCfAfUfuuuggaucaL96	66	usGfsaucc(Agn)aaaaugUfcCfuaggasusg	366	CAUCCUAGGACAUUUUUGGAUCA	666
AD-287418.1	asgsgacaUfuUfUfUfggaucacaaaL96	67	usUfsugug(Agn)uccaaaAfaUfguccusasg	367	CUAGGACAUUUUUGGAUCACAAA	667
AD-287419.1	gsgsacauUfuUfUfGfgaucacaaaaL96	68	usUfsuugu(Ggn)auccaaAfaAfuguccsusa	368	UAGGACAUUUUUGGAUCACAAAA	668
AD-287421.1	ususuuugGfaUfCfAfcaaaagcacuL96	69	asGfsugcu(Tgn)uugugaUfcCfaaaaasusg	369	CAUUUUUGGAUCACAAAAGCACU	669
AD-287424.1	usgsgaucAfcAfAfAfagcacuucuuL96	70	asAfsgaag(Tgn)gcuuuuGfuGfauccasasa	370	UUUGGAUCACAAAAGCACUUCUU	670
AD-287427.1	csasaaagCfaCfUfUfcuuccaucgaL96	71	usCfsgaug(Ggn)aagaagUfgCfuuuugsusg	371	CACAAAAGCACUUCUUCCAUCGA	671
AD-287428.1	asasaagcAfcUfUfCfuuccaucgauL96	72	asUfscgau(Ggn)gaagaaGfuGfcuuuusgsu	372	ACAAAAGCACUUCUUCCAUCGAU	672
AD-287429.1	asasgcacUfuCfUfUfccaucgaugaL96	73	usCfsaucg(Agn)uggaagAfaGfugcuususu	373	AAAAGCACUUCUUCCAUCGAUGA	673
AD-287430.1	asgscacuUfcUfUfCfcaucgaugauL96	74	asUfscauc(Ggn)auggaaGfaAfgugcususu	374	AAAGCACUUCUUCCAUCGAUGAU	674
AD-287441.1	gsgsagagAfaAfUfCfauggccacauL96	75	asUfsgugg(Cgn)caugauUfuCfucuccsasu	375	AUGGAGAGAAAUCAUGGCCACAU	675
AD-287453.1	ascscaagGfaUfGfAfagagauuacuL96	76	asGfsuaau(Cgn)ucuucaUfcCfuuggusgsc	376	GCACCAAGGAUGAAGAGAUUACC	676

AD-287462.1	asgsacauUfuGfAfGfgucaacaucuL96	77	asGfsaugu(Tgn)gaccucAfaAfugucusg	377	CAAGACAUUUGAGGUCAACAUCC	677
AD-287463.1	csasuuugAfgGfUfCfaacauccuauL96	78	asUfsagga(Tgn)guugacCfuCfaaaugsusc	378	GACAUUUGAGGUCAACAUCCUAG	678
AD-287464.1	asusuugaGfgUfCfAfacauccuaguL96	79	asCfsuagg(Agn)uguugaCfcUfcaaausgsu	379	ACAUUUGAGGUCAACAUCCUAGG	679
AD-287465.1	ususgaggUfcAfAfCfauccuaggauL96	80	asUfsccua(Ggn)gauguuGfaCfcucaasasu	380	AUUUGAGGUCAACAUCCUAGGAC	680
AD-287466.1	csasacauCfcUfAfGfgacauuuuugL96	81	csAfsaaaa(Tgn)guccuaGfgAfuguugsasc	381	GUCAACAUCCUAGGACAUUUUUG	681
AD-287467.1	asascaucCfuAfGfGfacauuuuguL96	82	asCfsaaaa(Agn)uguccuAfgGfauguusgsa	382	UCAACAUCCUAGGACAUUUUUGG	682
AD-287468.1	asusccuaGfgAfCfAfuuuuuggauuL96	83	asAfsucca(Agn)aaauguCfcUfaggausgsu	383	ACAUCCUAGGACAUUUUUGGAUC	683
AD-287469.1	cscsuaggAfcAfUfUfuuuggaucauL96	84	asUfsgauc(Cgn)aaaaauGfuCfcuaggsasu	384	AUCCUAGGACAUUUUUGGAUCAC	684
AD-287470.1	gsascauuUfuUfGfGfaucacaaaauL96	85	asUfsuuug(Tgn)gauccaAfaAfaugucscsu	385	AGGACAUUUUUGGAUCACAAAAG	685
AD-287474.1	gsgsaucaCfaAfAfAfgcacuucuuuL96	86	asAfsagaa(Ggn)ugcuuuUfgUfgaucc sasa	386	UUGGAUCACAAAAGCACUUCUUC	686
AD-287476.1	csascaaaAfgCfAfCfuucuccauuL96	87	asAfsugga(Agn)gaagugCfuUfuugugsasu	387	AUCACAAAAGCACUUCUUCCAUC	687

AD-287477.1	ascsaaaaGfcAfCfUfucuuccaucuL96	88	asGfsaugg(Agn)agaaguGfcUfuuugusgsa	388	UCACAAAAGCACUUCUUCCAUCG	688
AD-287478.1	asasagcaCfuUfCfUfuccaucgauuL96	89	asAfsucga(Tgn)ggaagaAfgUfgcuuususg	389	CAAAAGCACUUCUUCCAUCGAUG	689
AD-287479.1	gscsacuuCfuUfCfCfaucgaugauuL96	90	asAfsucau(Cgn)gauggaAfgAfagugcsusu	390	AAGCACUUCUUCCAUCGAUGAUG	690
AD-287491.1	asgsaaauCfaUfGfGfccacaucguuL96	91	asAfscgau(Ggn)uggccaUfgAfuuucuscsu	391	AGAGAAAUCAUGGCCACAUCGUC	691
AD-287492.1	asasaucaUfgGfCfCfacaucgucauL96	92	asUfsgacg(Agn)uguggcCfaUfgauuuscsu	392	AGAAAUCAUGGCCACAUCGUCAC	692
AD-287517.1	ususccuuAfcCfUfCfaucccauauuL96	93	asAfsuaug(Ggn)gaugagGfuAfaggaasusc	393	GAUUCCUUACCUCAUCCCAUAUU	693
AD-287520.1	ascscucaUfcCfCfCfAfuauuguuccaL96	94	usGfsgaac(Agn)auauggGfaUfgaggusasa	394	UUACCUCAUCCCAUAUUGUUCCA	694
AD-287521.1	uscsauccCfaUfAfUfuguuccagcaL96	95	usGfscugg(Agn)acaauaUfgGfgaugasgsg	395	CCUCAUCCCAUAUUGUUCCAGCA	695
AD-287522.1	csasucccAfuAfUfUfguuccagcaaL96	96	usUfsgcug(Ggn)aacaauAfuGfggaugsasg	396	CUCAUCCCAUAUUGUUCCAGCAA	696
AD-287524.1	uscsccauAfuUfGfUfuccagcaaauL96	97	asUfsuugc(Tgn)ggaacaAfuAfugggasusg	397	CAUCCCAUAUUGUUCCAGCAAAU	697
AD-287525.1	cscscauaUfuGfUfUfccagcaaauuL96	98	asAfsuuug(Cgn)uggaacAfaUfauggsasu	398	AUCCCAUAUUGUUCCAGCAAAUU	698

AD-287537.1	usgsuuggCfuUfUfCfacagaggucuL96	99	asGfsaccu(Cgn)ugugaaAfgCfcaacasgsc	399	GCUGUUGGCUUUCACAGAGGUCU	699
AD-287539.1	gsgscuuuCfaCfAfGfaggucugacaL96	100	usGfsucag(Agn)ccucugUfgAfaagccsasa	400	UUGGCUUUCACAGAGGUCUGACA	700
AD-287540.1	gscsuuucAfcAfGfAfggucugacauL96	101	asUfsguca(Ggn)accucuGfuGfaaagcscsa	401	UGGCUUUCACAGAGGUCUGACAU	701
AD-287543.1	csascagaGfgUfCfUfgacaucagaaL96	102	usUfscuga(Tgn)gucagaCfcUfcugugsasa	402	UUCACAGAGGUCUGACAUCAGAA	702
AD-287546.1	asgsgucuGfaCfAfUfcagaacuucaL96	103	usGfsaagu(Tgn)cugaugUfcAfgaccuscsu	403	AGAGGUCUGACAUCAGAACUUCA	703
AD-287568.1	uscscuuaCfcUfCfAfucccauauuuL96	104	asAfsauau(Ggn)ggaugaGfgUfaaggasasu	404	AUUCCUUACCUCAUCCCAUAUUG	704
AD-287591.1	ususcacaGfaGfGfUfcugacaucauL96	105	asUfsgaug(Tgn)cagaccUfcUfgugaasasg	405	CUUUCACAGAGGUCUGACAUCAG	705
AD-287610.1	ususgggaAfaAfAfCfugguaucaaaL96	106	usUfsugau(Agn)ccaguuUfuUfcccaasgsg	406	CCUUGGGAAAAACUGGUAUCAAA	706
AD-287615.1	ascsugguAfuCfAfAfaaccucauguL96	107	asCfsauga(Ggn)guuuugAfuAfccagususu	407	AAACUGGUAUCAAAACCUCAUGU	707
AD-287616.1	usgsguauCfaAfAfAfccucaugucuL96	108	asGfsacau(Ggn)agguuuUfgAfuaccasgsu	408	ACUGGUAUCAAAACCUCAUGUCU	708
AD-287627.1	csuscugcCfcAfGfUfuuuugugaauL96	109	asUfsucac(Agn)aaaacuGfgGfcagagsasc	409	GUCUCUGCCCAGUUUUUGUGAAU	709

AD-287632.1	ususuuugUfgAfAfUfacuggguucaL96	110	usGfsaacc(Cgn)aguauuCfaCfaaaaascsu	410	AGUUUUUGUGAAUACUGGGUUCA	710
AD-287633.1	ususgugaAfuAfCfUfggguucaccaL96	111	usGfsguga(Agn)cccaguAfuUfcacaasasa	411	UUUUGUGAAUACUGGGUUCACCA	711
AD-287634.1	usgsugaaUfaCfUfGfgguucaccaaL96	112	usUfsggug(Agn)acccagUfaUfucacasasa	412	UUUGUGAAUACUGGGUUCACCAA	712
AD-287636.1	usgsaauaCfuGfGfGfuuccaccaaaaL96	113	usUfsuugg(Tgn)gaacccAfgUfauucascsa	413	UGUGAAUACUGGGUUCACCAAAA	713
AD-287637.1	gsasauacUfgGfGfUfucaccaaaaaL96	114	usUfsuuug(Ggn)ugaaccCfaGfuauucsasc	414	GUGAAUACUGGGUUCACCAAAAA	714
AD-287638.1	asasuacuGfgGfUfUfcaccaaaaauL96	115	asUfsuuuu(Ggn)gugaacCfcAfguauuscsa	415	UGAAUACUGGGUUCACCAAAAAU	715
AD-287647.1	asasaaauCfcAfAfGfcacaagauuaL96	116	usAfsaucu(Tgn)gugcuuGfgAfuuuuusgsg	416	CCAAAAAUCCAAGCACAAGAUUA	716
AD-287648.1	asasaaucCfaAfGfCfacaagauuauL96	117	asUfsaauc(Tgn)ugugcuUfgGfauuuususg	417	CAAAAAUCCAAGCACAAGAUUAU	717
AD-287651.1	asgscacaAfgAfUfUfauggccuguaL96	118	usAfscagg(Cgn)cauaauCfuUfgugcususg	418	CAAGCACAAGAUUAUGGCCUGUA	718
AD-287652.1	gscsacaaGfaUfUfAfuggccuguauL96	119	asUfsacag(Ggn)ccauaaUfcUfugugcsusu	419	AAGCACAAGAUUAUGGCCUGUAU	719
AD-287653.1	csascaagAfuUfAfUfggccuguauuL96	120	asAfsuaca(Ggn)gccauaAfuCfuugugscsu	420	AGCACAAGAUUAUGGCCUGUAUU	720

AD-287654.1	asasgauuAfuGfGfCfcuguauuggaL96	121	usCfscaau(Agn)caggccAfuAfaucuusgsu	421	ACAAGAUUAUGGCCUGUAUUGGA	721
AD-287655.1	gsasuuauGfgCfCfUfguauuggagaL96	122	usCfsucca(Agn)uacaggCfcAfuaaucsusu	422	AAGAUUAUGGCCUGUAUUGGAGA	722
AD-287656.1	ususauggCfcUfGfUfauuggagacaL96	123	usGfsucuc(Cgn)aauacaGfgCfcauaasusc	423	GAUUAUGGCCUGUAUUGGAGACA	723
AD-287658.1	usgsgccuGfuAfUfUfggagacagauL96	124	asUfscugu(Cgn)uccaauAfcAfggccasusa	424	UAUGGCCUGUAUUGGAGACAGAU	724
AD-287659.1	gscscuguAfuUfGfGfagacagaugaL96	125	usCfsaucu(Ggn)ucuccaAfuAfcaggcscsa	425	UGGCCUGUAUUGGAGACAGAUGA	725
AD-287679.1	csusgguaUfcAfAfAfaccucauguuL96	126	asAfscaug(Agn)gguuuuGfaUfaccagsusu	426	AACUGGUAUCAAAACCUCAUGUC	726
AD-287680.1	gsgsuaucAfaAfAfCfcucaugucuuL96	127	asAfsgaca(Tgn)gagguuUfuGfauaccsasg	427	CUGGUAUCAAAACCUCAUGUCUC	727
AD-287683.1	uscsaaaaCfcUfCfAfugucucugcuL96	128	asGfscaga(Ggn)acaugaGfgUfuuugasusa	428	UAUCAAAACCUCAUGUCUCUGCC	728
AD-287690.1	cscscaguUfuUfUfGfugaauacuguL96	129	asCfsagua(Tgn)ucacaaAfaAfcugggscsa	429	UGCCCAGUUUUUGUGAAUACUGG	729
AD-287693.1	ususuuguGfaAfUfAfcuggguucauL96	130	asUfsgaac(Cgn)caguauUfcAfcaaaasasc	430	GUUUUUGUGAAUACUGGGUUCAC	730
AD-287694.1	ususugugAfaUfAfCfuggguucacuL96	131	asGfsugaa(Cgn)ccaguaUfuCfacaaasasa	431	UUUUUGUGAAUACUGGGUUCACC	731

AD-287695.1	asusacugGfgUfUfCfaccaaaaauuL96	132	asAfsuuuu(Tgn)ggugaaCfcCfaguausc	432	GAAUACUGGGUUCACCAAAAAUC	732
AD-287696.1	usascuggGfuUfCfAfccaaaaaucuL96	133	asGfsauuu(Tgn)uggugaAfcCfcaguasusu	433	AAUACUGGGUUCACCAAAAAUCC	733
AD-287700.1	csasccaaAfaAfUfCfcaagcacaauL96	134	asUfsugug(Cgn)uuggauUfuUfuggugsasa	434	UUCACCAAAAAUCCAAGCACAAG	734
AD-287701.1	asasauccAfaGfCfAfcaagauuauuL96	135	asAfsuaau(Cgn)uugugcUfuGfgauuususu	435	AAAAAUCCAAGCACAAGAUUAUG	735
AD-287702.1	asasuccaAfgCfAfCfaagauuauguL96	136	asCfsauaa(Tgn)cuugugCfuUfggauususu	436	AAAAUCCAAGCACAAGAUUAUGG	736
AD-287703.1	asusccaaGfcAfCfAfagauuaugguL96	137	asCfscaua(Agn)ucuuguGfcUfuggaususu	437	AAAUCCAAGCACAAGAUUAUGGC	737
AD-287704.1	uscscaagCfaCfAfAfgauuauggcuL96	138	asGfsccau(Agn)aucuugUfgCfuuggasusu	438	AAUCCAAGCACAAGAUUAUGGCC	738
AD-287706.1	ascsaagaUfuAfUfGfgccuguauuuL96	139	asAfsauac(Agn)ggccauAfaUfcuugusgsc	439	GCACAAGAUUAUGGCCUGUAUUG	739
AD-287707.1	csasagauUfaUfGfGfccuguauuguL96	140	asCfsaaua(Cgn)aggccaUfaAfucuugsusg	440	CACAAGAUUAUGGCCUGUAUUGG	740
AD-287709.1	asusuaugGfcCfUfGfuauuggagauL96	141	asUfscucc(Agn)auacagGfcCfauaauscsu	441	AGAUUAUGGCCUGUAUUGGAGAC	741
AD-287711.1	gsgsccugUfaUfUfGfgagacagauuL96	142	asAfsucug(Tgn)cuccaaUfaCfaggccsasu	442	AUGGCCUGUAUUGGAGACAGAUG	742

AD-287724.1	gsusaagaAfgUfCfUfgauagauggaL96	143	usCfscauc(Tgn)aucagaCfuUfcuuacsgsa	443	UCGUAAGAAGUCUGAUAGAUGGA	743
AD-287725.1	usasagaaGfuCfUfGfauagauggaaL96	144	usUfsccau(Cgn)uaucagAfcUfucuuascsg	444	CGUAAGAAGUCUGAUAGAUGGAA	744
AD-287726.1	asasgaagUfcUfGfAfuagauggaauL96	145	asUfsucca(Tgn)cuaucaGfaCfuucuusasc	445	GUAAGAAGUCUGAUAGAUGGAAU	745
AD-287727.1	asgsaaguCfuGfAfUfagauggaauaL96	146	usAfsuucc(Agn)ucuaucAfgAfcuucususa	446	UAAGAAGUCUGAUAGAUGGAAUA	746
AD-287728.1	asasgucuGfaUfAfGfauggaauacuL96	147	asGfsuauu(Cgn)caucuaUfcAfgacuuscsu	447	AGAAGUCUGAUAGAUGGAAUACU	747
AD-287735.1	asgsauggAfaUfAfCfuuaccaauaaL96	148	usUfsauug(Ggn)uaaguaUfuCfcaucusasu	448	AUAGAUGGAAUACUUACCAAUAA	748
AD-287736.1	asusggaaUfaCfUfUfaccaauaagaL96	149	usCfsuuau(Tgn)gguaagUfaUfuccauscsu	449	AGAUGGAAUACUUACCAAUAAGA	749
AD-287737.1	usgsgaauAfcUfUfAfccaauaagaaL96	150	usUfscuua(Tgn)ugguaaGfuAfuuccasusc	450	GAUGGAAUACUUACCAAUAAGAA	750
AD-287738.1	gsgsaauaCfuUfAfCfcaauaagaaaL96	151	usUfsucuu(Agn)uugguaAfgUfauuccsasu	451	AUGGAAUACUUACCAAUAAGAAA	751
AD-287739.1	gsasauacUfuAfCfCfaauaagaaaaL96	152	usUfsuucu(Tgn)auugguAfaGfuauucscsa	452	UGGAAUACUUACCAAUAAGAAAA	752
AD-287740.1	asasuacuUfaCfCfAfauaagaaaauL96	153	asUfsuuuc(Tgn)uauuggUfaAfguauuscsc	453	GGAAUACUUACCAAUAAGAAAAU	753

AD-287778.1	ususucuuCfcUfGfAfacgcgccucaL96	154	usGfsaggc(Ggn)cguucaGfgAfagaaascsu	454	AGUUUCUUCCUGAACGCGCCUCA	754
AD-287793.1	gsasuuuuAfaAfUfCfguaugcagaaL96	155	usUfscugc(Agn)uacgauUfuAfaaaucsgsc	455	GCGAUUUUAAAUCGUAUGCAGAA	755
AD-287795.1	ususuuaaAfuCfGfUfaugcagaauaL96	156	usAfsuucu(Ggn)cauacgAfuUfuaaaasusc	456	GAUUUUAAAUCGUAUGCAGAAUA	756
AD-287798.1	asasaucgUfaUfGfCfagaauauucaL96	157	usGfsaaua(Tgn)ucugcaUfaCfgauuusasa	457	UUAAAUCGUAUGCAGAAUAUUCA	757
AD-287800.1	asuscguaUfgCfAfGfaauauucaauL96	158	asUfsugaa(Tgn)auucugCfaUfacgaususu	458	AAAUCGUAUGCAGAAUAUUCAAU	758
AD-287801.1	uscsguauGfcAfGfAfauauucaauuL96	159	asAfsuuga(Agn)uauucuGfcAfuacgasusu	459	AAUCGUAUGCAGAAUAUUCAAUU	759
AD-287802.1	csgsuaugCfaGfAfAfuaucaauuuL96	160	asAfsauug(Agn)auauucUfgCfauacgsasu	460	AUCGUAUGCAGAAUAUUCAAUUU	760
AD-287804.1	asusgcagAfaUfAfUfucaauuugaaL96	161	usUfscaaa(Tgn)ugaauaUfuCfugcausasc	461	GUAUGCAGAAUAUUCAAUUUGAA	761
AD-287810.1	gsasagucUfgAfUfAfgauggaauauL96	162	asUfsauuc(Cgn)aucuauCfaGfacuucsusu	462	AAGAAGUCUGAUAGAUGGAAUAC	762
AD-287811.1	uscsugauAfgAfUfGfgaauacuuauL96	163	asUfsaagu(Agn)uuccauCfuAfucagascsu	463	AGUCUGAUAGAUGGAAUACUUAC	763
AD-287813.1	gsasuggaAfuAfCfUfuaccaauaauL96	164	asUfsuauu(Ggn)guaaguAfuUfccaucsusa	464	UAGAUGGAAUACUUACCAAUAAG	764

AD-287837.1	ascsagaaGfuUfUfCfuuccugaacuL96	165	asGfsuuca(Ggn)gaagaaAfcUfucugusasg	465	CUACAGAAGUUUCUUCCUGAACG	765
AD-287839.1	asgsaaguUfuCfUfUfccugaacgcuL96	166	asGfscguu(Cgn)aggaagAfaAfcuucusgsu	466	ACAGAAGUUUCUUCCUGAACGCG	766
AD-287841.1	asasguuuCfuUfCfCfugaacgcgcuL96	167	asGfscgcg(Tgn)ucaggaAfgAfaacuuscsu	467	AGAAGUUUCUUCCUGAACGCGCC	767
AD-287842.1	gsusuucuUfcCfUfGfaacgcgccuuL96	168	asAfsggcg(Cgn)guucagGfaAfgaaacsusu	468	AAGUUUCUUCCUGAACGCGCCUC	768
AD-287844.1	uscsuuccUfgAfAfCfgccgccucaguL96	169	asCfsugag(Ggn)cgcguuCfaGfgaagasasa	469	UUUCUUCCUGAACGCGCCUCAGC	769
AD-287854.1	gscsagaaUfaUfUfCfaauuugaaguL96	170	asCfsuuca(Agn)auugaaUfaUfucugcsasu	470	AUGCAGAAUAUUCAAUUUGAAGC	770
AD-287856.1	asasuauuCfaAfUfUfugaagcaguuL96	171	asAfscugc(Tgn)ucaaauUfgAfauauuscsu	471	AGAAUAUUCAAUUUGAAGCAGUG	771
AD-287857.1	usasuucaAfuUfUfGfaagcagugguL96	172	asCfscacu(Ggn)cuucaaAfuUfgaauasusu	472	AAUAUUCAAUUUGAAGCAGUGGU	772
AD-287893.1	gsasuguaUfgCfAfUfgauaaugauaL96	173	usAfsucau(Tgn)aucaugCfaUfacaucsusc	473	GAGAUGUAUGCAUGAUAAUGAUA	773
AD-287917.1	csasaugcUfgCfAfAfagcuuuauuuL96	174	asAfsauaa(Agn)gcuuugCfaGfcauugsasu	474	AUCAAUGCUGCAAAGCUUUAUUU	774
AD-287924.1	asasagcuUfuAfUfUfucacauuuuuL96	175	asAfsaaau(Ggn)ugaaauAfaAfgcuuusgsc	475	GCAAAGCUUUAUUUCACAUUUUU	775

AD-287934.1	asasuuugAfaGfCfAfgugguuggcuL96	176	asGfsccaa(Cgn)cacugcUfuCfaaauusgsa	476	UCAAUUUGAAGCAGUGGUUGGCC	776
AD-287969.1	asasugcuGfcAfAfAfgcuuuauuucL96	177	gsAfsaaua(Agn)agcuuuGfcAfgcauusgsa	477	UCAAUGCUGCAAAGCUUUAUUUC	777
AD-287970.1	usgscugcAfaAfGfCfuuuauuucauL96	178	asUfsgaaa(Tgn)aaagcuUfuGfcagcasusu	478	AAUGCUGCAAAGCUUUAUUUCAC	778
AD-287982.1	asasaaacAfuUfGfGfuuuggcacuaL96	179	usAfsgugc(Cgn)aaaccaAfuGfuuuuusasa	479	UUAAAAACAUUGGUUUGGCACUA	779
AD-288005.1	asgsauuaAfuUfAfCfcugucuuccuL96	180	asGfsgaag(Agn)cagguaAfuUfaaucususg	480	CAAGAUUAAUUACCUGUCUUCCU	780
AD-288006.1	asusuaauUfaCfCfUfgucuuccuguL96	181	asCfsagga(Agn)gacaggUfaAfuuaauscsu	481	AGAUUAAUUACCUGUCUUCCUGU	781
AD-288008.1	usasauuaCfcUfGfUfcuuccuguuuL96	182	asAfsacag(Ggn)aagacaGfgUfaauuasasu	482	AUUAAUUACCUGUCUUCCUGUUU	782
AD-288010.1	usasccugUfcUfUfCfcuguuucucaL96	183	usGfsagaa(Agn)caggaaGfaCfagguasasu	483	AUUACCUGUCUUCCUGUUUCUCA	783
AD-288011.1	ascscuguCfuUfCfCfuguuucucaaL96	184	usUfsgaga(Agn)acaggaAfgAfcaggusasa	484	UUACCUGUCUUCCUGUUUCUCAA	784
AD-288015.1	uscsuuccUfgUfUfUfcucaagaauaL96	185	usAfsuucu(Tgn)gagaaaCfaGfgaagascsa	485	UGUCUUCCUGUUUCUCAAGAAUA	785
AD-288046.1	ususuuccUfuUfCfAfugccucuuaaL96	186	usUfsaaga(Ggn)gcaugaAfaGfgaaaasasc	486	GUUUUUCCUUUCAUGCCUCUUAA	786

AD-288049.1	uscscuuuCfaUfGfCfcuc uuaaaaaL96	187	usUfsuuua(Agn)gaggcaUfgAfaagga sasa	487	UUUCCUUUCAUGCCUCUUA AAAA	787
AD-288050.1	csusuucaUfgCfCfUfcuu aaaaacuL96	188	asGfsuuuu(Tgn)aagaggCfaUfgaaag sgsa	488	UCCUUUCAUGCCUCUUAAA AACU	788
AD-288076.1	asasaacaUfuGfGfUfuug gcacuauL96	189	asUfsagug(Cgn)caaaccAfaUfguuuu susa	489	UAAAAACAUUGGUUUGGC ACUAG	789
AD-288092.1	gsasuuaaUfuAfCfCfugu cuuccuuL96	190	asAfsggaa(Ggn)acagguAfaUfuaauc susu	490	AAGAUUAAUUACCUGUCU UCCUG	790
AD-288094.1	ususaccuGfuCfUfUfccu guuucuuL96	191	asAfsgaaa(Cgn)aggaagAfcAfgguaa susu	491	AAUUACCUGUCUUCCUGUU UCUC	791
AD-288095.1	cscsugucUfuCfCfUfguu ucucaauL96	192	asUfsugag(Agn)aacaggAfaGfacagg susa	492	UACCUGUCUUCCUGUUUCU CAAG	792
AD-288108.1	gsgsucugUfuUfUfUfccu uucauguL96	193	asCfsauga(Agn)aggaaaAfaCfagaccs usa	493	UAGGUCUGUUUUUCCUUUC AUGC	793
AD-288109.1	gsuscuguUfuUfUfCfcuu ucaugcuL96	194	asGfscaug(Agn)aaggaaAfaAfcagacs csu	494	AGGUCUGUUUUUCCUUUCA UGCC	794
AD-288173.1	ususauuuAfcAfCfAfggg aagguuuL96	195	asAfsaccu(Tgn)cccuguGfuAfaauaas gsu	495	ACUUAUUUACACAGGGAA GGUUU	795
AD-288174.1	usasuuuaCfaCfAfGfgga agguuuaL96	196	usAfsaacc(Tgn)ucccugUfgUfaaauas asg	496	CUUAUUUACACAGGGAAG GUUUA	796
AD-288176.1	ususacacAfgGfGfAfagg uuuaagaL96	197	usCfsuuaa(Agn)ccuuccCfuGfuguaa sasu	497	AUUUACACAGGGAAGGUU UAAGA	797

AD-288177.1	ascsacagGfgAfAfGfguuaagacuL96	198	asGfsucuu(Agn)aaccuuCfcCfugugusasa	498	UUACACAGGGAAGGUUUAAGACU	798
AD-288180.1	gsgsgaagGfuUfUfAfagacuguucaL96	199	usGfsaaca(Ggn)ucuuaaAfcCfuucccsusg	499	CAGGGAAGGUUUAAGACUGUUCA	799
AD-288181.1	gsgsaaggUfuUfAfAfgacuguucaaL96	200	usUfsgaac(Agn)gucuuaAfaCfcuuccscsu	500	AGGGAAGGUUUAAGACUGUUCAA	800
AD-288183.1	asgsguuuAfaGfAfCfugucaaguaL96	201	usAfscuug(Agn)acagucUfuAfaaccususc	501	GAAGGUUUAAGACUGUUCAAGUA	801
AD-288184.1	ususuaagAfcUfGfUfucaaguagcaL96	202	usGfscuac(Tgn)ugaacaGfuCfuuaaascsc	502	GGUUUAAGACUGUUCAAGUAGCA	802
AD-288186.1	usasagacUfgUfUfCfaaguagcauuL96	203	asAfsugcu(Agn)cuugaaCfaGfucuuasasa	503	UUUAAGACUGUUCAAGUAGCAUU	803
AD-288187.1	gsascuguUfcAfAfGfuagcauuccaL96	204	usGfsgaau(Ggn)cuacuuGfaAfcagucsusu	504	AAGACUGUUCAAGUAGCAUUCCA	804
AD-288188.1	ascsuguuCfaAfGfUfagcauuccaaL96	205	usUfsggaa(Tgn)gcuacuUfgAfacaguscsu	505	AGACUGUUCAAGUAGCAUUCCAA	805
AD-288189.1	csusguucAfaGfUfAfgcauuccaauL96	206	asUfsugga(Agn)ugcuacUfuGfaacagsusc	506	GACUGUUCAAGUAGCAUUCCAAU	806
AD-288190.1	gsusucaaGfuAfGfCfauuccaaucuL96	207	asGfsauug(Ggn)aaugcuAfcUfugaacsasg	507	CUGUUCAAGUAGCAUUCCAAUCU	807
AD-288192.1	csasaguaGfcAfUfUfccaaucuguaL96	208	usAfscaga(Tgn)uggaauGfcUfacuugsasa	508	UUCAAGUAGCAUUCCAAUCUGUA	808

AD-288193.1	usasgcauUfcCfAfAfucuguagccaL96	209	usGfsgcua(Cgn)agauugGfaAfugcuascsu	509	AGUAGCAUUCCAAUCUGUAGCCA	809
AD-288194.1	asgscauuCfcAfAfUfcuguagccauL96	210	asUfsggcu(Agn)cagauuGfgAfaugcusasc	510	GUAGCAUUCCAAUCUGUAGCCAU	810
AD-288227.1	asascuuaUfuUfAfCfacaggaaguL96	211	asCfsuucc(Cgn)uguguaAfaUfaaguuscsu	511	AGAACUUAUUUACACAGGGAAGG	811
AD-288229.1	usascacaGfgGfAfAfgguuuaagauL96	212	asUfscuua(Agn)accuucCfcUfguguasasa	512	UUUACACAGGGAAGGUUUAAGAC	812
AD-288230.1	csascaggGfaAfGfGfuuuaagacuuL96	213	asAfsgucu(Tgn)aaaccuUfcCfcugugsusa	513	UACACAGGGAAGGUUUAAGACUG	813
AD-288231.1	asgsggaaGfgUfUfUfaagacuguuuL96	214	asAfsacag(Tgn)cuuaaaCfcUfucccusgsu	514	ACAGGGAAGGUUUAAGACUGUUC	814
AD-288232.1	gsasagguUfuAfAfGfacuguucaauL96	215	asUfsugaa(Cgn)agucuuAfaAfccuucscsc	515	GGGAAGGUUUAAGACUGUUCAAG	815
AD-288233.1	gsgsuuuaAfgAfCfUfguucaaguauL96	216	asUfsacuu(Ggn)aacaguCfuUfaaaccsusu	516	AAGGUUUAAGACUGUUCAAGUAG	816
AD-288235.1	asasgacuGfuUfCfAfaguagcauuuL96	217	asAfsaugc(Tgn)acuugaAfcAfgucuusasa	517	UUAAGACUGUUCAAGUAGCAUUC	817
AD-288236.1	asgsacugUfuCfAfAfguagcauucuL96	218	asGfsaaug(Cgn)uacuugAfaCfagucususa	518	UAAGACUGUUCAAGUAGCAUUCC	818
AD-288237.1	usgsuucaAfgUfAfGfcauuccaauuL96	219	asAfsuugg(Agn)augcuaCfuUfgaacasgsu	519	ACUGUUCAAGUAGCAUUCCAAUC	819

AD-288238.1	ususcaagUfaGfCfAfuuccaaucuuL96	220	asAfsgauu(Ggn)gaaugcUfaCfuugaascsa	520	UGUUCAAGUAGCAUUCCAAUCUG	820
AD-288290.1	gscsagcuUfuAfUfCfucaaccuggaL96	221	usCfscagg(Tgn)ugagauAfaAfgcugcscsu	521	AGGCAGCUUUAUCUCAACCUGGA	821
AD-288316.1	asgscauuUfgAfAfAfgauuucccuaL96	222	usAfsggga(Agn)aucuuuCfaAfaugcusgsa	522	UCAGCAUUUGAAAGAUUUCCCUA	822
AD-288318.1	usgsaaagAfuUfUfCfccuagccucuL96	223	asGfsaggc(Tgn)agggaaAfuCfuuucasasa	523	UUUGAAAGAUUUCCCUAGCCUCU	823
AD-288319.1	gsasaagaUfuUfCfCfcuagccucuuL96	224	asAfsgagg(Cgn)uagggaAfaUfcuuucsasa	524	UUGAAAGAUUUCCCUAGCCUCUU	824
AD-288324.1	ususcccuAfgCfCfUfcuuccuuuuuL96	225	asAfsaaag(Ggn)aagaggCfuAfgggaasasu	525	AUUUCCCUAGCCUCUUCCUUUUU	825
AD-288337.1	asasgaacAfcAfGfAfaugagugcauL96	226	asUfsgcac(Tgn)cauucuGfuGfuucuusgsu	526	ACAAGAACACAGAAUGAGUGCAC	826
AD-288338.1	gsasacacAfgAfAfUfgagugcacauL96	227	asUfsgugc(Agn)cucauuCfuGfuguucsusu	527	AAGAACACAGAAUGAGUGCACAG	827
AD-288339.1	asascacaGfaAfUfGfagugcacaguL96	228	asCfsugug(Cgn)acucauUfcUfguguuscsu	528	AGAACACAGAAUGAGUGCACAGC	828
AD-288340.1	csasgaauGfaGfUfGfcacagcuaauL96	229	asUfsuagc(Tgn)gugcacUfcAfuucugsusg	529	CACAGAAUGAGUGCACAGCUAAG	829
AD-288341.1	gsasaugaGfuGfCfAfcagcuaagauL96	230	asUfscuua(Ggn)cugugcAfcUfcauucsusg	530	CAGAAUGAGUGCACAGCUAAGAG	830

AD-288366.1	ususcagcAfuUfUfGfaaagauuucuL96	231	asGfsaaau(Cgn)uuucaaAfuGfcugaasusc	531	GAUUCAGCAUUUGAAAGAUUUCC	831
AD-288369.1	csasuuugAfaAfGfAfuuucccuaguL96	232	asCfsuagg(Ggn)aaaucuUfuCfaaaugscsu	532	AGCAUUUGAAAGAUUUCCCUAGC	832
AD-288370.1	asusuugaAfaGfAfUfuuccuagcuL96	233	asGfscuag(Ggn)gaaaucUfuUfcaaausgsc	533	GCAUUUGAAAGAUUUCCCUAGCC	833
AD-288391.1	asasaacgGfuGfCfAfacucuauucuL96	234	asGfsaaua(Ggn)aguugcAfcCfguuuusgsg	534	CCAAAACGGUGCAACUCUAUUCU	834
AD-288393.1	gsgsugcaAfcUfCfUfauucuggacuL96	235	asGfsucca(Ggn)aauagaGfuUfgcaccsgsu	535	ACGGUGCAACUCUAUUCUGGACU	835
AD-288394.1	gsusgcaaCfuCfUfAfuucuggacuuL96	236	asAfsgucc(Agn)gaauagAfgUfugcacscsg	536	CGGUGCAACUCUAUUCUGGACUU	836
AD-288395.1	usgscaacUfcUfAfUfucuggacuuuL96	237	asAfsaguc(Cgn)agaauaGfaGfuugcascsc	537	GGUGCAACUCUAUUCUGGACUUU	837
AD-288396.1	gscsaacuCfuAfUfUfcuggacuuuaL96	238	usAfsaagu(Cgn)cagaauAfgAfguugcsasc	538	GUGCAACUCUAUUCUGGACUUUA	838
AD-288397.1	csasacucUfaUfUfCfuggacuuuauL96	239	asUfsaaag(Tgn)ccagaaUfaGfaguugscsa	539	UGCAACUCUAUUCUGGACUUUAU	839
AD-288398.1	asascucuAfuUfCfUfggacuuuauuL96	240	asAfsuaaa(Ggn)uccagaAfuAfgaguusgsc	540	GCAACUCUAUUCUGGACUUUAUU	840
AD-288402.1	asusucugGfaCfUfUfuauuacuugaL96	241	usCfsaagu(Agn)auaaagUfcCfagaausasg	541	CUAUUCUGGACUUUAUUACUUGA	841

AD-288427.1	asgsuccaCfcAfAfAfaguggacccuL96	242	asGfsgguc(Cgn)acuuuuGfgUfggacususc	542	GAAGUCCACCAAAAGUGGACCCU	842
AD-288430.1	csasccaaAfaGfUfGfgaccucuauL96	243	asUfsagag(Ggn)guccacUfuUfuggugsgsa	543	UCCACCAAAAGUGGACCCUCUAU	843
AD-288431.1	ascscaaaAfgUfGfGfacccucuauaL96	244	usAfsuaga(Ggn)gguccaCfuUfuuggusgsg	544	CCACCAAAAGUGGACCCUCUAUA	844
AD-288432.1	cscsaaaaGfuGfGfAfcccucuauauL96	245	asUfsauag(Agn)ggguccAfcUfuuuggsusg	545	CACCAAAAGUGGACCCUCUAUAU	845
AD-288433.1	csasaaagUfgGfAfCfccucuauauuL96	246	asAfsuaua(Ggn)agggucCfaCfuuuugsgsu	546	ACCAAAAGUGGACCCUCUAUAUU	846
AD-288434.1	asasaaguGfgAfCfCfcucuauauuuL96	247	asAfsauau(Agn)gaggguCfcAfcuuuusgsg	547	CCAAAAGUGGACCCUCUAUAUUU	847
AD-288466.1	asasacggUfgCfAfAfcucuauucuuL96	248	asAfsgaau(Agn)gaguugCfaCfcguuususg	548	CAAAACGGUGCAACUCUAUUCUG	848
AD-288467.1	asascgguGfcAfAfCfucuauucuguL96	249	asCfsagaa(Tgn)agaguuGfcAfccguususu	549	AAAACGGUGCAACUCUAUUCUGG	849
AD-288470.1	usasuucuGfgAfCfUfuuauuacuuuL96	250	asAfsagua(Agn)uaaaguCfcAfgaauasgsa	550	UCUAUUCUGGACUUUAUUACUUG	850
AD-288491.1	asasagugGfaCfCfCfucuauauuucL96	251	gsAfsaaua(Tgn)agagggUfcCfacuuususg	551	CAAAAGUGGACCCUCUAUAUUUC	851
AD-288492.1	asasguggAfcCfCfUfcuauauuucuL96	252	asGfsaaau(Agn)uagaggGfuCfcacuususu	552	AAAAGUGGACCCUCUAUAUUUCC	852

AD-288561.1	asusguuuAfgAfCfAfauuuaggcuL96	253	asGfsccua(Agn)aauuguCfuAfaacauscsu	553	AGAUGUUUAGACAAUUUUAGGCU	853
AD-288562.1	gsusuuagAfcAfAfUfuuuaggcucaL96	254	usGfsagcc(Tgn)aaaauuGfuCfuaaacsasu	554	AUGUUUAGACAAUUUUAGGCUCA	854
AD-288563.1	ususuagaCfaAfUfUfuuaggcucaaL96	255	usUfsgagc(Cgn)uaaaauUfgUfcuaaascsa	555	UGUUUAGACAAUUUUAGGCUCAA	855
AD-288564.1	ususagacAfaUfUfUfuaggcucaaaL96	256	usUfsugag(Cgn)cuaaaaUfuGfucuaasasc	556	GUUUAGACAAUUUUAGGCUCAAA	856
AD-288565.1	usasgacaAfuUfUfUfaggcucaaaaL96	257	usUfsuuga(Ggn)ccuaaaAfuUfgucuasasa	557	UUUAGACAAUUUUAGGCUCAAAA	857
AD-288566.1	asgsacaaUfuUfUfAfggcucaaaaaL96	258	usUfsuuug(Agn)gccuaaAfaUfugucusasa	558	UUAGACAAUUUUAGGCUCAAAAA	858
AD-288567.1	gsascaauUfuUfAfGfgcucaaaaauL96	259	asUfsuuuu(Ggn)agccuaAfaAfuugucsusa	559	UAGACAAUUUUAGGCUCAAAAAU	859
AD-288572.1	ususaggcUfcAfAfAfaauuaaagcuL96	260	asGfscuuu(Agn)auuuuuGfaGfccuaasasa	560	UUUUAGGCUCAAAAAUUAAAGCU	860
AD-288573.1	usasggcuCfaAfAfAfauuaaagcuaL96	261	usAfsgcuu(Tgn)aauuuuUfgAfgccuasasa	561	UUUAGGCUCAAAAAUUAAAGCUA	861
AD-288574.1	asgsgcucAfaAfAfAfuuaaagcuaaL96	262	usUfsagcu(Tgn)uaauuuUfuGfagccusasa	562	UUAGGCUCAAAAAUUAAAGCUAA	862
AD-288575.1	gscsucaaAfaAfUfUfaaagcuaacaL96	263	usGfsuuag(Cgn)uuuaauUfuUfugagcscsu	563	AGGCUCAAAAAUUAAAGCUAACA	863

AD-288576.1	uscsaaaaAfuUfAfAfagcuaacacaL96	264	usGfsuguu(Agn)gcuuuaAfuUfuuugasgsc	564	GCUCAAAAAUUAAAGCUAACACA	864
AD-288613.1	ususcauaUfaUfCfCfuuggucccauL96	265	asUfsggga(Cgn)caaggaUfaUfaugaasasg	565	CUUUCAUAUAUCCUUGGUCCCAG	865
AD-288620.1	gsasuguuUfaGfAfCfaauuuuagguL96	266	asCfscuaa(Agn)auugucUfaAfacaucsusc	566	GAGAUGUUUAGACAAUUUUAGGC	866
AD-288624.1	gsgscucaAfaAfAfUfuaaagcuaauL96	267	asUfsuagc(Tgn)uuaauuUfuUfgagccsusa	567	UAGGCUCAAAAAUUAAAGCUAAC	867
AD-288625.1	csuscaaaAfaUfUfAfaagcuaacauL96	268	asUfsguua(Ggn)cuuuaaUfuUfuugagscsc	568	GGCUCAAAAAUUAAAGCUAACAC	868
AD-288626.1	csasaaaaUfuAfAfAfgcuaacacauL96	269	asUfsgugu(Tgn)agcuuuAfaUfuuuugsasg	569	CUCAAAAAUUAAAGCUAACACAG	869
AD-288628.1	asasauuaAfaGfCfUfaacacaggaaL96	270	usUfsccug(Tgn)guuagcUfuUfaauuususu	570	AAAAAUUAAAGCUAACACAGGAA	870
AD-288634.1	usasacacAfgGfAfAfaaggaacuguL96	271	asCfsaguu(Cgn)cuuuucCfuGfuguuasgsc	571	GCUAACACAGGAAAAGGAACUGU	871
AD-288637.1	gsgsaaaaGfgAfAfCfuguacuggcuL96	272	asGfsccag(Tgn)acaguuCfcUfuuuccsusg	572	CAGGAAAAGGAACUGUACUGGCU	872
AD-288639.1	asasaaggAfaCfUfGfuacuggcuauL96	273	asUfsagcc(Agn)guacagUfuCfcuuuuscsc	573	GGAAAAGGAACUGUACUGGCUAU	873
AD-288642.1	gsgsaacuGfuAfCfUfggcuauuacaL96	274	usGfsuaau(Agn)gccaguAfcAfguuccsusu	574	AAGGAACUGUACUGGCUAUUACA	874

AD-288696.1	csasggaaAfaGfGfAfacuguacuguL96	275	asCfsagua(Cgn)aguuccUfuUfuccugsusg	575	CACAGGAAAAGGAACUGUACUGG	875
AD-288698.1	asgsgaacUfgUfAfCfuggcuauuauL96	276	asUfsaaua(Ggn)ccaguaCfaGfuuccususu	576	AAAGGAACUGUACUGGCUAUUAC	876
AD-288912.1	csuscccaCfuAfCfAfucaagacuaaL96	277	usUfsaguc(Tgn)ugauguAfgUfgggagsusc	577	GACUCCCACUACAUCAAGACUAA	877
AD-288913.1	uscsccacUfaCfAfUfcaagacuaauL96	278	asUfsuagu(Cgn)uugaugUfaGfugggasgsu	578	ACUCCCACUACAUCAAGACUAAU	878
AD-288914.1	cscsacuaCfaUfCfAfagacuaaucuL96	279	asGfsauua(Ggn)ucuugaUfgUfaguggsgsa	579	UCCCACUACAUCAAGACUAAUCU	879
AD-288915.1	csascuacAfuCfAfAfgacuaaucuuL96	280	asAfsgauu(Agn)gucuugAfuGfuaggsgsg	580	CCCACUACAUCAAGACUAAUCUU	880
AD-288916.1	csusacauCfaAfGfAfcuaaucuuguL96	281	asCfsaaga(Tgn)uagucuUfgAfuguagsusg	581	CACUACAUCAAGACUAAUCUUGU	881
AD-288917.1	usascaucAfaGfAfCfuaaucuuguuL96	282	asAfscaag(Agn)uuagucUfuGfauguasgsu	582	ACUACAUCAAGACUAAUCUUGUU	882
AD-288918.1	ascsaucaAfgAfCfUfaaucuuguuuL96	283	asAfsacaa(Ggn)auuaguCfuUfgaugusasg	583	CUACAUCAAGACUAAUCUUGUUU	883
AD-288933.1	gsusguuuUfuCfAfCfauguauuauaL96	284	usAfsuaau(Agn)caugugAfaAfaacacsasc	584	GUGUGUUUUUCACAUGUAUUAUA	884
AD-288937.1	uscsacauGfuAfUfUfauagaaugcuL96	285	asGfscauu(Cgn)uauaauAfcAfugugasasa	585	UUUCACAUGUAUUAUAGAAUGCU	885

AD-288938.1	csascaugUfaUfUfAfuagaaugcuuL96	286	asAfsgcau(Tgn)cuauaaUfaCfaugugsasa	586	UUCACAUGUAUUAUAGAAUGCUU	886
AD-288941.1	gsusauuaUfaGfAfAfugcuuuugcaL96	287	usGfscaaa(Agn)gcauucUfaUfaauacsasu	587	AUGUAUUAUAGAAUGCUUUUGCA	887
AD-288943.1	usasuagaAfuGfCfUfuuugcauggaL96	288	usCfscaug(Cgn)aaaagcAfuUfcuauasasu	588	AUUAUAGAAUGCUUUUGCAUGGA	888
AD-288945.1	asgsaaugCfuUfUfUfgcauggacuaL96	289	usAfsgucc(Agn)ugcaaaAfgCfauucusasu	589	AUAGAAUGCUUUUGCAUGGACUA	889
AD-288946.1	gsasaugcUfuUfUfGfcauggacuauL96	290	asUfsaguc(Cgn)augcaaAfaGfcauucsusa	590	UAGAAUGCUUUUGCAUGGACUAU	890
AD-288947.1	usgscuuuUfgCfAfUfggacuauccuL96	291	asGfsgaua(Ggn)uccaugCfaAfaagcasusu	591	AAUGCUUUUGCAUGGACUAUCCU	891
AD-288948.1	csusuuugCfaUfGfGfacuauccucuL96	292	asGfsagga(Tgn)aguccaUfgCfaaaagscsa	592	UGCUUUUGCAUGGACUAUCCUCU	892
AD-288950.1	ususgcauGfgAfCfUfaucucuuguL96	293	asCfsaaga(Ggn)gauaguCfcAfugcaasasa	593	UUUUGCAUGGACUAUCCUCUUGU	893
AD-288951.1	usgscaugGfaCfUfAfuccucuuguuL96	294	asAfscaag(Agn)ggauagUfcCfaugcasasa	594	UUUGCAUGGACUAUCCUCUUGUU	894
AD-288952.1	gscsauggAfcUfAfUfccucuguuuL96	295	asAfsacaa(Ggn)aggauaGfuCfcaugcsasa	595	UUGCAUGGACUAUCCUCUUGUUU	895
AD-288956.1	gsgsacuaUfcCfUfCfuuguuuuuauL96	296	asUfsaaaa(Agn)caagagGfaUfaguccsasu	596	AUGGACUAUCCUCUUGUUUUUAU	896

AD-288957.1	gsascuauCfcUfCfUfugu uuuuauuL96	297	asAfsuaaa(Agn)acaagaGfgAfuaguc scsa	597	UGGACUAUCCUCUUGUUUU UAUU	897
AD-288959.1	csusauccUfcUfUfGfuuu uuauuaaL96	298	usUfsaaua(Agn)aaacaaGfaGfgauags usc	598	GACUAUCCUCUUGUUUUUA UUAA	898
AD-288981.1	cscscacuAfcAfUfCfaaga cuaauuL96	299	asAfsuuag(Tgn)cuugauGfuAfguggg sasg	599	CUCCCACUACAUCAAGACU AAUC	899
AD-288982.1	ascsuacaUfcAfAfGfacua aucuuuL96	300	asAfsagau(Tgn)agucuuGfaUfguagu sgsg	600	CCACUACAUCAAGACUAAU CUUG	900
AD-288996.1	asusgcuuUfuGfCfAfugg acuaucuL96	301	asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaus usc	601	GAAUGCUUUUGCAUGGAC UAUCC	901

*Мишень: HSD17B13

Таблица 8

Немодифицированные последовательности HSD17B13 ELF7 GNA7*

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Положение в NM_178135.4	Последовательность антисмысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Положение в NM_178135.4
AD-286958.1	AGUACCUCCUCCCUA GGACUA	902	5-25	UAGUCCTAGGGAGGAGGUA CUGU	1202	3-25
AD-287001.1	UCCUUCUGCUUCUGA UCACCA	903	85-105	UGGUGATCAGAAGCAGAAG GAUU	1203	83-105
AD-287012.1	CAUCAUCUACUCCUA CUUGGA	904	104-124	UCCAAGTAGGAGUAGAUGA UGGU	1204	102-124

AD-287015.1	CUACUCCUACUUGGAGUCGUU	906	110-130	AACGACTCCAAGUAGGAGUAGAU	1206	108-130
AD-287017.1	GUACCUCCUCCCUAGGACUAU	907	6-26	AUAGUCCUAGGGAGGAGGUACUG	1207	4-26
AD-287026.1	ACACAAGGACUGAACCAGAAU	908	25-45	AUUCUGGUUCAGUCCUUGUGUAG	1208	23-45
AD-287059.1	ACCAUCAUCUACUCCUACUUU	909	102-122	AAAGUAGGAGUAGAUGAUGGUGA	1209	100-122
AD-287060.1	CCAUCAUCUACUCCUACUUGU	910	103-123	ACAAGUAGGAGUAGAUGAUGGUG	1210	101-123
AD-287061.1	AUCAUCUACUCCUACUUGGAU	911	105-125	AUCCAAGUAGGAGUAGAUGAUGG	1211	103-125
AD-287062.1	CAUCUACUCCUACUUGGAGUU	912	107-127	AACUCCAAGUAGGAGUAGAUGAU	1212	105-127
AD-287064.1	UACUCCUACUUGGAGUCGUUU	913	111-131	AAACGACUCCAAGUAGGAGUAGA	1213	109-131
AD-287065.1	ACUCCUACUUGGAGUCGUUGU	914	112-132	ACAACGACUCCAAGUAGGAGUAG	1214	110-132
AD-287126.1	UCCUACUUGGAGUCGUUGGUU	916	114-134	AACCAACGACUCCAAGUAGGAGU	1216	112-134
AD-287203.1	GCAGCUGAGUGCCGAAAACUA	920	294-314	UAGUUUTCGGCACUCAGCUGCAG	1220	292-314

AD-287227.1	CUGUGGGAUAUUAAUAAGCGU	923	258-278	ACGCUUAUUAAUAUCCCACAGAA	1223	256-278
AD-287246.1	CUGCAGCUGAGUGCCGAAAAU	924	292-312	AUUUUCGGCACUCAGCUGCAGUU	1224	290-312
AD-287247.1	CAGCUGAGUGCCGAAAACUAU	925	295-315	AUAGUUTUCGGCACUCAGCUGCA	1225	293-315
AD-287248.1	AGCUGAGUGCCGAAAACUAGU	926	296-316	ACUAGUTUUCGGCACUCAGCUGC	1226	294-316
AD-287249.1	GCUGAGUGCCGAAAACUAGGU	927	297-317	ACCUAGTUUUCGGCACUCAGCUG	1227	295-317
AD-287250.1	CUGAGUGCCGAAAACUAGGCU	928	298-318	AGCCUAGUUUUCGGCACUCAGCU	1228	296-318
AD-287251.1	GAGUGCCGAAAACUAGGCGUU	929	300-320	AACGCCTAGUUUUCGGCACUCAG	1229	298-320
AD-287252.1	GUGCCGAAAACUAGGCGUCAU	930	302-322	AUGACGCCUAGUUUUCGGCACUC	1230	300-322
AD-287253.1	GCCGAAAACUAGGCGUCACUU	931	304-324	AAGUGACGCCUAGUUUUCGGCAC	1231	302-324
AD-287254.1	CCGAAAACUAGGCGUCACUGU	932	305-325	ACAGUGACGCCUAGUUUUCGGCA	1232	303-325
AD-287258.1	ACUAGGCGUCACUGCGCAUGU	933	311-331	ACAUGCGCAGUGACGCCUAGUUU	1233	309-331

AD-287288.1	CUAUCGCUCUCUAAAUCAGGU	935	365-385	ACCUGATUUAGAGAGCGAUAGAU	1235	363-385
AD-287290.1	UCGCUCUCUAAAUCAGGUGAA	937	368-388	UUCACCTGAUUUAGAGAGCGAUA	1237	366-388
AD-287293.1	UCUCUAAAUCAGGUGAAGAAA	938	372-392	UUUCUUCACCUGAUUUAGAGAGC	1238	370-392
AD-287316.1	GUGGUGAAUAAUGCUGGGACA	939	414-434	UGUCCCAGCAUUAUUCACCACGA	1239	412-434
AD-287320.1	GAAUAAUGCUGGGACAGUAUA	940	419-439	UAUACUGUCCCAGCAUUAUUCAC	1240	417-439
AD-287321.1	AAUAAUGCUGGGACAGUAUAU	941	420-440	AUAUACTGUCCCAGCAUUAUUCA	1241	418-440
AD-287324.1	GGGACAGUAUAUCCAGCCGAU	942	429-449	AUCGGCTGGAUAUACUGUCCCAG	1242	427-449
AD-287325.1	GACAGUAUAUCCAGCCGAUCU	943	431-451	AGAUCGGCUGGAUAUACUGUCCC	1243	429-451
AD-287326.1	ACAGUAUAUCCAGCCGAUCUU	944	432-452	AAGAUCGGCUGGAUAUACUGUCC	1244	430-452
AD-287327.1	AGUAUAUCCAGCCGAUCUUCU	945	434-454	AGAAGATCGGCUGGAUAUACUGU	1245	432-454
AD-287344.1	AUCUAUCGCUCUCUAAAUCAU	946	363-383	AUGAUUTAGAGAGCGAUAGAUCU	1246	361-383

AD-287346.1	UAUCGCUCUCUAAAUCAGGUU	947	366-386	AACCUGAUUUAGAGAGCGAUAGA	1247	364-386
AD-287347.1	CGCUCUCUAAAUCAGGUGAAU	948	369-389	AUUCACCUGAUUUAGAGAGCGAU	1248	367-389
AD-287366.1	CGUGGUGAAUAAUGCUGGGAU	949	413-433	AUCCCAGCAUUAUUCACCACGAU	1249	411-433
AD-287367.1	UGGUGAAUAAUGCUGGGACAU	950	415-435	AUGUCCCAGCAUUAUUCACCACG	1250	413-435
AD-287370.1	AUGCUGGGACAGUAUAUCCAU	951	424-444	AUGGAUAUACUGUCCCAGCAUUA	1251	422-444
AD-287371.1	UGCUGGGACAGUAUAUCCAGU	952	425-445	ACUGGATAUACUGUCCCAGCAUU	1252	423-445
AD-287372.1	GCUGGGACAGUAUAUCCAGCU	953	426-446	AGCUGGAUAUACUGUCCCAGCAU	1253	424-446
AD-287373.1	CUGGGACAGUAUAUCCAGCCU	954	427-447	AGGCUGGAUAUACUGUCCCAGCA	1254	425-447
AD-287374.1	GGACAGUAUAUCCAGCCGAUU	955	430-450	AAUCGGCUGGAUAUACUGUCCCA	1255	428-450
AD-287375.1	CAGUAUAUCCAGCCGAUCUUU	956	433-453	AAAGAUCGGCUGGAUAUACUGUC	1256	431-453
AD-287391.1	CCAAGGAUGAAGAGAUUACCA	957	460-480	UGGUAATCUCUUCAUCCUUGGUG	1257	458-480

AD-287406.1	UUUGAGGUCAACAUCCUAGGA	959	486-506	UCCUAGGAUGUUGACCUCAAAUG	1259	484-506
AD-287407.1	UGAGGUCAACAUCCUAGGACA	960	488-508	UGUCCUAGGAUGUUGACCUCAAA	1260	486-508
AD-287408.1	GAGGUCAACAUCCUAGGACAU	961	489-509	AUGUCCTAGGAUGUUGACCUCAA	1261	487-509
AD-287411.1	GUCAACAUCCUAGGACAUUUU	963	492-512	AAAAUGTCCUAGGAUGUUGACCU	1263	490-512
AD-287413.1	ACAUCCUAGGACAUUUUUGGA	964	496-516	UCCAAAAAUGUCCUAGGAUGUUG	1264	494-516
AD-287414.1	CAUCCUAGGACAUUUUUGGAU	965	497-517	AUCCAAAAAUGUCCUAGGAUGUU	1265	495-517
AD-287418.1	AGGACAUUUUUGGAUCACAAA	967	503-523	UUUGUGAUCCAAAAAUGUCCUAG	1267	501-523
AD-287419.1	GGACAUUUUUGGAUCACAAAA	968	504-524	UUUUGUGAUCCAAAAAUGUCCUA	1268	502-524
AD-287421.1	UUUUUGGAUCACAAAAGCACU	969	509-529	AGUGCUTUUGUGAUCCAAAAAUG	1269	507-529
AD-287424.1	UGGAUCACAAAAGCACUUCUU	970	513-533	AAGAAGTGCUUUUGUGAUCCAAA	1270	511-533
AD-287427.1	CAAAAGCACUUCUUCCAUCGA	971	520-540	UCGAUGGAAGAAGUGCUUUUGUG	1271	518-540

AD-287428.1	AAAAGCACUUCUUCCAUCGAU	972	521-541	AUCGAUGGAAGAAGUGCUUUUGU	1272	519-541
AD-287453.1	ACCAAGGAUGAAGAGAUUACU	976	459-479	AGUAAUCUCUUCAUCCUUGGUGC	1276	457-479
AD-287462.1	AGACAUUUGAGGUCAACAUCU	977	481-501	AGAUGUTGACCUCAAAUGUCUUG	1277	479-501
AD-287463.1	CAUUUGAGGUCAACAUCCUAU	978	484-504	AUAGGATGUUGACCUCAAAUGUC	1278	482-504
AD-287464.1	AUUUGAGGUCAACAUCCUAGU	979	485-505	ACUAGGAUGUUGACCUCAAAUGU	1279	483-505
AD-287465.1	UUGAGGUCAACAUCCUAGGAU	980	487-507	AUCCUAGGAUGUUGACCUCAAAU	1280	485-507
AD-287466.1	CAACAUCCUAGGACAUUUUUG	981	494-514	CAAAAATGUCCUAGGAUGUUGAC	1281	492-514
AD-287467.1	AACAUCCUAGGACAUUUUGU	982	495-515	ACAAAAAUGUCCUAGGAUGUUGA	1282	493-515
AD-287468.1	AUCCUAGGACAUUUUUGGAUU	983	498-518	AAUCCAAAAAUGUCCUAGGAUGU	1283	496-518
AD-287469.1	CCUAGGACAUUUUUGGAUCAU	984	500-520	AUGAUCCAAAAAUGUCCUAGGAU	1284	498-520
AD-287470.1	GACAUUUUUGGAUCACAAAAU	985	505-525	AUUUUGTGAUCCAAAAAUGUCCU	1285	503-525

AD-287474.1	GGAUCACAAAAGCACUUCUUU	986	514-534	AAAGAAGUGCUUUUGUGAUCCAA	1286	512-534
AD-287476.1	CACAAAAGCACUUCUUCCAUU	987	518-538	AAUGGAAGAAGUGCUUUUGUGAU	1287	516-538
AD-287477.1	ACAAAAGCACUUCUUCCAUCU	988	519-539	AGAUGGAAGAAGUGCUUUUGUGA	1288	517-539
AD-287478.1	AAAGCACUUCUUCCAUCGAUU	989	522-542	AAUCGATGGAAGAAGUGCUUUUG	1289	520-542
AD-287479.1	GCACUUCUUCCAUCGAUGAUU	990	525-545	AAUCAUCGAUGGAAGAAGUGCUU	1290	523-545
AD-287491.1	AGAAAUCAUGGCCACAUCGUU	991	549-569	AACGAUGUGGCCAUGAUUUCUCU	1291	547-569
AD-287492.1	AAAUCAUGGCCACAUCGUCAU	992	551-571	AUGACGAUGUGGCCAUGAUUUCU	1292	549-571
AD-287517.1	UUCCUUACCUCAUCCCAUAUU	993	601-621	AAUAUGGGAUGAGGUAAGGAAUC	1293	599-621
AD-287520.1	ACCUCAUCCCAUAUUGUUCCA	994	607-627	UGGAACAAUAUGGGAUGAGGUAA	1294	605-627
AD-287521.1	UCAUCCCAUAUUGUUCCAGCA	995	610-630	UGCUGGAACAAUAUGGGAUGAGG	1295	608-630
AD-287524.1	UCCCAUAUUGUUCCAGCAAAU	997	613-633	AUUUGCTGGAACAAUAUGGGAUG	1297	611-633

AD-287525.1	CCCAUAUUGUUCCAGCAAAUU	998	614-634	AAUUUGCUGGAACAAUAUGGGAU	1298	612-634
AD-287537.1	UGUUGGCUUUCACAGAGGUCU	999	641-661	AGACCUCUGUGAAAGCCAACAGC	1299	639-661
AD-287539.1	GGCUUUCACAGAGGUCUGACA	1000	645-665	UGUCAGACCUCUGUGAAAGCCAA	1300	643-665
AD-287543.1	CACAGAGGUCUGACAUCAGAA	1002	651-671	UUCUGATGUCAGACCUCUGUGAA	1302	649-671
AD-287546.1	AGGUCUGACAUCAGAACUUCA	1003	656-676	UGAAGUTCUGAUGUCAGACCUCU	1303	654-676
AD-287568.1	UCCUUACCUCAUCCCAUAUUU	1004	602-622	AAAUAUGGGAUGAGGUAAGGAAU	1304	600-622
AD-287591.1	UUCACAGAGGUCUGACAUCAU	1005	649-669	AUGAUGTCAGACCUCUGUGAAAG	1305	647-669
AD-287610.1	UUGGGAAAAACUGGUAUCAAA	1006	681-701	UUUGAUACCAGUUUUUCCCAAGG	1306	679-701
AD-287616.1	UGGUAUCAAAACCUCAUGUCU	1008	692-712	AGACAUGAGGUUUUGAUACCAGU	1308	690-712
AD-287627.1	CUCUGCCCAGUUUUUGUGAAU	1009	711-731	AUUCACAAAAACUGGGCAGAGAC	1309	709-731
AD-287632.1	UUUUUGUGAAUACUGGGUUCA	1010	721-741	UGAACCCAGUAUUCACAAAAACU	1310	719-741

AD-287636.1	UGAAUACUGGGUUCACCAAAA	1013	727-747	UUUUGGTGAACCCAGUAUUCACA	1313	725-747
AD-287637.1	GAAUACUGGGUUCACCAAAAA	1014	728-748	UUUUUGGUGAACCCAGUAUUCAC	1314	726-748
AD-287647.1	AAAAAUCCAAGCACAAGAUUA	1016	744-764	UAAUCUTGUGCUUGGAUUUUUGG	1316	742-764
AD-287648.1	AAAAUCCAAGCACAAGAUUAU	1017	745-765	AUAAUCTUGUGCUUGGAUUUUUG	1317	743-765
AD-287654.1	AAGAUUAUGGCCUGUAUUGGA	1021	758-778	UCCAAUACAGGCCAUAAUCUUGU	1321	756-778
AD-287655.1	GAUUAUGGCCUGUAUUGGAGA	1022	760-780	UCUCCAAUACAGGCCAUAAUCUU	1322	758-780
AD-287659.1	GCCUGUAUUGGAGACAGAUGA	1025	767-787	UCAUCUGUCUCCAAUACAGGCCA	1325	765-787
AD-287679.1	CUGGUAUCAAAACCUCAUGUU	1026	691-711	AACAUGAGGUUUUGAUACCAGUU	1326	689-711
AD-287680.1	GGUAUCAAAACCUCAUGUCUU	1027	693-713	AAGACATGAGGUUUUGAUACCAG	1327	691-713
AD-287683.1	UCAAAACCUCAUGUCUCUGCU	1028	697-717	AGCAGAGACAUGAGGUUUUGAUA	1328	695-717
AD-287690.1	CCCAGUUUUUGUGAAUACUGU	1029	716-736	ACAGUATUCACAAAAACUGGGCA	1329	714-736

AD-287693.1	UUUUGUGAAUACUGGGUUCAU	1030	722-742	AUGAACCCAGUAUUCACAAAAAC	1330	720-742
AD-287694.1	UUUGUGAAUACUGGGUUCACU	1031	723-743	AGUGAACCCAGUAUUCACAAAAA	1331	721-743
AD-287695.1	AUACUGGGUUCACCAAAAAUU	1032	730-750	AAUUUUTGGUGAACCCAGUAUUC	1332	728-750
AD-287696.1	UACUGGGUUCACCAAAAAUCU	1033	731-751	AGAUUUTUGGUGAACCCAGUAUU	1333	729-751
AD-287700.1	CACCAAAAAUCCAAGCACAAU	1034	740-760	AUUGUGCUUGGAUUUUUGGUGAA	1334	738-760
AD-287701.1	AAAUCCAAGCACAAGAUUAUU	1035	746-766	AAUAAUCUUGUGCUUGGAUUUUU	1335	744-766
AD-287702.1	AAUCCAAGCACAAGAUUAUGU	1036	747-767	ACAUAATCUUGUGCUUGGAUUUU	1336	745-767
AD-287703.1	AUCCAAGCACAAGAUUAUGGU	1037	748-768	ACCAUAAUCUUGUGCUUGGAUUU	1337	746-768
AD-287704.1	UCCAAGCACAAGAUUAUGGCU	1038	749-769	AGCCAUAAUCUUGUGCUUGGAUU	1338	747-769
AD-287706.1	ACAAGAUUAUGGCCUGUAUUU	1039	756-776	AAAUACAGGCCAUAAUCUUGUGC	1339	754-776
AD-287707.1	CAAGAUUAUGGCCUGUAUUGU	1040	757-777	ACAAUACAGGCCAUAAUCUUGUG	1340	755-777

AD-287709.1	AUUAUGGCCUGUAUUGGAGAU	1041	761-781	AUCUCCAAUACAGGCCAUAAUCU	1341	759-781
AD-287711.1	GGCCUGUAUUGGAGACAGAUU	1042	766-786	AAUCUGTCUCCAAUACAGGCCAU	1342	764-786
AD-287724.1	GUAAGAAGUCUGAUAGAUGGA	1043	792-812	UCCAUCTAUCAGACUUCUUACGA	1343	790-812
AD-287726.1	AAGAAGUCUGAUAGAUGGAAU	1045	794-814	AUUCCATCUAUCAGACUUCUUAC	1345	792-814
AD-287727.1	AGAAGUCUGAUAGAUGGAAUA	1046	795-815	UAUUCCAUCUAUCAGACUUCUUA	1346	793-815
AD-287735.1	AGAUGGAAUACUUACCAAUAA	1048	806-826	UUAUUGGUAAGUAUUCCAUCUAU	1348	804-826
AD-287736.1	AUGGAAUACUUACCAAUAAGA	1049	808-828	UCUUAUTGGUAAGUAUUCCAUCU	1349	806-828
AD-287737.1	UGGAAUACUUACCAAUAAGAA	1050	809-829	UUCUUATUGGUAAGUAUUCCAUC	1350	807-829
AD-287738.1	GGAAUACUUACCAAUAAGAAA	1051	810-830	UUUCUUAUUGGUAAGUAUUCCAU	1351	808-830
AD-287739.1	GAAUACUUACCAAUAAGAAAA	1052	811-831	UUUUCUTAUUGGUAAGUAUUCCA	1352	809-831
AD-287740.1	AAUACUUACCAAUAAGAAAAU	1053	812-832	AUUUUCTUAUUGGUAAGUAUUCC	1353	810-832

AD-287778.1	UUUCUUCCUGAACGCGCCUCA	1054	879-899	UGAGGCGCGUUCAGGAAGAAACU	1354	877-899
AD-287798.1	AAAUCGUAUGCAGAAUAUUCA	1057	908-928	UGAAUATUCUGCAUACGAUUUAA	1357	906-928
AD-287800.1	AUCGUAUGCAGAAUAUUCAAU	1058	910-930	AUUGAATAUUCUGCAUACGAUUU	1358	908-930
AD-287801.1	UCGUAUGCAGAAUAUUCAAUU	1059	911-931	AAUUGAAUAUUCUGCAUACGAUU	1359	909-931
AD-287802.1	CGUAUGCAGAAUAUUCAAUUU	1060	912-932	AAAUUGAAUAUUCUGCAUACGAU	1360	910-932
AD-287804.1	AUGCAGAAUAUUCAAUUUGAA	1061	915-935	UUCAAATUGAAUAUUCUGCAUAC	1361	913-935
AD-287810.1	GAAGUCUGAUAGAUGGAAUAU	1062	796-816	AUAUUCCAUCUAUCAGACUUCUU	1362	794-816
AD-287811.1	UCUGAUAGAUGGAAUACUUAU	1063	800-820	AUAAGUAUUCCAUCUAUCAGACU	1363	798-820
AD-287813.1	GAUGGAAUACUUACCAAUAAU	1064	807-827	AUUAUUGGUAAGUAUUCCAUCUA	1364	805-827
AD-287837.1	ACAGAAGUUUCUUCCUGAACU	1065	872-892	AGUUCAGGAAGAAACUUCUGUAG	1365	870-892
AD-287839.1	AGAAGUUUCUUCCUGAACGCU	1066	874-894	AGCGUUCAGGAAGAAACUUCUGU	1366	872-894

AD-287841.1	AAGUUUCUUCCUGAACGCGCU	1067	876-896	AGCGCGTUCAGGAAGAAACUUCU	1367	874-896
AD-287842.1	GUUUCUUCCUGAACGCGCCUU	1068	878-898	AAGGCGCGUUCAGGAAGAAACUU	1368	876-898
AD-287844.1	UCUUCCUGAACGCGCCUCAGU	1069	881-901	ACUGAGGCGCGUUCAGGAAGAAA	1369	879-901
AD-287854.1	GCAGAAUAUUCAAUUUGAAGU	1070	917-937	ACUUCAAAUUGAAUAUUCUGCAU	1370	915-937
AD-287856.1	AAUAUUCAAUUUGAAGCAGUU	1071	921-941	AACUGCTUCAAAUUGAAUAUUCU	1371	919-941
AD-287893.1	GAUGUAUGCAUGAUAAUGAUA	1073	989-1009	UAUCAUTAUCAUGCAUACAUCUC	1373	987-1009
AD-287917.1	CAAUGCUGCAAAGCUUUAUUU	1074	1025-1045	AAAUAAAGCUUUGCAGCAUUGAU	1374	1023-1045
AD-287924.1	AAAGCUUUAUUUCACAUUUUU	1075	1034-1054	AAAAAUGUGAAAUAAAGCUUUGC	1375	1032-1054
AD-287934.1	AAUUUGAAGCAGUGGUUGGCU	1076	928-948	AGCCAACCACUGCUUCAAAUUGA	1376	926-948
AD-287969.1	AAUGCUGCAAAGCUUUAUUUC	1077	1026-1046	GAAAUAAAGCUUUGCAGCAUUGA	1377	1024-1046
AD-287970.1	UGCUGCAAAGCUUUAUUUCAU	1078	1028-1048	AUGAAATAAAGCUUUGCAGCAUU	1378	1026-1048

AD-288005.1	AGAUUAAUUACCUGUCUUCCU	1080	1111-1131	AGGAAGACAGGUAAUUAAUCUUG	1380	1109-1131
AD-288006.1	AUUAAUUACCUGUCUUCCUGU	1081	1113-1133	ACAGGAAGACAGGUAAUUAAUCU	1381	1111-1133
AD-288008.1	UAAUUACCUGUCUUCCUGUUU	1082	1115-1135	AAACAGGAAGACAGGUAAUUAAU	1382	1113-1135
AD-288010.1	UACCUGUCUUCCUGUUUCUCA	1083	1119-1139	UGAGAAACAGGAAGACAGGUAAU	1383	1117-1139
AD-288011.1	ACCUGUCUUCCUGUUUCUCAA	1084	1120-1140	UUGAGAAACAGGAAGACAGGUAA	1384	1118-1140
AD-288015.1	UCUUCCUGUUUCUCAAGAAUA	1085	1125-1145	UAUUCUTGAGAAACAGGAAGACA	1385	1123-1145
AD-288046.1	UUUUCCUUUCAUGCCUCUUAA	1086	1171-1191	UUAAGAGGCAUGAAAGGAAAAAC	1386	1169-1191
AD-288049.1	UCCUUUCAUGCCUCUUAAAAA	1087	1174-1194	UUUUUAAGAGGCAUGAAAGGAAA	1387	1172-1194
AD-288050.1	CUUUCAUGCCUCUUAAAAACU	1088	1176-1196	AGUUUUTAAGAGGCAUGAAAGGA	1388	1174-1196
AD-288076.1	AAAACAUUGGUUUGGCACUAU	1089	1073-1093	AUAGUGCCAAACCAAUGUUUUUA	1389	1071-1093
AD-288092.1	GAUUAAUUACCUGUCUUCCUU	1090	1112-1132	AAGGAAGACAGGUAAUUAAUCUU	1390	1110-1132

AD-288094.1	UUACCUGUCUUCCUGUUUCUU	1091	1118-1138	AAGAAACAGGAAGACAGGUAAUU	1391	1116-1138
AD-288095.1	CCUGUCUUCCUGUUUCUCAAU	1092	1121-1141	AUUGAGAAACAGGAAGACAGGUA	1392	1119-1141
AD-288108.1	GGUCUGUUUUUCCUUUCAUGU	1093	1164-1184	ACAUGAAAGGAAAAACAGACCUA	1393	1162-1184
AD-288109.1	GUCUGUUUUUCCUUUCAUGCU	1094	1165-1185	AGCAUGAAAGGAAAAACAGACCU	1394	1163-1185
AD-288173.1	UUAUUUACACAGGGAAGGUUU	1095	1302-1322	AAACCUTCCCUGUGUAAAUAAGU	1395	1300-1322
AD-288174.1	UAUUUACACAGGGAAGGUUUA	1096	1303-1323	UAAACCTUCCCUGUGUAAAUAAG	1396	1301-1323
AD-288180.1	GGGAAGGUUUAAGACUGUUCA	1099	1313-1333	UGAACAGUCUUAAACCUUCCCUG	1399	1311-1333
AD-288181.1	GGAAGGUUUAAGACUGUUCAA	1100	1314-1334	UUGAACAGUCUUAAACCUUCCCU	1400	1312-1334
AD-288184.1	UUUAAGACUGUUCAAGUAGCA	1102	1320-1340	UGCUACTUGAACAGUCUUAAACC	1402	1318-1340
AD-288187.1	GACUGUUCAAGUAGCAUUCCA	1104	1325-1345	UGGAAUGCUACUUGAACAGUCUU	1404	1323-1345
AD-288188.1	ACUGUUCAAGUAGCAUUCCAA	1105	1326-1346	UUGGAATGCUACUUGAACAGUCU	1405	1324-1346

AD-288192.1	CAAGUAGCAUUCCAAUCUGUA	1108	1332-1352	UACAGATUGGAAUGCUACUUGAA	1408	1330-1352
AD-288227.1	AACUUAUUUACACAGGGAAGU	1111	1299-1319	ACUUCCCUGUGUAAAUAAGUUCU	1411	1297-1319
AD-288229.1	UACACAGGGAAGGUUUAAGAU	1112	1307-1327	AUCUUAAACCUUCCCUGUGUAAA	1412	1305-1327
AD-288230.1	CACAGGGAAGGUUUAAGACUU	1113	1309-1329	AAGUCUTAAACCUUCCCUGUGUA	1413	1307-1329
AD-288231.1	AGGGAAGGUUUAAGACUGUUU	1114	1312-1332	AAACAGTCUUAAACCUUCCCUGU	1414	1310-1332
AD-288232.1	GAAGGUUUAAGACUGUUCAAU	1115	1315-1335	AUUGAACAGUCUUAAACCUUCCC	1415	1313-1335
AD-288233.1	GGUUUAAGACUGUUCAAGUAU	1116	1318-1338	AUACUUGAACAGUCUUAAACCUU	1416	1316-1338
AD-288235.1	AAGACUGUUCAAGUAGCAUUU	1117	1323-1343	AAAUGCTACUUGAACAGUCUUAA	1417	1321-1343
AD-288236.1	AGACUGUUCAAGUAGCAUUCU	1118	1324-1344	AGAAUGCUACUUGAACAGUCUUA	1418	1322-1344
AD-288237.1	UGUUCAAGUAGCAUUCCAAUU	1119	1328-1348	AAUUGGAAUGCUACUUGAACAGU	1419	1326-1348
AD-288238.1	UUCAAGUAGCAUUCCAAUCUU	1120	1330-1350	AAGAUUGGAAUGCUACUUGAACA	1420	1328-1350

AD-288290.1	GCAGCUUUAUCUCAACCUGGA	1121	1419-1439	UCCAGGTUGAGAUAAAGCUGCCU	1421	1417-1439
AD-288316.1	AGCAUUUGAAAGAUUUCCCUA	1122	1455-1475	UAGGGAAAUCUUUCAAAUGCUGA	1422	1453-1475
AD-288318.1	UGAAAGAUUUCCCUAGCCUCU	1123	1461-1481	AGAGGCTAGGGAAAUCUUUCAAA	1423	1459-1481
AD-288324.1	UUCCCUAGCCUCUUCCUUUUU	1125	1469-1489	AAAAAGGAAGAGGCUAGGGAAAU	1425	1467-1489
AD-288337.1	AAGAACACAGAAUGAGUGCAU	1126	1374-1394	AUGCACTCAUUCUGUGUUCUUGU	1426	1372-1394
AD-288338.1	GAACACAGAAUGAGUGCACAU	1127	1376-1396	AUGUGCACUCAUUCUGUGUUCUU	1427	1374-1396
AD-288339.1	AACACAGAAUGAGUGCACAGU	1128	1377-1397	ACUGUGCACUCAUUCUGUGUUCU	1428	1375-1397
AD-288340.1	CAGAAUGAGUGCACAGCUAAU	1129	1381-1401	AUUAGCTGUGCACUCAUUCUGUG	1429	1379-1401
AD-288341.1	GAAUGAGUGCACAGCUAAGAU	1130	1383-1403	AUCUUAGCUGUGCACUCAUUCUG	1430	1381-1403
AD-288366.1	UUCAGCAUUUGAAAGAUUUCU	1131	1452-1472	AGAAAUCUUUCAAAUGCUGAAUC	1431	1450-1472
AD-288369.1	CAUUUGAAAGAUUUCCCUAGU	1132	1457-1477	ACUAGGGAAAUCUUUCAAAUGCU	1432	1455-1477

AD-288370.1	AUUUGAAAGAUUUCCCUAGCU	1133	1458-1478	AGCUAGGGAAAUCUUUCAAAUGC	1433	1456-1478
AD-288394.1	GUGCAACUCUAUUCUGGACUU	1136	1505-1525	AAGUCCAGAAUAGAGUUGCACCG	1436	1503-1525
AD-288396.1	GCAACUCUAUUCUGGACUUUA	1138	1507-1527	UAAAGUCCAGAAUAGAGUUGCAC	1438	1505-1527
AD-288397.1	CAACUCUAUUCUGGACUUUAU	1139	1508-1528	AUAAAGUCCAGAAUAGAGUUGCA	1439	1506-1528
AD-288427.1	AGUCCACCAAAAGUGGACCCU	1142	1559-1579	AGGGUCCACUUUUGGUGGACUUC	1442	1557-1579
AD-288466.1	AAACGGUGCAACUCUAUUCUU	1148	1500-1520	AAGAAUAGAGUUGCACCGUUUUG	1448	1498-1520
AD-288467.1	AACGGUGCAACUCUAUUCUGU	1149	1501-1521	ACAGAATAGAGUUGCACCGUUUU	1449	1499-1521
AD-288470.1	UAUUCUGGACUUUAUUACUUU	1150	1514-1534	AAAGUAAUAAAGUCCAGAAUAGA	1450	1512-1534
AD-288491.1	AAAGUGGACCCUCUAUAUUUC	1151	1568-1588	GAAAUATAGAGGGUCCACUUUUG	1451	1566-1588
AD-288492.1	AAGUGGACCCUCUAUAUUUCU	1152	1569-1589	AGAAAUAUAGAGGGUCCACUUUU	1452	1567-1589
AD-288561.1	AUGUUUAGACAAUUUUAGGCU	1153	1724-1744	AGCCUAAAAUUGUCUAAACAUCU	1453	1722-1744

AD-288562.1	GUUUAGACAAUUUUAGGCUCA	1154	1726-1746	UGAGCCTAAAAUUGUCUAAACAU	1454	1724-1746
AD-288567.1	GACAAUUUUAGGCUCAAAAAU	1159	1731-1751	AUUUUUGAGCCUAAAAUUGUCUA	1459	1729-1751
AD-288573.1	UAGGCUCAAAAAUUAAAGCUA	1161	1739-1759	UAGCUUTAAUUUUUGAGCCUAAA	1461	1737-1759
AD-288574.1	AGGCUCAAAAAUUAAAGCUAA	1162	1740-1760	UUAGCUTUAAUUUUUGAGCCUAA	1462	1738-1760
AD-288575.1	GCUCAAAAAUUAAAGCUAACA	1163	1742-1762	UGUUAGCUUUAAUUUUUGAGCCU	1463	1740-1762
AD-288576.1	UCAAAAAUUAAAGCUAACACA	1164	1744-1764	UGUGUUAGCUUUAAUUUUUGAGC	1464	1742-1764
AD-288613.1	UUCAUAUAUCCUUGGUCCCAU	1165	1701-1721	AUGGGACCAAGGAUAUAUGAAAG	1465	1699-1721
AD-288620.1	GAUGUUUAGACAAUUUUAGGU	1166	1723-1743	ACCUAAAAUUGUCUAAACAUCUC	1466	1721-1743
AD-288624.1	GGCUCAAAAAUUAAAGCUAAU	1167	1741-1761	AUUAGCTUUAAUUUUUGAGCCUA	1467	1739-1761
AD-288625.1	CUCAAAAAUUAAAGCUAACAU	1168	1743-1763	AUGUUAGCUUUAAUUUUUGAGCC	1468	1741-1763
AD-288626.1	CAAAAAUUAAAGCUAACACAU	1169	1745-1765	AUGUGUTAGCUUUAAUUUUGAG	1469	1743-1765

AD-288628.1	AAAUUAAAGCUAACACAGGAA	1170	1748-1768	UUCCUGTGUUAGCUUUAAUUUUU	1470	1746-1768
AD-288634.1	UAACACAGGAAAAGGAACUGU	1171	1758-1778	ACAGUUCCUUUUCCUGUGUUAGC	1471	1756-1778
AD-288637.1	GGAAAAGGAACUGUACUGGCU	1172	1765-1785	AGCCAGTACAGUUCCUUUUCCUG	1472	1763-1785
AD-288696.1	CAGGAAAAGGAACUGUACUGU	1175	1763-1783	ACAGUACAGUUCCUUUUCCUGUG	1475	1761-1783
AD-288698.1	AGGAACUGUACUGGCUAUUAU	1176	1770-1790	AUAAUAGCCAGUACAGUUCCUUU	1476	1768-1790
AD-288912.1	CUCCCACUACAUCAAGACUAA	1177	2189-2209	UUAGUCTUGAUGUAGUGGGAGUC	1477	2187-2209
AD-288915.1	CACUACAUCAAGACUAAUCUU	1180	2193-2213	AAGAUUAGUCUUGAUGUAGUGGG	1480	2191-2213
AD-288916.1	CUACAUCAAGACUAAUCUUGU	1181	2195-2215	ACAAGATUAGUCUUGAUGUAGUG	1481	2193-2215
AD-288933.1	GUGUUUUUCACAUGUAUUAUA	1184	2221-2241	UAUAAUACAUGUGAAAAACACAC	1484	2219-2241
AD-288937.1	UCACAUGUAUUAUAGAAUGCU	1185	2228-2248	AGCAUUCUAUAAUACAUGUGAAA	1485	2226-2248
AD-288938.1	CACAUGUAUUAUAGAAUGCUU	1186	2229-2249	AAGCAUTCUAUAAUACAUGUGAA	1486	2227-2249

AD-288948.1	CUUUUGCAUGGACUAUCCUCU	1192	2247-2267	AGAGGATAGUCCAUGCAAAAGCA	1492	2245-2267
AD-288950.1	UUGCAUGGACUAUCCUCUUGU	1193	2250-2270	ACAAGAGGAUAGUCCAUGCAAAA	1493	2248-2270
AD-288956.1	GGACUAUCCUCUUGUUUUUAU	1196	2256-2276	AUAAAAACAAGAGGAUAGUCCAU	1496	2254-2276
AD-288957.1	GACUAUCCUCUUGUUUUUAUU	1197	2257-2277	AAUAAAAACAAGAGGAUAGUCCA	1497	2255-2277
AD-288959.1	CUAUCCUCUUGUUUUUAUUAA	1198	2259-2279	UUAAUAAAAACAAGAGGAUAGUC	1498	2257-2279
AD-288981.1	CCCACUACAUCAAGACUAAUU	1199	2191-2211	AAUUAGTCUUGAUGUAGUGGGAG	1499	2189-2211
AD-288982.1	ACUACAUCAAGACUAAUCUUU	1200	2194-2214	AAAGAUTAGUCUUGAUGUAGUGG	1500	2192-2214
AD-288996.1	AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU	1201	2244-2264	AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC	1501	2242-2264

*Мишень: HSD17B13

Таблица 9

Скрининг HSD17B13 ELF7 GNA7 in vitro в концентрации 10 нМ на клектах Cos-7 (вектор с двойной люциферазой psiCHECK2)и первичных гепатоцитах обезьяны Cynomolgus

Название дуплекса	% оставшихся транскриптов человека 10 нМ	% оставшихся транскриптов человека 0,1 нМ	% оставшихся транскриптов обезьяны Cynomolgus 10 нМ	% оставшихся транскриптов обезьяны Cynomolgus 0,1 нМ
AD-286958.1	108,7	111,4	84,5	99,1
AD-287001.1	84,8	98,4	14,7	81,4
AD-287012.1	88,6	110	97,1	88,8
AD-287014.1	95,2	105,8	116,5	102,3
AD-287015.1	65,4	93,8	14,5	80,3
AD-287017.1	98,5	94,9	91,6	96,2
AD-287026.1	31,9	91	44,8	73,6
AD-287059.1	76,9	117,2	70	94,4
AD-287060.1	101,6	97,9	71,1	97,8
AD-287061.1	94,6	92,8	60,5	96,4
AD-287062.1	90,8	97,7	67,1	113,1
AD-287064.1	97	92,5	75	98,2
AD-287065.1	92,2	98,2	74,4	98
AD-287066.1	98,5	96,4	27	99,3
AD-287126.1	95,6	99,9	19,1	93,5
AD-287200.1	98,7	126,7	91,5	95,3
AD-287201.1	38,7	101,6	88,6	100,6
AD-287202.1	74,5	97,2	88,7	100,7
AD-287203.1	72,9	98,7	50,3	87,1
AD-287205.1	72,8	98	40	96,9
AD-287206.1	62,7	112,9	19,6	88,4
AD-287227.1	64,3	95	34,2	95,1
AD-287246.1	58,1	97,5	20,8	72,4
AD-287247.1	76,2	95,9	84,8	115,1
AD-287248.1	65,5	110,9	55	92

AD-287249.1	90,1	107,8	126,6	113,4
AD-287250.1	76,9	113,2	96,2	95,6
AD-287251.1	35,8	92,3	53,5	93,7
AD-287252.1	57,7	89	32,7	101,4
AD-287253.1	76,1	95	74,1	92,6
AD-287254.1	104,7	124	89,5	100,5
AD-287258.1	91,4	107,8	44,9	98,1
AD-287287.1	55,2	96,5	65,7	104,4
AD-287288.1	53,1	96,9	36	108,3
AD-287289.1	77,3	98,1	57,5	97,8
AD-287290.1	23,5	103,2	55,3	82,8
AD-287293.1	46,6	89,5	88,6	102,2
AD-287316.1	78,6	82,4	34,1	92,4
AD-287320.1	86,2	88,8	105,8	97,9
AD-287321.1	86	108,2	81,3	91
AD-287324.1	72,7	113,6	34,3	107,8
AD-287325.1	78,4	104,6	85,2	86,2
AD-287326.1	39,2	95,1	17,3	73,3
AD-287327.1	91,7	95,2	99,6	90,4
AD-287344.1	13,6	81,4	14,4	58,3
AD-287346.1	115,2	122,2	96,5	103,1
AD-287347.1	43,3	89,6	26,3	86,7
AD-287366.1	53	98,4	36,1	90,1
AD-287367.1	102,8	99,3	98,4	93,3
AD-287370.1	107,7	106,7	102,1	93,8
AD-287371.1	79,2	107	81,6	93,5
AD-287372.1	101,8	103,2	94,4	108,4
AD-287373.1	67,5	85,9	28,7	89,6
AD-287374.1	60,7	103,2	63,2	83,2
AD-287375.1	96	101	85,3	98
AD-287391.1	28,3	92	26,4	95,3
AD-287392.1	33,8	100,9	31,4	90,8
AD-287406.1	93,2	106,5	54,1	96,2
AD-287407.1	47,5	86,1	23,6	72,2

AD-287408.1	63,1	90,3	47,1	98,2
AD-287410.1	32,5	87,6	10,9	80,2
AD-287411.1	21,6	87,3	10	69,1
AD-287413.1	87,4	98,2	72,7	89,9
AD-287414.1	100,6	97,3	100,2	98,6
AD-287415.1	20,2	88,9	9,7	68,8
AD-287418.1	13,3	88,8	45,9	66,6
AD-287419.1	54,6	99,7	58,7	88
AD-287421.1	27,4	94,7	7,4	66,2
AD-287424.1	33,4	98	40,6	87,6
AD-287427.1	67,9	106,6	24,2	75,8
AD-287428.1	79,1	94,5	22,3	84,7
AD-287429.1	99,5	98,2	53,8	94,7
AD-287430.1	101,9	104	88,3	103,9
AD-287441.1	62,8	104	61,1	103,6
AD-287453.1	19,9	91,5	12,5	70,3
AD-287462.1	44,1	90,3	85,1	93,1
AD-287463.1	93,9	99,9	78,3	100,4
AD-287464.1	113	107,9	51,5	110,6
AD-287465.1	86,6	99	80,4	101,5
AD-287466.1	89,9	96,4	106,2	109,7
AD-287467.1	85,2	100,4	82,2	107,9
AD-287468.1	36,6	102,8	13,7	92,4
AD-287469.1	67,5	93,6	88,5	107,8
AD-287470.1	30	111,3	24,9	68,2
AD-287474.1	61,6	103,1	55,4	93,3
AD-287476.1	33,2	120,5	29,2	52
AD-287477.1	62,3	90,6	38,2	81,3
AD-287478.1	44	86,3	6,1	52,5
AD-287479.1	89,8	95,8	53	95,1
AD-287491.1	63,1	108,1	75,7	92,2
AD-287492.1	70,8	92,9	93,6	97,1
AD-287517.1	75,2	93,3	98	99,5
AD-287520.1	73,9	97,9	96,2	101,9

AD-287521.1	50,1	94,6	70,2	98,7
AD-287522.1	88,9	109,4	83,4	91,8
AD-287524.1	14,4	111,5	31,1	65,9
AD-287525.1	71,6	104,4	88,6	103,8
AD-287537.1	51,6	110,5	20,5	84,7
AD-287539.1	47,9	115,9	27,9	78,5
AD-287540.1	74,9	105,1	19,6	86,2
AD-287543.1	47,6	95,3	12,7	93,3
AD-287546.1	65,7	102,8	6,8	59
AD-287568.1	74,8	104,6	56,7	100,7
AD-287591.1	40	100,8	12,7	65,1
AD-287610.1	33,3	78,1	32,3	66,4
AD-287615.1	24,4	104,8	12,5	68,7
AD-287616.1	15,7	102	16,1	63,6
AD-287627.1	81,3	92,3	111,8	94,5
AD-287632.1	93,9	93,1	88,9	106,9
AD-287633.1	106,4	91,9	68,4	122,6
AD-287634.1	82,3	114,7	78,7	94,5
AD-287636.1	21,8	97,7	18,9	56,5
AD-287637.1	27,6	92,3	22,8	91,4
AD-287638.1	99	101,2	101,6	98,1
AD-287647.1	74,2	108,2	74,5	94,3
AD-287648.1	12,9	92,8	29,8	61
AD-287651.1	66,5	100,6	92,8	106,4
AD-287652.1	12,8	79,5	11,5	66,2
AD-287653.1	18,9	69,8	17,9	87,7
AD-287654.1	87,5	101	75,4	91,4
AD-287655.1	61,6	101,7	88,3	98
AD-287656.1	91,7	122,5	86,4	97,9
AD-287658.1	78,1	118,7	45	89,4
AD-287659.1	37	100,9	22,1	87,2
AD-287679.1	55,4	93,6	24,4	85,1
AD-287680.1	14,3	114,1	17,4	35,8
AD-287683.1	59	94,1	33,3	87,5

AD-287690.1	81,2	144,4	49,9	93,5
AD-287693.1	68,7	125,5	85,8	100,5
AD-287694.1	100,2	111,7	87,8	101,8
AD-287695.1	88,4	110,2	89,2	106,1
AD-287696.1	13,8	78,3	12	63,6
AD-287700.1	15,6	97	22,9	82,3
AD-287701.1	46,1	95	108,7	109,1
AD-287702.1	80,1	112,2	80,1	93,9
AD-287703.1	70,1	102,6	92,2	105,5
AD-287704.1	38,2	113,8	25,4	95,5
AD-287706.1	94,3	105	96,1	97,8
AD-287707.1	82,6	114,2	103,2	106,7
AD-287709.1	78,2	93,8	89,9	103,9
AD-287711.1	23,1	76,9	15,5	88,1
AD-287724.1	54,2	94,9	100,4	97,6
AD-287725.1	83,1	116,3	61,8	101,3
AD-287726.1	20,8	77,6	15,5	70,6
AD-287727.1	33,6	111	27,9	57,1
AD-287728.1	28,8	107	11,2	76,6
AD-287735.1	13,2	92,7	9,6	25,6
AD-287736.1	60,7	111	26,9	83,8
AD-287737.1	71,3	98,7	42,5	105,1
AD-287738.1	31,3	114,3	21,8	87,8
AD-287739.1	22,5	101,9	55	72
AD-287740.1	16,3	73,5	19	55,7
AD-287778.1	82,4	113,7	66,4	90,9
AD-287793.1	47,8	91,5	84,1	92,9
AD-287795.1	32,9	99,6	54,4	102,2
AD-287798.1	48,8	98,3	18,5	90,5
AD-287800.1	59,4	96,3	58,7	95,1
AD-287801.1	17,7	140,3	16,1	71,4
AD-287802.1	5,6	82,9	17	27,8
AD-287804.1	14,7	77,5	14,3	70,3
AD-287810.1	53,9	98,6	72,5	100,1

AD-287811.1	64,5	106	33,9	90,2
AD-287813.1	35,9	114,4	17,9	91,4
AD-287837.1	11,6	66	9,3	58
AD-287839.1	95,3	106,1	60	136,1
AD-287841.1	13,4	98,7	22,9	46,4
AD-287842.1	94,6	89,9	106,1	97,5
AD-287844.1	87,4	161,1	74	88,1
AD-287854.1	32,4	103,1	25,2	82,8
AD-287856.1	16,9	99,3	32,4	64,5
AD-287857.1	88	99,4	64,7	106,2
AD-287893.1	17,2	94,7	58,7	93,2
AD-287917.1	30,5	114,1	60	69,4
AD-287924.1	52,3	85,6	75,3	86,5
AD-287934.1	48,5	91,3	39,4	96,8
AD-287969.1	100,3	96,7	77,9	105,5
AD-287970.1	15,4	88,3	43	87,6
AD-287982.1	73,8	87,6	26,7	56,3
AD-288005.1	23,6	92,4	69,9	88,4
AD-288006.1	28,8	91,1	52,8	95,3
AD-288008.1	62,6	111,1	52	97,5
AD-288010.1	66,8	116,2	66,1	102
AD-288011.1	11,7	78	45,2	54,5
AD-288015.1	27,1	111,4	66,6	61
AD-288046.1	12,2	72,4	20,7	53,5
AD-288049.1	44,9	104,5	68,6	77,3
AD-288050.1	32,2	120,1	41,8	70,6
AD-288076.1	43,1	109,1	24,2	66,4
AD-288092.1	10,9	106,6	58,5	113,2
AD-288094.1	66,8	92,3	90,4	91,6
AD-288095.1	16,2	92,4	39	55,5
AD-288108.1	53,3	122,8	49,1	96,7
AD-288109.1	39,8	114,6	51	90,4
AD-288173.1	19,3	110,7	58,8	81,1
AD-288174.1	39	90,1	71,8	88,7

AD-288176.1	135,9	92,9	102,6	106
AD-288177.1	91,4	99,7	57,2	99,5
AD-288180.1	34,5	110	68	82
AD-288181.1	19,9	116,4	34,6	74,9
AD-288183.1	38,2	96,5	20,5	84,6
AD-288184.1	43,4	95	28,9	84,1
AD-288186.1	63,9	107,4	60,7	88
AD-288187.1	22,9	113,8	53	84,5
AD-288188.1	16,3	77,6	23,4	60,5
AD-288189.1	47,2	104,1	22,4	49,3
AD-288190.1	21,5	81,3	22,8	58,1
AD-288192.1	71,7	112,4	76,6	93,6
AD-288193.1	62,5	118,5	34	72,8
AD-288194.1	66,7	96,6	31,2	87,1
AD-288227.1	86,5	85,7	113,1	103,6
AD-288229.1	104,6	103,1	73,7	88,6
AD-288230.1	32,5	122,3	29,7	75,1
AD-288231.1	19	100,2	46,5	72,1
AD-288232.1	66,9	95,5	97	95,2
AD-288233.1	26,2	108	21,1	68,6
AD-288235.1	7,4	79,8	39,3	52,6
AD-288236.1	18,1	78,8	21,5	51,6
AD-288237.1	59,8	133,8	37,3	72,6
AD-288238.1	10,4	57,4	21,3	58,1
AD-288290.1	68,9	108,4	29,8	90,7
AD-288316.1	38	98,2	42,2	61,8
AD-288318.1	37,6	99,4	25,3	66
AD-288319.1	23,7	93,5	44,4	90,4
AD-288324.1	56,4	146,7	51,7	81,8
AD-288337.1	24,7	94,5	30	78
AD-288338.1	34,8	95,6	46,9	68,3
AD-288339.1	67,3	86,5	78,5	94
AD-288340.1	19,5	114,6	29,5	51,7
AD-288341.1	23,1	88,9	48,8	75,7

AD-288366.1	34,6	160,9	42,9	91,4
AD-288369.1	16,4	120,9	28,2	77,4
AD-288370.1	15,1	73,8	26,8	89,1
AD-288391.1	30,1	84	21,2	64,5
AD-288393.1	56	96,6	41,8	101,9
AD-288394.1	20,1	107	48,5	75,6
AD-288395.1	64	94,8	53,7	101
AD-288396.1	86	94,3	100,2	90,7
AD-288397.1	28,3	83,9	33,9	83,9
AD-288398.1	63,4	108,8	87,6	91,7
AD-288402.1	60,1	103,7	37	89,3
AD-288427.1	110,8	95,6	89,8	97,2
AD-288430.1	94,7	118,3	85,2	92,7
AD-288431.1	87,4	94,7	106,5	94,5
AD-288432.1	39	112,5	81,6	88,7
AD-288433.1	100,7	113	107,9	92,4
AD-288434.1	104,8	99,6	87,5	102,3
AD-288466.1	65	99,1	77,1	100
AD-288467.1	99,4	99,8	64,9	98,6
AD-288470.1	30,7	97,7	82,9	83,8
AD-288491.1	82,6	98,5	69,8	90,6
AD-288492.1	77	98,1	84,5	106,6
AD-288561.1	54,5	92,2	102,4	103,6
AD-288562.1	35,9	91,8	32,2	89,5
AD-288563.1	18,7	79,9	29,9	69,1
AD-288564.1	24,5	68,1	38,3	80,9
AD-288565.1	47,1	97,6	53,9	83,8
AD-288566.1	33,7	89,8	30,5	64,6
AD-288567.1	75,7	92,5	101,7	99,7
AD-288572.1	93,2	97,6	92	110,6
AD-288573.1	51,9	95	46,3	86,1
AD-288574.1	12,6	79,8	25,8	54,3
AD-288575.1	51,2	116,2	61,7	76,2
AD-288576.1	26,9	98	51,7	75

AD-288613.1	36	92,1	103,9	113,2
AD-288620.1	62,8	94,8	107	88,5
AD-288624.1	26,8	101,4	32,2	66,8
AD-288625.1	16,4	99,3	40,5	73,2
AD-288626.1	34,7	100,9	30,1	70,8
AD-288628.1	32,7	85,2	35,1	80,2
AD-288634.1	89,6	92,6	77	90,6
AD-288637.1	44,5	93,6	42,1	104
AD-288639.1	43,7	112	20,6	46,7
AD-288642.1	42,2	99,6	25,2	69,8
AD-288696.1	52,8	101,5	31,1	88
AD-288698.1	16,3	75,6	21	58,9
AD-288912.1	21,1	83,4	23,2	56,1
AD-288913.1	28,5	88	26,7	65,9
AD-288914.1	16,1	77,7	23,1	56,1
AD-288915.1	17,7	92,8	33,9	73,6
AD-288916.1	16,1	91,1	24	75,5
AD-288917.1	15,1	59,6	31	77
AD-288918.1	23,6	85,2	35,2	98,8
AD-288933.1	24,9	78,9	62,9	78,8
AD-288937.1	74,3	103,3	51,6	89,9
AD-288938.1	28,2	105,7	42,9	92,7
AD-288941.1	33,1	100	44,9	114,1
AD-288943.1	69,7	97,2	49,1	89
AD-288945.1	25,1	83,4	26,1	64,4
AD-288946.1	54	89,5	45,5	82,9
AD-288947.1	26,7	97,6	26,6	76,9
AD-288948.1	18,2	93,6	24,7	67,6
AD-288950.1	24,3	103,4	31,8	89,7
AD-288951.1	18,9	85,3	29,7	96,5
AD-288952.1	98,1	103,2	85,4	92,9
AD-288956.1	30,5	104	53	84,5
AD-288957.1	23,4	88,8	57,9	85,2
AD-288959.1	21,5	82,5	45,7	64,4

AD-288981.1	63,2	101,9	26,6	73,5
AD-288982.1	82,9	103,7	50,2	88,4
AD-288996.1	11,6	70,8	39,3	70,3

ТАБЛИЦА 10

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК HSD17B13 NONF*

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишени 5’ к 3’	SEQ ID NO:
AD-291929.1	ascsacaaggdAcdTgaaccagaauL96	1502	asdTsucdTgdGuucadGudCcuugugusasg	1797	CUACACAAGGACUGAACCAGAAG	2092
AD-291931.1	ascsaaggacdTgdAaccagaaggaL96	1503	usdCscudTcdTgguudCadGuccuugusgsu	1798	ACACAAGGACUGAACCAGAAGGA	2093
AD-291988.1	uscscuucugdCudTcugaucaccaL96	1504	usdGsgudGadTcagadAgdCagaaggasusu	1799	AAUCCUUCUGCUUCUGAUCACCA	2094
AD-291993.1	csusgcuucudGadTcaccaucauuL96	1505	asdAsugdAudGgugadTcdAgaagcagsasa	1800	UUCUGCUUCUGAUCACCAUCAUC	2095
AD-291998.1	uscsugaucadCcdAucaucuacuuL96	1506	asdAsgudAgdAugaudGgdTgaucagasasg	1801	CUUCUGAUCACCAUCAUCUACUC	2096
AD-292005.1	ascscaucaudCudAcuccuacuuuL96	1507	asdAsagdTadGgagudAgdAugauggusgsa	1802	UCACCAUCAUCUACUCCUACUUG	2097
AD-292006.1	cscsaucaucdTadCuccuacuuguL96	1508	asdCsaadGudAggagdTadGaugauggsusg	1803	CACCAUCAUCUACUCCUACUUGG	2098
AD-292007.1	csasucaucudAcdTccuacuuggaL96	1509	usdCscadAgdTaggadGudAgaugaugsgsu	1804	ACCAUCAUCUACUCCUACUUGGA	2099
AD-292008.1	asuscaucuadCudCcuacuuggauL96	1510	asdTsccdAadGuaggdAgdTagaugausgsg	1805	CCAUCAUCUACUCCUACUUGGAG	2100

AD-292010.1	csasucuacudCcdTacuuggaguuL96	1511	asdAscudCcdAaguadGgdAguagaugsasu	1806	AUCAUCUACUCCUACUUGGAGUC	2101
AD-292012.1	uscsuacuccdTadCuuggagucguL96	1512	asdCsgadCudCcaagdTadGgaguagasusg	1807	CAUCUACUCCUACUUGGAGUCGU	2102
AD-292013.1	csusacuccudAcdTuggagucguuL96	1513	asdAscgdAcdTccaadGudAggaguagsasu	1808	AUCUACUCCUACUUGGAGUCGUU	2103
AD-292014.1	usascuccuadCudTggagucguuuL96	1514	asdAsacdGadCuccadAgdTaggaguasgsa	1809	UCUACUCCUACUUGGAGUCGUUG	2104
AD-292015.1	ascsuccuacdTudGgagucguuguL96	1515	asdCsaadCgdAcuccdAadGuaggagusasg	1810	CUACUCCUACUUGGAGUCGUUGG	2105
AD-292016.1	csusccuacudTgdGagucguugguL96	1516	asdCscadAcdGacucdCadAguaggagsusa	1811	UACUCCUACUUGGAGUCGUUGGU	2106
AD-292017.1	uscscuacuudGgdAgucguugguuL96	1517	asdAsccdAadCgacudCcdAaguaggasgsu	1812	ACUCCUACUUGGAGUCGUUGGUG	2107
AD-292028.1	gsuscguuggdTgdAaguuuuucauL96	1518	asdTsgadAadAacuudCadCcaacgacsusc	1813	GAGUCGUUGGUGAAGUUUUUCAU	2108
AD-292137.1	ususgguucudGudGggauauuaauL96	1519	asdTsuadAudAucccdAcdAgaaccaasusa	1814	UAUUGGUUCUGUGGGAUAUUAAU	2109
AD-292140.1	gsusucugugdGgdAuauuaauaauL96	1520	asdTsuadTudAauaudCcdCacagaacscsa	1815	UGGUUCUGUGGGAUAUUAAUAAG	2110
AD-292143.1	csusgugggadTadTuaauaagcguL96	1521	asdCsgcdTudAuuaadTadTcccacagsasa	1816	UUCUGUGGGAUAUUAAUAAGCGC	2111

AD-292182.1	gscsugagugdCcdGaaaacuagguL96	1522	asdCscudAgdTuuucdGgdCacucagcsusg	1817	CAGCUGAGUGCCGAAAACUAGGC	2112
AD-292183.1	csusgagugcdCgdAaaacuaggcuL96	1523	asdGsccdTadGuuuudCgdGcacucagscsu	1818	AGCUGAGUGCCGAAAACUAGGCG	2113
AD-292185.1	gsasgugccgdAadAacuaggcguuL96	1524	asdAscgdCcdTaguudTudCggcacucsasg	1819	CUGAGUGCCGAAAACUAGGCGUC	2114
AD-292186.1	asgsugccgadAadAcuaggcgucaL96	1525	usdGsacdGcdCuagudTudTcggcacuscsa	1820	UGAGUGCCGAAAACUAGGCGUCA	2115
AD-292187.1	gsusgccgaadAadCuaggcgucauL96	1526	asdTsgadCgdCcuagdTudTucggcacsusc	1821	GAGUGCCGAAAACUAGGCGUCAC	2116
AD-292188.1	usgsccgaaadAcdTaggcgucacuL96	1527	asdGsugdAcdGccuadGudTuucggcascsu	1822	AGUGCCGAAAACUAGGCGUCACU	2117
AD-292189.1	gscscgaaaadCudAggcgucacuuL96	1528	asdAsgudGadCgccudAgdTuuucggcsasc	1823	GUGCCGAAAACUAGGCGUCACUG	2118
AD-292190.1	cscsgaaaacdTadGgcgucacuguL96	1529	asdCsagdTgdAcgccdTadGuuuucggscsa	1824	UGCCGAAAACUAGGCGUCACUGC	2119
AD-292238.1	csasgagaagdAgdAucuaucgcuuL96	1530	asdAsgcdGadTagaudCudCuucucugsusu	1825	AACAGAGAAGAGAUCUAUCGCUC	2120
AD-292244.1	asgsagaucudAudCgcucucuaaaL96	1531	usdTsuadGadGagcgdAudAgaucucususc	1826	GAAGAGAUCUAUCGCUCUCUAAA	2121
AD-292245.1	gsasgaucuadTcdGcucucuaaauL96	1532	asdTsuudAgdAgagcdGadTagaucucsusu	1827	AAGAGAUCUAUCGCUCUCUAAAU	2122

AD-292247.1	gsasucuaucdGcdTcucuaaaucaL96	1533	usdGsaudTudAgagadGcdGauagaucsusc	1828	GAGAUCUAUCGCUCUCUAAAUCA	2123
AD-292248.1	asuscuaucgdCudCucuaaaucauL96	1534	asdTsgadTudTagagdAgdCgauagauscsu	1829	AGAUCUAUCGCUCUCUAAAUCAG	2124
AD-292250.1	csusaucgcudCudCuaaaucagguL96	1535	asdCscudGadTuuagdAgdAgcgauagsasu	1830	AUCUAUCGCUCUCUAAAUCAGGU	2125
AD-292251.1	usasucgcucdTcdTaaaucagguuL96	1536	asdAsccdTgdAuuuadGadGagcgauasgsa	1831	UCUAUCGCUCUCUAAAUCAGGUG	2126
AD-292252.1	asuscgcucudCudAaaucaggugaL96	1537	usdCsacdCudGauuudAgdAgagcgausasg	1832	CUAUCGCUCUCUAAAUCAGGUGA	2127
AD-292253.1	uscsgcucucdTadAaucaggugaaL96	1538	usdTscadCcdTgauudTadGagagcgasusa	1833	UAUCGCUCUCUAAAUCAGGUGAA	2128
AD-292254.1	csgscucucudAadAucaggugaauL96	1539	asdTsucdAcdCugaudTudAgagagcgsasu	1834	AUCGCUCUCUAAAUCAGGUGAAG	2129
AD-292257.1	uscsucuaaadTcdAggugaagaaaL96	1540	usdTsucdTudCaccudGadTuuagagasgsc	1835	GCUCUCUAAAUCAGGUGAAGAAA	2130
AD-292309.1	asusgcugggdAcdAguauauccauL96	1541	asdTsggdAudAuacudGudCccagcaususa	1836	UAAUGCUGGGACAGUAUAUCCAG	2131
AD-292310.1	usgscugggadCadGuauauccaguL96	1542	asdCsugdGadTauacdTgdTcccagcasusu	1837	AAUGCUGGGACAGUAUAUCCAGC	2132
AD-292315.1	gsgsacaguadTadTccagccgauuL96	1543	asdAsucdGgdCuggadTadTacuguccscsa	1838	UGGGACAGUAUAUCCAGCCGAUC	2133

AD-292318.1	csasguauaudCcdAgccgaucuuuL96	1544	asdAsagdAudCggcudGgdAuauacugsusc	1839	GACAGUAUAUCCAGCCGAUCUUC	2134
AD-292344.1	ascscaaggadTgdAagagauuacuL96	1545	asdGsuadAudCucuudCadTccuuggusgsc	1840	GCACCAAGGAUGAAGAGAUUACC	2135
AD-292345.1	cscsaaggaudGadAgagauuaccaL96	1546	usdGsgudAadTcucudTcdAuccuuggsusg	1841	CACCAAGGAUGAAGAGAUUACCA	2136
AD-292346.1	csasaggaugdAadGagauuaccaaL96	1547	usdTsggdTadAucucdTudCauccuugsgsu	1842	ACCAAGGAUGAAGAGAUUACCAA	2137
AD-292363.1	cscsaagacadTudTgaggucaacaL96	1548	usdGsuudGadCcucadAadTgucuuggsusa	1843	UACCAAGACAUUUGAGGUCAACA	2138
AD-292366.1	asgsacauuudGadGgucaacaucuL96	1549	asdGsaudGudTgaccdTcdAaaugucususg	1844	CAAGACAUUUGAGGUCAACAUCC	2139
AD-292367.1	gsascauuugdAgdGucaacauccuL96	1550	asdGsgadTgdTugacdCudCaaaugucsusu	1845	AAGACAUUUGAGGUCAACAUCCU	2140
AD-292369.1	csasuuugagdGudCaacauccuauL96	1551	asdTsagdGadTguugdAcdCucaaaugsusc	1846	GACAUUUGAGGUCAACAUCCUAG	2141
AD-292370.1	asusuugaggdTcdAacauccuaguL96	1552	asdCsuadGgdAuguudGadCcucaaausgsu	1847	ACAUUUGAGGUCAACAUCCUAGG	2142
AD-292371.1	ususugaggudCadAcauccuaggaL96	1553	usdCscudAgdGaugudTgdAccucaaasusg	1848	CAUUUGAGGUCAACAUCCUAGGA	2143
AD-292373.1	usgsaggucadAcdAuccuaggacaL96	1554	usdGsucdCudAggaudGudTgaccucasasa	1849	UUUGAGGUCAACAUCCUAGGACA	2144

AD-292374.1	gsasggucaadCadTccuaggacauL96	1555	asdTsgudCcdTaggadTgdTugaccucsasa	1850	UUGAGGUCAACAUCCUAGGACAU	2145
AD-292376.1	gsgsucaacadTcdCuaggacauuuL96	1556	asdAsaudGudCcuagdGadTguugaccsusc	1851	GAGGUCAACAUCCUAGGACAUUU	2146
AD-292377.1	gsuscaacaudCcdTaggacauuuuL96	1557	asdAsaadTgdTccuadGgdAuguugacscsu	1852	AGGUCAACAUCCUAGGACAUUUU	2147
AD-292379.1	csasacauccdTadGgacauuuuugL96	1558	csdAsaadAadTguccdTadGgauguugsasc	1853	GUCAACAUCCUAGGACAUUUUUG	2148
AD-292380.1	asascauccudAgdGacauuuuuguL96	1559	asdCsaadAadAugucdCudAggauguusgsa	1854	UCAACAUCCUAGGACAUUUUUGG	2149
AD-292381.1	ascsauccuadGgdAcauuuuuggaL96	1560	usdCscadAadAaugudCcdTaggaugususg	1855	CAACAUCCUAGGACAUUUUUGGA	2150
AD-292382.1	csasuccuagdGadCauuuuuggauL96	1561	asdTsccdAadAaaugdTcdCuaggaugsusu	1856	AACAUCCUAGGACAUUUUUGGAU	2151
AD-292383.1	asusccuaggdAcdAuuuuuggauuL96	1562	asdAsucdCadAaaaudGudCcuaggausgsu	1857	ACAUCCUAGGACAUUUUUGGAUC	2152
AD-292384.1	uscscuaggadCadTuuuuggaucaL96	1563	usdGsaudCcdAaaaadTgdTccuaggasusg	1858	CAUCCUAGGACAUUUUUGGAUCA	2153
AD-292385.1	cscsuaggacdAudTuuuggaucauL96	1564	asdTsgadTcdCaaaadAudGuccuaggsasu	1859	AUCCUAGGACAUUUUUGGAUCAC	2154
AD-292388.1	asgsgacauudTudTggaucacaaaL96	1565	usdTsugdTgdAuccadAadAauguccusasg	1860	CUAGGACAUUUUUGGAUCACAAA	2155

AD-292389.1	gsgsacauuudTudGgaucacaaaaL96	1566	usdTsuudGudGauccdAadAaauguccsusa	1861	UAGGACAUUUUUGGAUCACAAAA	2156
AD-292390.1	gsascauuuudTgdGaucacaaaauL96	1567	asdTsuudTgdTgaucdCadAaaaugucscsu	1862	AGGACAUUUUUGGAUCACAAAAG	2157
AD-292394.1	ususuuuggadTcdAcaaaagcacuL96	1568	asdGsugdCudTuugudGadTccaaaaasusg	1863	CAUUUUUGGAUCACAAAAGCACU	2158
AD-292397.1	ususggaucadCadAaagcacuucuL96	1569	asdGsaadGudGcuuudTgdTgauccaasasa	1864	UUUUGGAUCACAAAAGCACUUCU	2159
AD-292398.1	usgsgaucacdAadAagcacuucuuL96	1570	asdAsgadAgdTgcuudTudGugauccasasa	1865	UUUGGAUCACAAAAGCACUUCUU	2160
AD-292399.1	gsgsaucacadAadAgcacuucuuuL96	1571	asdAsagdAadGugcudTudTgugauccsasa	1866	UUGGAUCACAAAAGCACUUCUUC	2161
AD-292403.1	csascaaaagdCadCuucuuccauuL96	1572	asdAsugdGadAgaagdTgdCuuuugugsasu	1867	AUCACAAAAGCACUUCUUCCAUC	2162
AD-292404.1	ascsaaaagcdAcdTucuuccaucuL96	1573	asdGsaudGgdAagaadGudGcuuuugusgsa	1868	UCACAAAAGCACUUCUUCCAUCG	2163
AD-292405.1	csasaaagcadCudTcuuccaucgaL96	1574	usdCsgadTgdGaagadAgdTgcuuuugsusg	1869	CACAAAAGCACUUCUUCCAUCGA	2164
AD-292406.1	asasaagcacdTudCuuccaucgauL96	1575	asdTscgdAudGgaagdAadGugcuuuusgsu	1870	ACAAAAGCACUUCUUCCAUCGAU	2165
AD-292407.1	asasagcacudTcdTuccaucgauuL96	1576	asdAsucdGadTggaadGadAgugcuususg	1871	CAAAAGCACUUCUUCCAUCGAUG	2166

AD-292408.1	asasgcacuudCudTccaucgaugaL96	1577	usdCsaudCgdAuggadAgdAagugcuususu	1872	AAAAGCACUUCUUCCAUCGAUGA	2167
AD-292409.1	asgscacuucdTudCcaucgaugauL96	1578	asdTscadTcdGauggdAadGaagugcususu	1873	AAAGCACUUCUUCCAUCGAUGAU	2168
AD-292410.1	gscsacuucudTcdCaucgaugauuL96	1579	asdAsucdAudCgaugdGadAgaagugcsusu	1874	AAGCACUUCUUCCAUCGAUGAUG	2169
AD-292434.1	asgsaaaucadTgdGccacaucguuL96	1580	asdAscgdAudGuggcdCadTgauuucuscsu	1875	AGAGAAAUCAUGGCCACAUCGUC	2170
AD-292486.1	ususccuuacdCudCaucccauauuL96	1581	asdAsuadTgdGgaugdAgdGuaaggaasusc	1876	GAUUCCUUACCUCAUCCCAUAUU	2171
AD-292487.1	uscscuuaccdTcdAucccauauuuL96	1582	asdAsaudAudGggaudGadGguaaggasasu	1877	AUUCCUUACCUCAUCCCAUAUUG	2172
AD-292492.1	ascscucaucdCcdAuauuguuccaL96	1583	usdGsgadAcdAauaudGgdGaugaggusasa	1878	UUACCUCAUCCCAUAUUGUUCCA	2173
AD-292495.1	uscsaucccadTadTuguuccagcaL96	1584	usdGscudGgdAacaadTadTgggaugasgsg	1879	CCUCAUCCCAUAUUGUUCCAGCA	2174
AD-292498.1	uscsccauaudTgdTuccagcaaauL96	1585	asdTsuudGcdTggaadCadAuaugggasusg	1880	CAUCCCAUAUUGUUCCAGCAAAU	2175
AD-292499.1	cscscauauudGudTccagcaaauuL96	1586	asdAsuudTgdCuggadAcdAauauggggsasu	1881	AUCCCAUAUUGUUCCAGCAAAUU	2176
AD-292526.1	usgsuuggcudTudCacagaggucuL96	1587	asdGsacdCudCugugdAadAgccaacasgsc	1882	GCUGUUGGCUUUCACAGAGGUCU	2177

AD-292531.1	gscsuuucacdAgdAggucugacauL96	1588	asdTsgudCadGaccudCudGugaaagcscsa	1883	UGGCUUUCACAGAGGUCUGACAU	2178
AD-292534.1	ususcacagadGgdTcugacaucauL96	1589	asdTsgadTgdTcagadCcdTcugugaasasg	1884	CUUUCACAGAGGUCUGACAUCAG	2179
AD-292536.1	csascagaggdTcdTgacaucagaaL96	1590	usdTscudGadTgucadGadCcucugugsasa	1885	UUCACAGAGGUCUGACAUCAGAA	2180
AD-292541.1	asgsgucugadCadTcagaacuucaL96	1591	usdGsaadGudTcugadTgdTcagaccuscsu	1886	AGAGGUCUGACAUCAGAACUUCA	2181
AD-292566.1	ususgggaaadAadCugguaucaaaL96	1592	usdTsugdAudAccagdTudTuucccaasgsg	1887	CCUUGGGAAAAACUGGUAUCAAA	2182
AD-292574.1	asascugguadTcdAaaaccucauuL96	1593	asdAsugdAgdGuuuudGadTaccaguususu	1888	AAAACUGGUAUCAAAACCUCAUG	2183
AD-292575.1	ascsugguaudCadAaaccucauguL96	1594	asdCsaudGadGguuudTgdAuaccagususu	1889	AAACUGGUAUCAAAACCUCAUGU	2184
AD-292576.1	csusgguaucdAadAaccucauguuL96	1595	asdAscadTgdAgguudTudGauaccagsusu	1890	AACUGGUAUCAAAACCUCAUGUC	2185
AD-292577.1	usgsguaucadAadAccucaugucuL96	1596	asdGsacdAudGaggudTudTgauaccasgsu	1891	ACUGGUAUCAAAACCUCAUGUCU	2186
AD-292578.1	gsgsuaucaadAadCcucaugucuuL96	1597	asdAsgadCadTgaggdTudTugauaccsasg	1892	CUGGUAUCAAAACCUCAUGUCUC	2187
AD-292579.1	gsusaucaaadAcdCucaugucucuL96	1598	asdGsagdAcdAugagdGudTuugauacscsa	1893	UGGUAUCAAAACCUCAUGUCUCU	2188

AD-292582.1	uscsaaaaccdTcdAugucucugcuL96	1599	asdGscadGadGacaudGadGguuuugasusa	1894	UAUCAAAACCUCAUGUCUCUGCC	2189
AD-292596.1	csuscugcccdAgdTuuuugugaauL96	1600	asdTsucdAcdAaaaadCudGggcagagsasc	1895	GUCUCUGCCCAGUUUUUGUGAAU	2190
AD-292601.1	cscscaguuudTudGugaauacuguL96	1601	asdCsagdTadTucacdAadAaacuggggscsa	1896	UGCCCAGUUUUUGUGAAUACUGG	2191
AD-292606.1	ususuuugugdAadTacuggguucaL96	1602	usdGsaadCcdCaguadTudCacaaaaascsu	1897	AGUUUUUGUGAAUACUGGGUUCA	2192
AD-292607.1	ususuugugadAudAcuggguucauL96	1603	asdTsgadAcdCcagudAudTcacaaaasasc	1898	GUUUUUGUGAAUACUGGGUUCAC	2193
AD-292610.1	usgsugaauadCudGgguucaccaaL96	1604	usdTsggdTgdAacccdAgdTauucacasasa	1899	UUUGUGAAUACUGGGUUCACCAA	2194
AD-292612.1	usgsaauacudGgdGuucaccaaaaL96	1605	usdTsuudGgdTgaacdCcdAguauucascsa	1900	UGUGAAUACUGGGUUCACCAAAA	2195
AD-292613.1	gsasauacugdGgdTucaccaaaaaL96	1606	usdTsuudTgdGugaadCcdCaguaucsasc	1901	GUGAAUACUGGGUUCACCAAAAA	2196
AD-292614.1	asasuacuggdGudTcaccaaaaauL96	1607	asdTsuudTudGgugadAcdCcaguauuscsa	1902	UGAAUACUGGGUUCACCAAAAAU	2197
AD-292615.1	asusacugggdTudCaccaaaaauuL96	1608	asdAsuudTudTggugdAadCccaguaususc	1903	GAAUACUGGGUUCACCAAAAAUC	2198
AD-292616.1	usascugggudTcdAccaaaaaucuL96	1609	asdGsaudTudTuggudGadAcccaguasusu	1904	AAUACUGGGUUCACCAAAAAUCC	2199

AD-292624.1	uscsaccaaadAadTccaagcacaaL96	1610	usdTsgudGcdTuggadTudTuuggugasasc	1905	GUUCACCAAAAAUCCAAGCACAA	2200
AD-292625.1	csasccaaaadAudCcaagcacaauL96	1611	asdTsugdTgdCuuggdAudTuuuggugsasa	1906	UUCACCAAAAAUCCAAGCACAAG	2201
AD-292629.1	asasaaauccdAadGcacaagauuaL96	1612	usdAsaudCudTgugcdTudGgauuuuusgsg	1907	CCAAAAAUCCAAGCACAAGAUUA	2202
AD-292630.1	asasaauccadAgdCacaagauuauL96	1613	asdTsaadTcdTugugdCudTggauuuususg	1908	CAAAAAUCCAAGCACAAGAUUAU	2203
AD-292631.1	asasauccaadGcdAcaagauuauuL96	1614	asdAsuadAudCuugudGcdTuggauuususu	1909	AAAAAUCCAAGCACAAGAUUAUG	2204
AD-292634.1	uscscaagcadCadAgauuauggcuL96	1615	asdGsccdAudAaucudTgdTgcuuggasusu	1910	AAUCCAAGCACAAGAUUAUGGCC	2205
AD-292638.1	asgscacaagdAudTauggccuguaL96	1616	usdAscadGgdCcauadAudCuugugcususg	1911	CAAGCACAAGAUUAUGGCCUGUA	2206
AD-292639.1	gscsacaagadTudAuggccuguauL96	1617	asdTsacdAgdGccaudAadTcuugugcsusu	1912	AAGCACAAGAUUAUGGCCUGUAU	2207
AD-292640.1	csascaagaudTadTggccuguauuL96	1618	asdAsuadCadGgccadTadAucuugugscsu	1913	AGCACAAGAUUAUGGCCUGUAUU	2208
AD-292641.1	ascsaagauudAudGgccuguauuuL96	1619	asdAsaudAcdAggccdAudAaucuugusgsc	1914	GCACAAGAUUAUGGCCUGUAUUG	2209
AD-292642.1	csasagauuadTgdGccuguauuguL96	1620	asdCsaadTadCaggcdCadTaaucuugsusg	1915	CACAAGAUUAUGGCCUGUAUUGG	2210

AD-292646.1	asusuauggcdCudGuauuggagauL96	1621	asdTscudCcdAauacdAgdGccauaauscsu	1916	AGAUUAUGGCCUGUAUUGGAGAC	2211
AD-292650.1	usgsgccugudAudTggagacagauL96	1622	asdTscudGudCuccadAudAcaggccasusa	1917	UAUGGCCUGUAUUGGAGACAGAU	2212
AD-292651.1	gsgsccuguadTudGgagacagauuL96	1623	asdAsucdTgdTcuccdAadTacaggccsasu	1918	AUGGCCUGUAUUGGAGACAGAUG	2213
AD-292652.1	gscscuguaudTgdGagacagauguaL96	1624	usdCsaudCudGucucdCadAuacaggcscsa	1919	UGGCCUGUAUUGGAGACAGAUGA	2214
AD-292667.1	asgsaugaagdTcdGuaagaagucuL96	1625	asdGsacdTudCuuacdGadCuucaucusgsu	1920	ACAGAUGAAGUCGUAAGAAGUCU	2215
AD-292668.1	gsasugaagudCgdTaagaagucuuL96	1626	asdAsgadCudTcuuadCgdAcuucaucsusg	1921	CAGAUGAAGUCGUAAGAAGUCUG	2216
AD-292671.1	gsasagucgudAadGaagucugauaL96	1627	usdAsucdAgdAcuucdTudAcgacuucsasu	1922	AUGAAGUCGUAAGAAGUCUGAUA	2217
AD-292673.1	asgsucguaadGadAgucugauagaL96	1628	usdCsuadTcdAgacudTcdTuacgacususc	1923	GAAGUCGUAAGAAGUCUGAUAGA	2218
AD-292677.1	gsusaagaagdTcdTgauagauggaL96	1629	usdCscadTcdTaucadGadCuucuuacsgsa	1924	UCGUAAGAAGUCUGAUAGAUGGA	2219
AD-292678.1	usasagaagudCudGauagauggaaL96	1630	usdTsccdAudCuaucdAgdAcuucuuascsg	1925	CGUAAGAAGUCUGAUAGAUGGAA	2220
AD-292679.1	asasgaagucdTgdAuagauggaauL96	1631	asdTsucdCadTcuaudCadGacuucuusasc	1926	GUAAGAAGUCUGAUAGAUGGAAU	2221

AD-292680.1	asgsaagucudGadTagauggaauaL96	1632	usdAsuudCcdAucuadTcdAgacuucususa	1927	UAAGAAGUCUGAUAGAUGGAAUA	2222
AD-292681.1	gsasagucugdAudAgauggaauauL96	1633	asdTsaudTcdCaucudAudCagacuucsusu	1928	AAGAAGUCUGAUAGAUGGAAUAC	2223
AD-292682.1	asasgucugadTadGauggaauacuL96	1634	asdGsuadTudCcaucdTadTcagacuuscsu	1929	AGAAGUCUGAUAGAUGGAAUACU	2224
AD-292684.1	gsuscugauadGadTggaauacuuaL96	1635	usdAsagdTadTuccadTcdTaucagacsusu	1930	AAGUCUGAUAGAUGGAAUACUUA	2225
AD-292685.1	uscsugauagdAudGgaauacuuauL96	1636	asdTsaadGudAuuccdAudCuaucagascsu	1931	AGUCUGAUAGAUGGAAUACUUAC	2226
AD-292691.1	asgsauggaadTadCuuaccaauaaL96	1637	usdTsaudTgdGuaagdTadTuccaucusasu	1932	AUAGAUGGAAUACUUACCAAUAA	2227
AD-292692.1	gsasuggaaudAcdTuaccaauaauL96	1638	asdTsuadTudGguaadGudAuuccaucsusa	1933	UAGAUGGAAUACUUACCAAUAAG	2228
AD-292693.1	asusggaauadCudTaccaauaagaL96	1639	usdCsuudAudTgguadAgdTauuccauscsu	1934	AGAUGGAAUACUUACCAAUAAGA	2229
AD-292694.1	usgsgaauacdTudAccaauaagaaL96	1640	usdTscudTadTuggudAadGuauuccasusc	1935	GAUGGAAUACUUACCAAUAAGAA	2230
AD-292695.1	gsgsaauacudTadCcaauaagaaaL96	1641	usdTsucdTudAuuggdTadAguauuccsasu	1936	AUGGAAUACUUACCAAUAAGAAA	2231
AD-292696.1	gsasauacuudAcdCaauaagaaaaL96	1642	usdTsuudCudTauugdGudAaguaucscsa	1937	UGGAAUACUUACCAAUAAGAAAA	2232

AD-292697.1	asasuacuuadCcdAauaagaaaauL96	1643	asdTsuudTcdTuauudGgdTaaguauuscsc	1938	GGAAUACUUACCAAUAAGAAAAU	2233
AD-292725.1	gsusuccaucdGudAuaucaauauuL96	1644	asdAsuadTudGauaudAcdGauggaacsasa	1939	UUGUUCCAUCGUAUAUCAAUAUC	2234
AD-292726.1	ususccaucgdTadTaucaauaucuL96	1645	asdGsaudAudTgauadTadCgauggaascsa	1940	UGUUCCAUCGUAUAUCAAUAUCU	2235
AD-292727.1	uscscaucgudAudAucaauaucuuL96	1646	asdAsgadTadTugaudAudAcgauggasasc	1941	GUUCCAUCGUAUAUCAAUAUCUU	2236
AD-292728.1	cscsaucguadTadTcaauaucuuuL96	1647	asdAsagdAudAuugadTadTacgauggsasa	1942	UUCCAUCGUAUAUCAAUAUCUUU	2237
AD-292757.1	ascsagaagudTudCuuccugaacuL96	1648	asdGsuudCadGgaagdAadAcuucugusasg	1943	CUACAGAAGUUUCUUCCUGAACG	2238
AD-292759.1	asgsaaguuudCudTccugaacgcuL96	1649	asdGscgdTudCaggadAgdAaacuucusgsu	1944	ACAGAAGUUUCUUCCUGAACGCG	2239
AD-292761.1	asasguuucudTcdCugaacgcgcuL96	1650	asdGscgdCgdTucagdGadAgaaacuuscsu	1945	AGAAGUUUCUUCCUGAACGCGCC	2240
AD-292766.1	uscsuuccugdAadCgcgccucaguL96	1651	asdCsugdAgdGcgcgdTudCaggaagasasa	1946	UUUCUUCCUGAACGCGCCUCAGC	2241
AD-292787.1	gsasuuuuaadAudCguaugcagaaL96	1652	usdTscudGcdAuacgdAudTuaaaaucsgsc	1947	GCGAUUUUAAAUCGUAUGCAGAA	2242
AD-292788.1	asusuuuaaadTcdGuaugcagaauL96	1653	asdTsucdTgdCauacdGadTuuaaaauscsg	1948	CGAUUUUAAAUCGUAUGCAGAAU	2243

AD-292789.1	ususuuaaaudCgdTaugcagaauaL96	1654	usdAsuudCudGcauadCgdAuuuaaaasusc	1949	GAUUUUAAAUCGUAUGCAGAAUA	2244
AD-292793.1	asasaucguadTgdCagaauauucaL96	1655	usdGsaadTadTucugdCadTacgauuusasa	1950	UUAAAUCGUAUGCAGAAUAUUCA	2245
AD-292795.1	asuscguaugdCadGaauauucaauL96	1656	asdTsugdAadTauucdTgdCauacgaususu	1951	AAAUCGUAUGCAGAAUAUUCAAU	2246
AD-292796.1	uscsguaugcdAgdAauauucaauuL96	1657	asdAsuudGadAuauudCudGcauacgasusu	1952	AAUCGUAUGCAGAAUAUUCAAUU	2247
AD-292797.1	csgsuaugcadGadAuauucaauuuL96	1658	asdAsaudTgdAauaudTcdTgcauacgsasu	1953	AUCGUAUGCAGAAUAUUCAAUUU	2248
AD-292800.1	asusgcagaadTadTucaauuugaaL96	1659	usdTscadAadTugaadTadTucugcausasc	1954	GUAUGCAGAAUAUUCAAUUUGAA	2249
AD-292802.1	gscsagaauadTudCaauuugaaguL96	1660	asdCsuudCadAauugdAadTauucugcsasu	1955	AUGCAGAAUAUUCAAUUUGAAGC	2250
AD-292806.1	asasuauucadAudTugaagcaguuL96	1661	asdAscudGcdTucaadAudTgaauauuscsu	1956	AGAAUAUUCAAUUUGAAGCAGUG	2251
AD-292808.1	usasuucaaudTudGaagcagugguL96	1662	asdCscadCudGcuucdAadAuugaauasusu	1957	AAUAUUCAAUUUGAAGCAGUGGU	2252
AD-292870.1	gsasuguaugdCadTgauaaugauaL96	1663	usdAsucdAudTaucadTgdCauacaucsusc	1958	GAGAUGUAUGCAUGAUAAUGAUA	2253
AD-292893.1	asasuaguuudCgdAaucaaugcuuL96	1664	asdAsgcdAudTgauudCgdAaacuauuscsa	1959	UGAAUAGUUUCGAAUCAAUGCUG	2254

AD-292906.1	csasaugcugdCadAagcuuuauuuL96	1665	asdAsaudAadAgcuudTgdCagcauugsasu	1960	AUCAAUGCUGCAAAGCUUUAUUU	2255
AD-292915.1	asasagcuuudAudTucacauuuuuL96	1666	asdAsaadAudGugaadAudAaagcuuusgsc	1961	GCAAAGCUUUAUUUCACAUUUUU	2256
AD-292935.1	asasaaacaudTgdGuuuggcacuaL96	1667	usdAsgudGcdCaaacdCadAuguuuuusasa	1962	UUAAAAACAUUGGUUUGGCACUA	2257
AD-292936.1	asasaacauudGgdTuuggcacuauL96	1668	asdTsagdTgdCcaaadCcdAauguuuususa	1963	UAAAAACAUUGGUUUGGCACUAG	2258
AD-292967.1	ascsgaacaadGadTuaauuaccuuL96	1669	asdAsggdTadAuuaadTcdTuguucgususu	1964	AAACGAACAAGAUUAAUUACCUG	2259
AD-292970.1	asascaagaudTadAuuaccugucuL96	1670	asdGsacdAgdGuaaudTadAucuuguuscsg	1965	CGAACAAGAUUAAUUACCUGUCU	2260
AD-292974.1	asgsauuaaudTadCcugucuuccuL96	1671	asdGsgadAgdAcaggdTadAuuaaucususg	1966	CAAGAUUAAUUACCUGUCUUCCU	2261
AD-292975.1	gsasuuaauudAcdCugucuuccuuL96	1672	asdAsggdAadGacagdGudAauuaaucsusu	1967	AAGAUUAAUUACCUGUCUUCCUG	2262
AD-292978.1	usasauuaccdTgdTcuuccuguuuL96	1673	asdAsacdAgdGaagadCadGguaauuasasu	1968	AUUAAUUACCUGUCUUCCUGUUU	2263
AD-292979.1	asasuuaccudGudCuuccuguuucL96	1674	gsdAsaadCadGgaagdAcdAgguaauusasa	1969	UUAAUUACCUGUCUUCCUGUUUC	2264
AD-292980.1	asusuaccugdTcdTuccuguuucuL96	1675	asdGsaadAcdAggaadGadCagguaaususa	1970	UAAUUACCUGUCUUCCUGUUUCU	2265

AD-292981.1	ususaccugudCudTccuguuucuuL96	1676	asdAsgadAadCaggadAgdAcagguaasusu	1971	AAUUACCUGUCUUCCUGUUUCUC	2266
AD-292982.1	usasccugucdTudCcuguuucucaL96	1677	usdGsagdAadAcaggdAadGacagguasasu	1972	AUUACCUGUCUUCCUGUUUCUCA	2267
AD-292983.1	ascscugucudTcdCuguuucucaaL96	1678	usdTsgadGadAacagdGadAgacaggusasa	1973	UUACCUGUCUUCCUGUUUCUCAA	2268
AD-292984.1	cscsugucuudCcdTguuucucaauL96	1679	asdTsugdAgdAaacadGgdAagacaggsusa	1974	UACCUGUCUUCCUGUUUCUCAAG	2269
AD-293027.1	gsgsucuguudTudTccuuucauguL96	1680	asdCsaudGadAaggadAadAacagaccsusa	1975	UAGGUCUGUUUUUCCUUUCAUGC	2270
AD-293028.1	gsuscuguuudTudCcuuucaugcuL96	1681	asdGscadTgdAaaggdAadAaacagacscsu	1976	AGGUCUGUUUUUCCUUUCAUGCC	2271
AD-293034.1	ususuuccuudTcdAugccucuuaaL96	1682	usdTsaadGadGgcaudGadAaggaaaasasc	1977	GUUUUUCCUUUCAUGCCUCUUAA	2272
AD-293037.1	uscscuuucadTgdCcucuuaaaaaL96	1683	usdTsuudTadAgaggdCadTgaaaggasasa	1978	UUUCCUUUCAUGCCUCUUAAAAA	2273
AD-293039.1	csusuucaugdCcdTcuuaaaaacuL96	1684	asdGsuudTudTaagadGgdCaugaaagsgsa	1979	UCCUUUCAUGCCUCUUAAAAACU	2274
AD-293099.1	ususuuuccadTudTaaaggugguaL96	1685	asdTsccdAcdCuuuadAadTggaaaaasusa	1980	UAUUUUUCCAUUUAAAGGUGGAC	2275
AD-293153.1	asascuuauudTadCacagggaaguL96	1686	asdCsuudCcdCugugdTadAauaaguuscsu	1981	AGAACUUAUUUACACAGGGAAGG	2276

AD-293156.1	ususauuuacdAcdAgggaaggu uuL96	1687	asdAsacdCudTcccudGudGuaaau aasgsu	1982	ACUUAUUUACACAG GGAAGGUUU	2277
AD-293162.1	ascsacagggdAadGguuuaagac uL96	1688	asdGsucdTudAaaccdTudCccugu gusasa	1983	UUACACAGGGAAGG UUUAAGACU	2278
AD-293163.1	csascagggadAgdGuuuaagacu uL96	1689	asdAsgudCudTaaacdCudTcccug ugsusa	1984	UACACAGGGAAGGU UUAAGACUG	2279
AD-293166.1	asgsggaaggdTudTaagacuguu uL96	1690	asdAsacdAgdTcuuadAadCcuucc cusgsu	1985	ACAGGGAAGGUUUA AGACUGUUC	2280
AD-293167.1	gsgsgaaggudTudAagacuguuc aL96	1691	usdGsaadCadGucuudAadAccuuc ccsusg	1986	CAGGGAAGGUUUAA GACUGUUCA	2281
AD-293168.1	gsgsaagguudTadAgacuguuca aL96	1692	usdTsgadAcdAgucudTadAaccuu ccscsu	1987	AGGGAAGGUUUAA GACUGUUCAA	2282
AD-293169.1	gsasagguuudAadGacuguucaa uL96	1693	asdTsugdAadCagucdTudAaaccu ucscsc	1988	GGGAAGGUUUAAG ACUGUUCAAG	2283
AD-293170.1	asasgguuuadAgdAcuguucaa guL96	1694	asdCsuudGadAcagudCudTaaacc uuscsc	1989	GGAAGGUUUAAGAC UGUUCAAGU	2284
AD-293171.1	asgsguuuaadGadCuguucaagu aL96	1695	usdAscudTgdAacagdTcdTuaaacc ususc	1990	GAAGGUUUAAGACU GUUCAAGUA	2285
AD-293172.1	gsgsuuuaagdAcdTguucaagua uL96	1696	asdTsacdTudGaacadGudCuuaaac csusu	1991	AAGGUUUAAGACUG UUCAAGUAG	2286
AD-293174.1	ususuaagacdTgdTucaaguagc aL96	1697	usdGscudAcdTugaadCadGucuua aascsc	1992	GGUUUAAGACUGUU CAAGUAGCA	2287

AD-293176.1	usasagacugdTudCaaguagcauuL96	1698	asdAsugdCudAcuugdAadCagucuuasasa	1993	UUUAAGACUGUUCAAGUAGCAUU	2288
AD-293177.1	asasgacugudTcdAaguagcauuuL96	1699	asdAsaudGcdTacuudGadAcagucuusasa	1994	UUAAGACUGUUCAAGUAGCAUUC	2289
AD-293178.1	asgsacuguudCadAguagcauucuL96	1700	asdGsaadTgdCuacudTgdAacagucususa	1995	UAAGACUGUUCAAGUAGCAUUCC	2290
AD-293179.1	gsascuguucdAadGuagcauuccaL96	1701	usdGsgadAudGcuacdTudGaacagucsusu	1996	AAGACUGUUCAAGUAGCAUUCCA	2291
AD-293180.1	ascsuguucadAgdTagcauuccaaL96	1702	usdTsggdAadTgcuadCudTgaacaguscsu	1997	AGACUGUUCAAGUAGCAUUCCAA	2292
AD-293181.1	csusguucaadGudAgcauuccaauL96	1703	asdTsugdGadAugcudAcdTugaacagsusc	1998	GACUGUUCAAGUAGCAUUCCAAU	2293
AD-293182.1	usgsuucaagdTadGcauuccaauuL96	1704	asdAsuudGgdAaugcdTadCuugaacasgsu	1999	ACUGUUCAAGUAGCAUUCCAAUC	2294
AD-293183.1	gsusucaagudAgdCauuccaaucuL96	1705	asdGsaudTgdGaaugdCudAcuugaacsasg	2000	CUGUUCAAGUAGCAUUCCAAUCU	2295
AD-293184.1	ususcaaguadGcdAuuccaaucuuL96	1706	asdAsgadTudGgaaudGcdTacuugaascsa	2001	UGUUCAAGUAGCAUUCCAAUCUG	2296
AD-293186.1	csasaguagcdAudTccaaucuguaL96	1707	usdAscadGadTuggadAudGcuacuugsasa	2002	UUCAAGUAGCAUUCCAAUCUGUA	2297
AD-293187.1	asasguagcadTudCcaaucuguauL96	1708	asdTsacdAgdAuuggdAadTgcuacuusgsa	2003	UCAAGUAGCAUUCCAAUCUGUAG	2298

AD-293191.1	asgscauuccdAadTcuguagccauL96	1709	asdTsggdCudAcagadTudGgaaugcusasc	2004	GUAGCAUUCCAAUCUGUAGCCAU	2299
AD-293218.1	gsasauaucadAcdAagaacacagaL96	1710	usdCsugdTgdTucuudGudTgauaucusug	2005	CAGAAUAUCAACAAGAACACAGA	2300
AD-293228.1	asasgaacacdAgdAaugagugcauL96	1711	asdTsgcdAcdTcauudCudGuguucuusgsu	2006	ACAAGAACACAGAAUGAGUGCAC	2301
AD-293230.1	gsasacacagdAadTgagugcacauL96	1712	asdTsgudGcdAcucadTudCugugucsusu	2007	AAGAACACAGAAUGAGUGCACAG	2302
AD-293231.1	asascacagadAudGagugcacaguL96	1713	asdCsugdTgdCacucdAudTcugguuscsu	2008	AGAACACAGAAUGAGUGCACAGC	2303
AD-293235.1	csasgaaugadGudGcacagcuaauL96	1714	asdTsuadGcdTgugcdAcdTcauucugsusg	2009	CACAGAAUGAGUGCACAGCUAAG	2304
AD-293271.1	asgsgcagcudTudAucucaaccuuL96	1715	asdAsggdTudGagaudAadAgcugccusgsc	2010	GCAGGCAGCUUUAUCUCAACCUG	2305
AD-293273.1	gscsagcuuudAudCucaaccuggaL96	1716	usdCscadGgdTugagdAudAaagcugcscsu	2011	AGGCAGCUUUAUCUCAACCUGGA	2306
AD-293306.1	ususcagcaudTudGaaagauuucuL96	1717	asdGsaadAudCuuucdAadAugcugaasusc	2012	GAUUCAGCAUUUGAAAGAUUUCC	2307
AD-293309.1	asgscauuugdAadAgauuucccuaL96	1718	usdAsggdGadAaucudTudCaaaugcusgsa	2013	UCAGCAUUUGAAAGAUUUCCCUA	2308
AD-293311.1	csasuuugaadAgdAuuucccuaguL96	1719	asdCsuadGgdGaaaudCudTucaaaugscsu	2014	AGCAUUUGAAAGAUUUCCCUAGC	2309

AD-293312.1	asusuugaaadGadTuucccuagcuL96	1720	asdGscudAgdGgaaadTcdTuucaaausgsc	2015	GCAUUUGAAAGAUUUCCCUAGCC	2310
AD-293315.1	usgsaaagaudTudCccuagccucuL96	1721	asdGsagdGcdTagggdAadAucuuucasasa	2016	UUUGAAAGAUUUCCCUAGCCUCU	2311
AD-293316.1	gsasaagauudTcdCcuagccucuuL96	1722	asdAsgadGgdCuaggdGadAaucuuucsasa	2017	UUGAAAGAUUUCCCUAGCCUCUU	2312
AD-293323.1	ususcccuagdCcdTcuuccuuuuuL96	1723	asdAsaadAgdGaagadGgdCuagggaasasu	2018	AUUUCCCUAGCCUCUUCCUUUUU	2313
AD-293353.1	asasaacggudGcdAacucuauucuL96	1724	asdGsaadTadGaguudGcdAccguuuusgsg	2019	CCAAAACGGUGCAACUCUAUUCU	2314
AD-293354.1	asasacggugdCadAcucuauucuuL96	1725	asdAsgadAudAgagudTgdCaccguuususg	2020	CAAAACGGUGCAACUCUAUUCUG	2315
AD-293355.1	asascggugcdAadCucuauucugL96	1726	asdCsagdAadTagagdTudGcaccguususu	2021	AAAACGGUGCAACUCUAUUCUGG	2316
AD-293358.1	gsgsugcaacdTcdTauucuggacuL96	1727	asdGsucdCadGaauadGadGuugcaccsgsu	2022	ACGGUGCAACUCUAUUCUGGACU	2317
AD-293359.1	gsusgcaacudCudAuucuggacuuL96	1728	asdAsgudCcdAgaaudAgdAguugcacscsg	2023	CGGUGCAACUCUAUUCUGGACUU	2318
AD-293360.1	usgscaacucdTadTucuggacuuuL96	1729	asdAsagdTcdCagaadTadGaguugcascsc	2024	GGUGCAACUCUAUUCUGGACUUU	2319
AD-293361.1	gscsaacucudAudTcuggacuuuaL96	1730	usdAsaadGudCcagadAudAgaguugcsasc	2025	GUGCAACUCUAUUCUGGACUUUA	2320

AD-293362.1	csasacucuadTudCuggacuuuauL96	1731	asdTsaadAgdTccagdAadTagagugscsa	2026	UGCAACUCUAUUCUGGACUUUAU	2321
AD-293363.1	asascucuaudTcdTggacuuuauuL96	1732	asdAsuadAadGuccadGadAuagaguusgsc	2027	GCAACUCUAUUCUGGACUUUAUU	2322
AD-293364.1	ascsucuauudCudGgacuuuauuaL96	1733	usdAsaudAadAguccdAgdAauagagususg	2028	CAACUCUAUUCUGGACUUUAUUA	2323
AD-293365.1	csuscuauucdTgdGacuuuauuauL96	1734	asdTsaadTadAagucdCadGaauagagsusu	2029	AACUCUAUUCUGGACUUUAUUAC	2324
AD-293368.1	usasuucuggdAcdTuuauuacuuuL96	1735	asdAsagdTadAuaaadGudCcagaauasgsa	2030	UCUAUUCUGGACUUUAUUACUUG	2325
AD-293369.1	asusucuggadCudTuauuacuugaL96	1736	usdCsaadGudAauaadAgdTccagaausasg	2031	CUAUUCUGGACUUUAUUACUUGA	2326
AD-293370.1	ususcuggacdTudTauuacuugauL96	1737	asdTscadAgdTaauadAadGuccagaasusa	2032	UAUUCUGGACUUUAUUACUUGAU	2327
AD-293410.1	usgsaaguccdAcdCaaaaguggauL96	1738	asdTsccdAcdTuuugdGudGgacuucasgsa	2033	UCUGAAGUCCACCAAAAGUGGAC	2328
AD-293419.1	cscsaaaagudGgdAcccucuauauL96	1739	asdTsaudAgdAgggudCcdAcuuuuggsusg	2034	CACCAAAAGUGGACCCUCUAUAU	2329
AD-293420.1	csasaaagugdGadCccucuauauuL96	1740	asdAsuadTadGagggdTcdCacuuuugsgsu	2035	ACCAAAAGUGGACCCUCUAUAUU	2330
AD-293422.1	asasaguggadCcdCucuauauuucL96	1741	gsdAsaadTadTagagdGgdTccacuuususg	2036	CAAAAGUGGACCCUCUAUAUUUC	2331

AD-293423.1	asasguggacdCcdTcuauauuucuL96	1742	asdGsaadAudAuagadGgdGuccacuususu	2037	AAAAGUGGACCCUCUAUAUUUCC	2332
AD-293530.1	csusuucauadTadTccuuggucccuL96	1743	asdGsgadCcdAaggadTadTaugaaagscsa	2038	UGCUUUCAUAUAUCCUUGGUCCC	2333
AD-293532.1	ususcauauadTcdCuuggucccauL96	1744	asdTsggdGadCcaagdGadTauaugaasasg	2039	CUUUCAUAUAUCCUUGGUCCCAG	2334
AD-293554.1	gsasuguuuadGadCaauuuuagguL96	1745	asdCscudAadAauugdTcdTaaacaucsusc	2040	GAGAUGUUUAGACAAUUUUAGGC	2335
AD-293555.1	asusguuuagdAcdAauuuuaggcuL96	1746	asdGsccdTadAaauudGudCuaaacauscsu	2041	AGAUGUUUAGACAAUUUUAGGCU	2336
AD-293557.1	gsusuuagacdAadTuuuaggcucaL96	1747	usdGsagdCcdTaaaadTudGucuaaacsasu	2042	AUGUUUAGACAAUUUUAGGCUCA	2337
AD-293558.1	ususuagacadAudTuuaggcucaaL96	1748	usdTsgadGcdCuaaadAudTgucuaaascsa	2043	UGUUUAGACAAUUUUAGGCUCAA	2338
AD-293559.1	ususagacaadTudTuaggcucaaaL96	1749	usdTsugdAgdCcuaadAadTugucuaasasc	2044	GUUUAGACAAUUUUAGGCUCAAA	2339
AD-293560.1	usasgacaaudTudTaggcucaaaaL96	1750	usdTsuudGadGccuadAadAuugucuasasa	2045	UUUAGACAAUUUUAGGCUCAAAA	2340
AD-293562.1	gsascaauuudTadGgcucaaaaauL96	1751	asdTsuudTudGagccdTadAaauugucsusa	2046	UAGACAAUUUUAGGCUCAAAAAU	2341
AD-293569.1	ususaggcucdAadAaauuaaagcuL96	1752	asdGscudTudAauuudTudGagccuaasasa	2047	UUUUAGGCUCAAAAAUUAAAGCU	2342

AD-293570.1	usasggcucadAadAauuaaagcuaL96	1753	usdAsgcdTudTaauudTudTgagccuasasa	2048	UUUAGGCUCAAAAAUUAAAGCUA	2343
AD-293571.1	asgsgcucaadAadAuuaaagcuaaL96	1754	usdTsagdCudTuaaudTudTugagccusasa	2049	UUAGGCUCAAAAAUUAAAGCUAA	2344
AD-293572.1	gsgscucaaadAadTuaaagcuaauL96	1755	asdTsuadGcdTuuaadTudTuugagccsusa	2050	UAGGCUCAAAAAUUAAAGCUAAC	2345
AD-293573.1	gscsucaaaadAudTaaagcuaacaL96	1756	usdGsuudAgdCuuuadAudTuuugagcscsu	2051	AGGCUCAAAAAUUAAAGCUAACA	2346
AD-293574.1	csuscaaaaadTudAaagcuaacauL96	1757	asdTsgudTadGcuuudAadTuuuugagscsc	2052	GGCUCAAAAAUUAAAGCUAACAC	2347
AD-293575.1	uscsaaaaaudTadAagcuaacacaL96	1758	usdGsugdTudAgcuudTadAuuuuugasgsc	2053	GCUCAAAAAUUAAAGCUAACACA	2348
AD-293576.1	csasaaaauudAadAgcuaacacauL96	1759	asdTsgudGudTagcudTudAauuuuugsasg	2054	CUCAAAAAUUAAAGCUAACACAG	2349
AD-293579.1	asasauuaaadGcdTaacacaggaaL96	1760	usdTsccdTgdTguuadGcdTuuaauuususu	2055	AAAAAUUAAAGCUAACACAGGAA	2350
AD-293586.1	asgscuaacadCadGgaaaaggaauL96	1761	asdTsucdCudTuuccdTgdTguuagcususu	2056	AAAGCUAACACAGGAAAAGGAAC	2351
AD-293589.1	usasacacagdGadAaaggaacuguL96	1762	asdCsagdTudCcuuudTcdCuguguuasgsc	2057	GCUAACACAGGAAAAGGAACUGU	2352
AD-293592.1	csascaggaadAadGgaacuguacuL96	1763	asdGsuadCadGuuccdTudTuccugugsusu	2058	AACACAGGAAAAGGAACUGUACU	2353

AD-293594.1	csasggaaaadGgdAacuguacuguL96	1764	asdCsagdTadCaguudCcdTuuuccugsusg	2059	CACAGGAAAAGGAACUGUACUGG	2354
AD-293601.1	asgsgaacugdTadCuggcuauuauL96	1765	asdTsaadTadGccagdTadCaguuccususu	2060	AAAGGAACUGUACUGGCUAUUAC	2355
AD-293602.1	gsgsaacugudAcdTggcuauuacaL96	1766	usdGsuadAudAgccadGudAcaguuccsusu	2061	AAGGAACUGUACUGGCUAUUACA	2356
AD-293872.1	csgsacucccdAcdTacaucaagauL96	1767	asdTscudTgdAuguadGudGggagucgsgsa	2062	UCCGACUCCCACUACAUCAAGAC	2357
AD-293875.1	csuscccacudAcdAucaagacuaaL96	1768	usdTsagdTcdTugaudGudAgugggagsusc	2063	GACUCCCACUACAUCAAGACUAA	2358
AD-293876.1	uscsccacuadCadTcaagacuaauL96	1769	asdTsuadGudCuugadTgdTagugggasgsu	2064	ACUCCCACUACAUCAAGACUAAU	2359
AD-293877.1	cscscacuacdAudCaagacuaauuL96	1770	asdAsuudAgdTcuugdAudGuagugggsasg	2065	CUCCCACUACAUCAAGACUAAUC	2360
AD-293878.1	cscsacuacadTcdAagacuaaucuL96	1771	asdGsaudTadGucuudGadTguaggsgsa	2066	UCCCACUACAUCAAGACUAAUCU	2361
AD-293879.1	csascuacaudCadAgacuaaucuuL96	1772	asdAsgadTudAgucudTgdAuguagugsgsg	2067	CCCACUACAUCAAGACUAAUCUU	2362
AD-293880.1	ascsuacaucdAadGacuaaucuuuL96	1773	asdAsagdAudTagucdTudGauguagusgsg	2068	CCACUACAUCAAGACUAAUCUUG	2363
AD-293881.1	csusacaucadAgdAcuaaucuugL96	1774	asdCsaadGadTuagudCudTgauguagsusg	2069	CACUACAUCAAGACUAAUCUUGU	2364

AD-293882.1	usascaucaadGadCuaaucuuguuL96	1775	asdAscadAgdAuuagdTcdTugauguasgsu	2070	ACUACAUCAAGACUAAUCUUGUU	2365
AD-293883.1	ascsaucaagdAcdTaaucuuguuuL96	1776	asdAsacdAadGauuadGudCuugaugusasg	2071	CUACAUCAAGACUAAUCUUGUUU	2366
AD-293898.1	ususgugugudTudTucacauguauL96	1777	asdTsacdAudGugaadAadAcacacaasasa	2072	UUUUGUGUGUUUUUCACAUGUAU	2367
AD-293902.1	gsusguuuuudCadCauguauuauaL96	1778	usdAsuadAudAcaugdTgdAaaaacacsasc	2073	GUGUGUUUUUCACAUGUAUUAUA	2368
AD-293909.1	uscsacaugudAudTauagaaugcuL96	1779	asdGscadTudCuauadAudAcauggasasa	2074	UUUCACAUGUAUUAUAGAAUGCU	2369
AD-293910.1	csascauguadTudAuagaaugcuuL96	1780	asdAsgcdAudTcuaudAadTacauggugsasa	2075	UUCACAUGUAUUAUAGAAUGCUU	2370
AD-293914.1	usgsuauuaudAgdAaugcuuuuguL96	1781	asdCsaadAadGcauudCudAuaauacasusg	2076	CAUGUAUUAUAGAAUGCUUUUGC	2371
AD-293915.1	gsusauuauadGadAugcuuuugcaL96	1782	usdGscadAadAgcaudTcdTauaauacsasu	2077	AUGUAUUAUAGAAUGCUUUUGCA	2372
AD-293919.1	usasuagaaudGcdTuuugcauggaL96	1783	usdCscadTgdCaaaadGcdAuucuauasasu	2078	AUUAUAGAAUGCUUUUGCAUGGA	2373
AD-293922.1	asgsaaugcudTudTgcauggacuaL96	1784	usdAsgudCcdAugcadAadAgcauucusasu	2079	AUAGAAUGCUUUUGCAUGGACUA	2374
AD-293923.1	gsasaugcuudTudGcauggacuauL96	1785	asdTsagdTcdCaugcdAadAagcauucsusa	2080	UAGAAUGCUUUUGCAUGGACUAU	2375

AD-293925.1	asusgcuuuudGcdAuggacuaucuL96	1786	asdGsaudAgdTccaudGcdAaaagcaususc	2081	GAAUGCUUUUGCAUGGACUAUCC	2376
AD-293928.1	csusuuugcadTgdGacuauccucuL96	1787	asdGsagdGadTagucdCadTgcaaaagscsa	2082	UGCUUUUGCAUGGACUAUCCUCU	2377
AD-293931.1	ususgcauggdAcdTauccucuuguL96	1788	asdCsaadGadGgauadGudCcaugcaasasa	2083	UUUUGCAUGGACUAUCCUCUUGU	2378
AD-293932.1	usgscauggadCudAuccucuuguuL96	1789	asdAscadAgdAggaudAgdTccaugcasasa	2084	UUUGCAUGGACUAUCCUCUUGUU	2379
AD-293933.1	gscsauggacdTadTccucuuguuuL96	1790	asdAsacdAadGaggadTadGuccaugcsasa	2085	UUGCAUGGACUAUCCUCUUGUUU	2380
AD-293934.1	csasuggacudAudCcucuuguuuuL96	1791	asdAsaadCadAgaggdAudAguccaugscsa	2086	UGCAUGGACUAUCCUCUUGUUUU	2381
AD-293935.1	asusggacuadTcdCucuuguuuuuL96	1792	asdAsaadAcdAagagdGadTaguccausgsc	2087	GCAUGGACUAUCCUCUUGUUUUU	2382
AD-293936.1	usgsgacuaudCcdTcuuguuuuuaL96	1793	usdAsaadAadCaagadGgdAuaguccasusg	2088	CAUGGACUAUCCUCUUGUUUUUA	2383
AD-293937.1	gsgsacuaucdCudCuuguuuuuauL96	1794	asdTsaadAadAcaagdAgdGauaguccsasu	2089	AUGGACUAUCCUCUUGUUUUUAU	2384
AD-293938.1	gsascuauccdTcdTuguuuuuauuL96	1795	asdAsuadAadAacaadGadGgauagucscsa	2090	UGGACUAUCCUCUUGUUUUUAUU	2385
AD-293940.1	csusauccucdTudGuuuuuauuaaL96	1796	usdTsaadTadAaaacdAadGaggauagsusc	2091	GACUAUCCUCUUGUUUUUAUUAA	2386

*Мишень: HSD17B13

Таблица 11

Немодифицированные последовательности ДНК HSD17B13*

Название дуплексае	Последовательность смысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Положение в NM_178135.4	Последовательность антисмысловой цепи 5’ к 3’	SEQ ID NO:	Пределы в NM_178135.4
AD-291929.1	ACACAAGGACTGAACCAGAAU	2387	25-45	ATUCTGGUUCAGUCCUUGUGUAG	2682	23-45
AD-291931.1	ACAAGGACTGAACCAGAAGGA	2388	27-47	UCCUTCTGGUUCAGUCCUUGUGU	2683	25-47
AD-291988.1	UCCUUCUGCUTCUGAUCACCA	2389	85-105	UGGUGATCAGAAGCAGAAGGAUU	2684	83-105
AD-291993.1	CUGCUUCUGATCACCAUCAUU	2390	90-110	AAUGAUGGUGATCAGAAGCAGAA	2685	88-110
AD-291998.1	UCUGAUCACCAUCAUCUACUU	2391	95-115	AAGUAGAUGAUGGTGAUCAGAAG	2686	93-115
AD-292005.1	ACCAUCAUCUACUCCUACUUU	2392	102-122	AAAGTAGGAGUAGAUGAUGGUGA	2687	100-122
AD-292006.1	CCAUCAUCTACUCCUACUUGU	2393	103-123	ACAAGUAGGAGTAGAUGAUGGUG	2688	101-123
AD-292007.1	CAUCAUCUACTCCUACUUGGA	2394	104-124	UCCAAGTAGGAGUAGAUGAUGGU	2689	102-124

AD-292008.1	AUCAUCUACUCCUACUUGGAU	2395	105-125	ATCCAAGUAGGAGTAGAUGAUGG	2690	103-125
AD-292010.1	CAUCUACUCCTACUUGGAGUU	2396	107-127	AACUCCAAGUAGGAGUAGAUGAU	2691	105-127
AD-292012.1	UCUACUCCTACUUGGAGUCGU	2397	109-129	ACGACUCCAAGTAGGAGUAGAUG	2692	107-129
AD-292013.1	CUACUCCUACTUGGAGUCGUU	2398	110-130	AACGACTCCAAGUAGGAGUAGAU	2693	108-130
AD-292014.1	UACUCCUACUTGGAGUCGUUU	2399	111-131	AAACGACUCCAAGTAGGAGUAGA	2694	109-131
AD-292015.1	ACUCCUACTUGGAGUCGUUGU	2400	112-132	ACAACGACUCCAAGUAGGAGUAG	2695	110-132
AD-292017.1	UCCUACUUGGAGUCGUUGGUU	2402	114-134	AACCAACGACUCCAAGUAGGAGU	2697	112-134
AD-292028.1	GUCGUUGGTGAAGUUUUUCAU	2403	125-145	ATGAAAAACUUCACCAACGACUC	2698	123-145
AD-292137.1	UUGGUUCUGUGGGAUAUUAAU	2404	252-272	ATUAAUAUCCCACAGAACCAAUA	2699	250-272
AD-292140.1	GUUCUGUGGGAUAUUAAUAAU	2405	255-275	ATUATUAAUAUCCCACAGAACCA	2700	253-275
AD-292143.1	CUGUGGGATATUAAUAAGCGU	2406	258-278	ACGCTUAUUAATATCCCACAGAA	2701	256-278

AD-292182.1	GCUGAGUGCCGAAAACUAGGU	2407	297-317	ACCUAGTUUUCGGCACUCAGCUG	2702	295-317
AD-292183.1	CUGAGUGCCGAAAACUAGGCU	2408	298-318	AGCCTAGUUUUCGGCACUCAGCU	2703	296-318
AD-292185.1	GAGUGCCGAAAACUAGGCGUU	2409	300-320	AACGCCTAGUUTUCGGCACUCAG	2704	298-320
AD-292186.1	AGUGCCGAAAACUAGGCGUCA	2410	301-321	UGACGCCUAGUTUTCGGCACUCA	2705	299-321
AD-292187.1	GUGCCGAAAACUAGGCGUCAU	2411	302-322	ATGACGCCUAGTUTUCGGCACUC	2706	300-322
AD-292188.1	UGCCGAAAACTAGGCGUCACU	2412	303-323	AGUGACGCCUAGUTUUCGGCACU	2707	301-323
AD-292189.1	GCCGAAAACUAGGCGUCACUU	2413	304-324	AAGUGACGCCUAGTUUUCGGCAC	2708	302-324
AD-292190.1	CCGAAAACTAGGCGUCACUGU	2414	305-325	ACAGTGACGCCTAGUUUUCGGCA	2709	303-325
AD-292238.1	CAGAGAAGAGAUCUAUCGCUU	2415	353-373	AAGCGATAGAUCUCUUCUCUGUU	2710	351-373
AD-292244.1	AGAGAUCUAUCGCUCUCUAAA	2416	359-379	UTUAGAGAGCGAUAGAUCUCUUC	2711	357-379
AD-292245.1	GAGAUCUATCGCUCUCUAAAU	2417	360-380	ATUUAGAGAGCGATAGAUCUCUU	2712	358-380

AD-292247.1	GAUCUAUCGCTCUCUAAAUCA	2418	362-382	UGAUTUAGAGAGCGAUAGAUCUC	2713	360-382
AD-292248.1	AUCUAUCGCUCUCUAAAUCAU	2419	363-383	ATGATUTAGAGAGCGAUAGAUCU	2714	361-383
AD-292250.1	CUAUCGCUCUCUAAAUCAGGU	2420	365-385	ACCUGATUUAGAGAGCGAUAGAU	2715	363-385
AD-292251.1	UAUCGCUCTCTAAAUCAGGUU	2421	366-386	AACCTGAUUUAGAGAGCGAUAGA	2716	364-386
AD-292253.1	UCGCUCUCTAAAUCAGGUGAA	2423	368-388	UTCACCTGAUUTAGAGAGCGAUA	2718	366-388
AD-292254.1	CGCUCUCUAAAUCAGGUGAAU	2424	369-389	ATUCACCUGAUTUAGAGAGCGAU	2719	367-389
AD-292257.1	UCUCUAAATCAGGUGAAGAAA	2425	372-392	UTUCTUCACCUGATUUAGAGAGC	2720	370-392
AD-292309.1	AUGCUGGGACAGUAUAUCCAU	2426	424-444	ATGGAUAUACUGUCCCAGCAUUA	2721	422-444
AD-292310.1	UGCUGGGACAGUAUAUCCAGU	2427	425-445	ACUGGATAUACTGTCCCAGCAUU	2722	423-445
AD-292315.1	GGACAGUATATCCAGCCGAUU	2428	430-450	AAUCGGCUGGATATACUGUCCCA	2723	428-450
AD-292318.1	CAGUAUAUCCAGCCGAUCUUU	2429	433-453	AAAGAUCGGCUGGAUAUACUGUC	2724	431-453

AD-292344.1	ACCAAGGATGAAGAGAUU ACU	2430	459-479	AGUAAUCUCUUCATCCUU GGUGC	2725	457-479
AD-292345.1	CCAAGGAUGAAGAGAUUA CCA	2431	460-480	UGGUAATCUCUTCAUCCU UGGUG	2726	458-480
AD-292346.1	CAAGGAUGAAGAGAUUAC CAA	2432	461-481	UTGGTAAUCUCTUCAUCCU UGGU	2727	459-481
AD-292363.1	CCAAGACATUTGAGGUCA ACA	2433	478-498	UGUUGACCUCAAATGUCU UGGUA	2728	476-498
AD-292366.1	AGACAUUUGAGGUCAACA UCU	2434	481-501	AGAUGUTGACCTCAAAUG UCUUG	2729	479-501
AD-292367.1	GACAUUUGAGGUCAACAU CCU	2435	482-502	AGGATGTUGACCUCAAAU GUCUU	2730	480-502
AD-292369.1	CAUUUGAGGUCAACAUCC UAU	2436	484-504	ATAGGATGUUGACCUCAA AUGUC	2731	482-504
AD-292370.1	AUUUGAGGTCAACAUCCU AGU	2437	485-505	ACUAGGAUGUUGACCUCA AAUGU	2732	483-505
AD-292371.1	UUUGAGGUCAACAUCCUA GGA	2438	486-506	UCCUAGGAUGUTGACCUC AAAUG	2733	484-506
AD-292373.1	UGAGGUCAACAUCCUAGG ACA	2439	488-508	UGUCCUAGGAUGUTGACC UCAAA	2734	486-508
AD-292374.1	GAGGUCAACATCCUAGGA CAU	2440	489-509	ATGUCCTAGGATGTUGACC UCAA	2735	487-509

AD-292376.1	GGUCAACATCCUAGGACAUUU	2441	491-511	AAAUGUCCUAGGATGUUGACCUC	2736	489-511
AD-292377.1	GUCAACAUCCTAGGACAUUUU	2442	492-512	AAAATGTCCUAGGAUGUUGACCU	2737	490-512
AD-292379.1	CAACAUCCTAGGACAUUUUUG	2443	494-514	CAAAAATGUCCTAGGAUGUUGAC	2738	492-514
AD-292380.1	AACAUCCUAGGACAUUUUUGU	2444	495-515	ACAAAAAUGUCCUAGGAUGUUGA	2739	493-515
AD-292381.1	ACAUCCUAGGACAUUUUUGGA	2445	496-516	UCCAAAAAUGUCCTAGGAUGUUG	2740	494-516
AD-292382.1	CAUCCUAGGACAUUUUUGGAU	2446	497-517	ATCCAAAAAUGTCCUAGGAUGUU	2741	495-517
AD-292383.1	AUCCUAGGACAUUUUUGGAUU	2447	498-518	AAUCCAAAAAUGUCCUAGGAUGU	2742	496-518
AD-292384.1	UCCUAGGACATUUUUGGAUCA	2448	499-519	UGAUCCAAAAATGTCCUAGGAUG	2743	497-519
AD-292385.1	CCUAGGACAUTUUUGGAUCAU	2449	500-520	ATGATCCAAAAAUGUCCUAGGAU	2744	498-520
AD-292388.1	AGGACAUUTUTGGAUCACAAA	2450	503-523	UTUGTGAUCCAAAAAUGUCCUAG	2745	501-523
AD-292389.1	GGACAUUUTUGGAUCACAAAA	2451	504-524	UTUUGUGAUCCAAAAAUGUCCUA	2746	502-524

AD-292390.1	GACAUUUUTGGAUCACAAAAU	2452	505-525	ATUUTGTGAUCCAAAAAUGUCCU	2747	503-525
AD-292394.1	UUUUUGGATCACAAAAGCACU	2453	509-529	AGUGCUTUUGUGATCCAAAAAUG	2748	507-529
AD-292397.1	UUGGAUCACAAAAGCACUUCU	2454	512-532	AGAAGUGCUUUTGTGAUCCAAAA	2749	510-532
AD-292398.1	UGGAUCACAAAAGCACUUCUU	2455	513-533	AAGAAGTGCUUTUGUGAUCCAAA	2750	511-533
AD-292399.1	GGAUCACAAAAGCACUUCUUU	2456	514-534	AAAGAAGUGCUTUTGUGAUCCAA	2751	512-534
AD-292403.1	CACAAAAGCACUUCUUCCAUU	2457	518-538	AAUGGAAGAAGTGCUUUUGUGAU	2752	516-538
AD-292404.1	ACAAAAGCACTUCUUCCAUCU	2458	519-539	AGAUGGAAGAAGUGCUUUUGUGA	2753	517-539
AD-292405.1	CAAAAGCACUTCUUCCAUCGA	2459	520-540	UCGATGGAAGAAGTGCUUUUGUG	2754	518-540
AD-292406.1	AAAAGCACTUCUUCCAUCGAU	2460	521-541	ATCGAUGGAAGAAGUGCUUUUGU	2755	519-541
AD-292407.1	AAAGCACUTCTUCCAUCGAUU	2461	522-542	AAUCGATGGAAGAAGUGCUUUUG	2756	520-542
AD-292409.1	AGCACUUCTUCCAUCGAUGAU	2463	524-544	ATCATCGAUGGAAGAAGUGCUUU	2758	522-544

AD-292410.1	GCACUUCUTCCAUCGAUG AUU	2464	525-545	AAUCAUCGAUGGAAGAAG UGCUU	2759	523-545
AD-292434.1	AGAAAUCATGGCCACAUC GUU	2465	549-569	AACGAUGUGGCCATGAUU UCUCU	2760	547-569
AD-292486.1	UUCCUUACCUCAUCCCAU AUU	2466	601-621	AAUATGGGAUGAGGUAAG GAAUC	2761	599-621
AD-292487.1	UCCUUACCTCAUCCCAUA UUU	2467	602-622	AAAUAUGGGAUGAGGUAA GGAAU	2762	600-622
AD-292492.1	ACCUCAUCCCAUAUUGUU CCA	2468	607-627	UGGAACAAUAUGGGAUGA GGUAA	2763	605-627
AD-292495.1	UCAUCCCATATUGUUCCA GCA	2469	610-630	UGCUGGAACAATATGGGA UGAGG	2764	608-630
AD-292498.1	UCCCAUAUTGTUCCAGCA AAU	2470	613-633	ATUUGCTGGAACAAUAUG GGAUG	2765	611-633
AD-292499.1	CCCAUAUUGUTCCAGCAA AUU	2471	614-634	AAUUTGCUGGAACAAUAU GGGAU	2766	612-634
AD-292526.1	UGUUGGCUTUCACAGAGG UCU	2472	641-661	AGACCUCUGUGAAAGCCA ACAGC	2767	639-661
AD-292531.1	GCUUUCACAGAGGUCUGA CAU	2473	646-666	ATGUCAGACCUCUGUGAA AGCCA	2768	644-666
AD-292534.1	UUCACAGAGGTCUGACAU CAU	2474	649-669	ATGATGTCAGACCTCUGUG AAAG	2769	647-669

AD-292536.1	CACAGAGGTCTGACAUCAGAA	2475	651-671	UTCUGATGUCAGACCUCUGUGAA	2770	649-671
AD-292541.1	AGGUCUGACATCAGAACUUCA	2476	656-676	UGAAGUTCUGATGTCAGACCUCU	2771	654-676
AD-292566.1	UUGGGAAAAACUGGUAUCAAA	2477	681-701	UTUGAUACCAGTUTUUCCCAAGG	2772	679-701
AD-292574.1	AACUGGUATCAAAACCUCAUU	2478	689-709	AAUGAGGUUUUGATACCAGUUUU	2773	687-709
AD-292575.1	ACUGGUAUCAAAACCUCAUGU	2479	690-710	ACAUGAGGUUUTGAUACCAGUUU	2774	688-710
AD-292576.1	CUGGUAUCAAAACCUCAUGUU	2480	691-711	AACATGAGGUUTUGAUACCAGUU	2775	689-711
AD-292577.1	UGGUAUCAAAACCUCAUGUCU	2481	692-712	AGACAUGAGGUTUTGAUACCAGU	2776	690-712
AD-292578.1	GGUAUCAAAACCUCAUGUCUU	2482	693-713	AAGACATGAGGTUTUGAUACCAG	2777	691-713
AD-292579.1	GUAUCAAAACCUCAUGUCUCU	2483	694-714	AGAGACAUGAGGUTUUGAUACCA	2778	692-714
AD-292582.1	UCAAAACCTCAUGUCUCUGCU	2484	697-717	AGCAGAGACAUGAGGUUUUGAUA	2779	695-717
AD-292596.1	CUCUGCCCAGTUUUUGUGAAU	2485	711-731	ATUCACAAAAACUGGGCAGAGAC	2780	709-731

AD-292601.1	CCCAGUUUTUGUGAAUACUGU	2486	716-736	ACAGTATUCACAAAAACUGGGCA	2781	714-736
AD-292606.1	UUUUUGUGAATACUGGGUUCA	2487	721-741	UGAACCCAGUATUCACAAAAACU	2782	719-741
AD-292607.1	UUUUGUGAAUACUGGGUUCAU	2488	722-742	ATGAACCCAGUAUTCACAAAAAC	2783	720-742
AD-292610.1	UGUGAAUACUGGGUUCACCAA	2489	725-745	UTGGTGAACCCAGTAUUCACAAA	2784	723-745
AD-292612.1	UGAAUACUGGGUUCACCAAAA	2490	727-747	UTUUGGTGAACCCAGUAUUCACA	2785	725-747
AD-292613.1	GAAUACUGGGTUCACCAAAAA	2491	728-748	UTUUTGGUGAACCCAGUAUUCAC	2786	726-748
AD-292614.1	AAUACUGGGUTCACCAAAAAU	2492	729-749	ATUUTUGGUGAACCCAGUAUUCA	2787	727-749
AD-292615.1	AUACUGGGTUCACCAAAAAUU	2493	730-750	AAUUTUTGGUGAACCCAGUAUUC	2788	728-750
AD-292616.1	UACUGGGUTCACCAAAAAUCU	2494	731-751	AGAUTUTUGGUGAACCCAGUAUU	2789	729-751
AD-292624.1	UCACCAAAAATCCAAGCACAA	2495	739-759	UTGUGCTUGGATUTUUGGUGAAC	2790	737-759
AD-292625.1	CACCAAAAAUCCAAGCACAAU	2496	740-760	ATUGTGCUUGGAUTUUUGGUGAA	2791	738-760

AD-292629.1	AAAAAUCCAAGCACAAGAUUA	2497	744-764	UAAUCUTGUGCTUGGAUUUUGG	2792	742-764
AD-292630.1	AAAAUCCAAGCACAAGAUUAU	2498	745-765	ATAATCTUGUGCUTGGAUUUUUG	2793	743-765
AD-292631.1	AAAUCCAAGCACAAGAUUAUU	2499	746-766	AAUAAUCUUGUGCTUGGAUUUUUU	2794	744-766
AD-292634.1	UCCAAGCACAAGAUUAUGGCU	2500	749-769	AGCCAUAAUCUTGTGCUUGGAUU	2795	747-769
AD-292639.1	GCACAAGATUAUGGCCUGUAU	2502	754-774	ATACAGGCCAUAATCUUGUGCUU	2797	752-774
AD-292640.1	CACAAGAUTATGGCCUGUAUU	2503	755-775	AAUACAGGCCATAAUCUUGUGCU	2798	753-775
AD-292641.1	ACAAGAUUAUGGCCUGUAUUU	2504	756-776	AAAUACAGGCCAUAAUCUUGUGC	2799	754-776
AD-292642.1	CAAGAUUATGGCCUGUAUUGU	2505	757-777	ACAATACAGGCCATAAUCUUGUG	2800	755-777
AD-292646.1	AUUAUGGCCUGUAUUGGAGAU	2506	761-781	ATCUCCAAUACAGGCCAUAAUCU	2801	759-781
AD-292650.1	UGGCCUGUAUTGGAGACAGAU	2507	765-785	ATCUGUCUCCAAUACAGGCCAUA	2802	763-785
AD-292651.1	GGCCUGUATUGGAGACAGAUU	2508	766-786	AAUCTGTCUCCAATACAGGCCAU	2803	764-786

AD-292652.1	GCCUGUAUTGGAGACAGAUGA	2509	767-787	UCAUCUGUCUCCAAUACAGGCCA	2804	765-787
AD-292667.1	AGAUGAAGTCGUAAGAAGUCU	2510	782-802	AGACTUCUUACGACUUCAUCUGU	2805	780-802
AD-292668.1	GAUGAAGUCGTAAGAAGUCUU	2511	783-803	AAGACUTCUUACGACUUCAUCUG	2806	781-803
AD-292671.1	GAAGUCGUAAGAAGUCUGAUA	2512	786-806	UAUCAGACUUCTUACGACUUCAU	2807	784-806
AD-292673.1	AGUCGUAAGAAGUCUGAUAGA	2513	788-808	UCUATCAGACUTCTUACGACUUC	2808	786-808
AD-292677.1	GUAAGAAGTCTGAUAGAUGGA	2514	792-812	UCCATCTAUCAGACUUCUUACGA	2809	790-812
AD-292678.1	UAAGAAGUCUGAUAGAUGGAA	2515	793-813	UTCCAUCUAUCAGACUUCUUACG	2810	791-813
AD-292679.1	AAGAAGUCTGAUAGAUGGAAU	2516	794-814	ATUCCATCUAUCAGACUUCUUAC	2811	792-814
AD-292680.1	AGAAGUCUGATAGAUGGAAUA	2517	795-815	UAUUCCAUCUATCAGACUUCUUA	2812	793-815
AD-292681.1	GAAGUCUGAUAGAUGGAAUAU	2518	796-816	ATAUTCCAUCUAUCAGACUUCUU	2813	794-816
AD-292682.1	AAGUCUGATAGAUGGAAUACU	2519	797-817	AGUATUCCAUCTATCAGACUUCU	2814	795-817

AD-292684.1	GUCUGAUAGATGGAAUAC UUA	2520	799-819	UAAGTATUCCATCTAUCAG ACUU	2815	797-819
AD-292685.1	UCUGAUAGAUGGAAUACU UAU	2521	800-820	ATAAGUAUUCCAUCUAUC AGACU	2816	798-820
AD-292691.1	AGAUGGAATACUUACCAA UAA	2522	806-826	UTAUTGGUAAGTATUCCA UCUAU	2817	804-826
AD-292692.1	GAUGGAAUACTUACCAAU AAU	2523	807-827	ATUATUGGUAAGUAUUCC AUCUA	2818	805-827
AD-292693.1	AUGGAAUACUTACCAAUA AGA	2524	808-828	UCUUAUTGGUAAGTAUUC CAUCU	2819	806-828
AD-292694.1	UGGAAUACTUACCAAUAA GAA	2525	809-829	UTCUTATUGGUAAGUAUU CCAUC	2820	807-829
AD-292695.1	GGAAUACUTACCAAUAAG AAA	2526	810-830	UTUCTUAUUGGTAAGUAU UCCAU	2821	808-830
AD-292696.1	GAAUACUUACCAAUAAGA AAA	2527	811-831	UTUUCUTAUUGGUAAGUA UUCCA	2822	809-831
AD-292697.1	AAUACUUACCAAUAAGAA AAU	2528	812-832	ATUUTCTUAUUGGTAAGU AUUCC	2823	810-832
AD-292725.1	GUUCCAUCGUAUAUCAAU AUU	2529	840-860	AAUATUGAUAUACGAUGG AACAA	2824	838-860
AD-292726.1	UUCCAUCGTATAUCAAUA UCU	2530	841-861	AGAUAUTGAUATACGAUG GAACA	2825	839-861

AD-292727.1	UCCAUCGUAUAUCAAUAUCUU	2531	842-862	AAGATATUGAUAUACGAUGGAAC	2826	840-862
AD-292728.1	CCAUCGUATATCAAUAUCUUU	2532	843-863	AAAGAUAUUGATATACGAUGGAA	2827	841-863
AD-292757.1	ACAGAAGUTUCUUCCUGAACU	2533	872-892	AGUUCAGGAAGAAACUUCUGUAG	2828	870-892
AD-292759.1	AGAAGUUUCUTCCUGAACGCU	2534	874-894	AGCGTUCAGGAAGAAACUUCUGU	2829	872-894
AD-292761.1	AAGUUUCUTCCUGAACGCGCU	2535	876-896	AGCGCGTUCAGGAAGAAACUUCU	2830	874-896
AD-292766.1	UCUUCCUGAACGCGCCUCAGU	2536	881-901	ACUGAGGCGCGTUCAGGAAGAAA	2831	879-901
AD-292787.1	GAUUUUAAAUCGUAUGCAGAA	2537	902-922	UTCUGCAUACGAUTUAAAAUCGC	2832	900-922
AD-292788.1	AUUUUAAATCGUAUGCAGAAU	2538	903-923	ATUCTGCAUACGATUUAAAAUCG	2833	901-923
AD-292793.1	AAAUCGUATGCAGAAUAUUCA	2540	908-928	UGAATATUCUGCATACGAUUUAA	2835	906-928
AD-292795.1	AUCGUAUGCAGAAUAUUCAAU	2541	910-930	ATUGAATAUUCTGCAUACGAUUU	2836	908-930
AD-292796.1	UCGUAUGCAGAAUAUUCAAUU	2542	911-931	AAUUGAAUAUUCUGCAUACGAUU	2837	909-931

AD-292797.1	CGUAUGCAGAAUAUUCAAUUU	2543	912-932	AAAUTGAAUAUTCTGCAUACGAU	2838	910-932
AD-292800.1	AUGCAGAATATUCAAUUUGAA	2544	915-935	UTCAAATUGAATATUCUGCAUAC	2839	913-935
AD-292802.1	GCAGAAUATUCAAUUUGAAGU	2545	917-937	ACUUCAAAUUGAATAUUCUGCAU	2840	915-937
AD-292806.1	AAUAUUCAAUTUGAAGCAGUU	2546	921-941	AACUGCTUCAAAUTGAAUAUUCU	2841	919-941
AD-292870.1	GAUGUAUGCATGAUAAUGAUA	2548	989-1009	UAUCAUTAUCATGCAUACAUCUC	2843	987-1009
AD-292893.1	AAUAGUUUCGAAUCAAUGCUU	2549	1012-1032	AAGCAUTGAUUCGAAACUAUUCA	2844	1010-1032
AD-292906.1	CAAUGCUGCAAAGCUUUAUUU	2550	1025-1045	AAAUAAAGCUUTGCAGCAUUGAU	2845	1023-1045
AD-292915.1	AAAGCUUUAUTUCACAUUUUU	2551	1034-1054	AAAAAUGUGAAAUAAAGCUUUGC	2846	1032-1054
AD-292936.1	AAAACAUUGGTUUGGCACUAU	2553	1073-1093	ATAGTGCCAAACCAAUGUUUUUA	2848	1071-1093
AD-292967.1	ACGAACAAGATUAAUUACCUU	2554	1104-1124	AAGGTAAUUAATCTUGUUCGUUU	2849	1102-1124
AD-292970.1	AACAAGAUTAAUUACCUGUCU	2555	1107-1127	AGACAGGUAAUTAAUCUUGUUCG	2850	1105-1127

AD-292974.1	AGAUUAAUTACCUGUCUUCCU	2556	1111-1131	AGGAAGACAGGTAAUUAAUCUUG	2851	1109-1131
AD-292975.1	GAUUAAUUACCUGUCUUCCUU	2557	1112-1132	AAGGAAGACAGGUAAUUAAUCUU	2852	1110-1132
AD-292978.1	UAAUUACCTGTCUUCCUGUUU	2558	1115-1135	AAACAGGAAGACAGGUAAUUAAU	2853	1113-1135
AD-292979.1	AAUUACCUGUCUUCCUGUUUC	2559	1116-1136	GAAACAGGAAGACAGGUAAUUAA	2854	1114-1136
AD-292980.1	AUUACCUGTCTUCCUGUUUCU	2560	1117-1137	AGAAACAGGAAGACAGGUAAUUA	2855	1115-1137
AD-292981.1	UUACCUGUCUTCCUGUUUCUU	2561	1118-1138	AAGAAACAGGAAGACAGGUAAUU	2856	1116-1138
AD-292982.1	UACCUGUCTUCCUGUUUCUCA	2562	1119-1139	UGAGAAACAGGAAGACAGGUAAU	2857	1117-1139
AD-292983.1	ACCUGUCUTCCUGUUUCUCAA	2563	1120-1140	UTGAGAAACAGGAAGACAGGUAA	2858	1118-1140
AD-292984.1	CCUGUCUUCCTGUUUCUCAAU	2564	1121-1141	ATUGAGAAACAGGAAGACAGGUA	2859	1119-1141
AD-293027.1	GGUCUGUUTUTCCUUUCAUGU	2565	1164-1184	ACAUGAAAGGAAAAACAGACCUA	2860	1162-1184
AD-293028.1	GUCUGUUUTUCCUUUCAUGCU	2566	1165-1185	AGCATGAAAGGAAAAACAGACCU	2861	1163-1185

AD-293034.1	UUUUCCUUTCAUGCCUCU UAA	2567	1171-1191	UTAAGAGGCAUGAAAGGA AAAAC	2862	1169-1191
AD-293037.1	UCCUUUCATGCCUCUUAA AAA	2568	1174-1194	UTUUTAAGAGGCATGAAA GGAAA	2863	1172-1194
AD-293039.1	CUUUCAUGCCTCUUAAAA ACU	2569	1176-1196	AGUUTUTAAGAGGCAUGA AAGGA	2864	1174-1196
AD-293099.1	UUUUUCCATUTAAAGGUG GAU	2570	1245-1265	ATCCACCUUUAAATGGAA AAAUA	2865	1243-1265
AD-293153.1	AACUUAUUTACACAGGGA AGU	2571	1299-1319	ACUUCCCUGUGTAAAUAA GUUCU	2866	1297-1319
AD-293156.1	UUAUUUACACAGGGAAGG UUU	2572	1302-1322	AAACCUTCCCUGUGUAAA UAAGU	2867	1300-1322
AD-293162.1	ACACAGGGAAGGUUUAAG ACU	2573	1308-1328	AGUCTUAAACCTUCCCUG UGUAA	2868	1306-1328
AD-293163.1	CACAGGGAAGGUUUAAGA CUU	2574	1309-1329	AAGUCUTAAACCUTCCCU GUGUA	2869	1307-1329
AD-293166.1	AGGGAAGGTUTAAGACUG UUU	2575	1312-1332	AAACAGTCUUAAACCUUC CCUGU	2870	1310-1332
AD-293167.1	GGGAAGGUTUAAGACUGU UCA	2576	1313-1333	UGAACAGUCUUAAACCUU CCCUG	2871	1311-1333
AD-293168.1	GGAAGGUUTAAGACUGUU CAA	2577	1314-1334	UTGAACAGUCUTAAACCU UCCCU	2872	1312-1334

AD-293169.1	GAAGGUUUAAGACUGUUCAAU	2578	1315-1335	ATUGAACAGUCTUAAACCUUCCC	2873	1313-1335
AD-293170.1	AAGGUUUAAGACUGUUCAAGU	2579	1316-1336	ACUUGAACAGUCUTAAACCUUCC	2874	1314-1336
AD-293171.1	AGGUUUAAGACUGUUCAAGUA	2580	1317-1337	UACUTGAACAGTCTUAAACCUUC	2875	1315-1337
AD-293172.1	GGUUUAAGACTGUUCAAGUAU	2581	1318-1338	ATACTUGAACAGUCUUAAACCUU	2876	1316-1338
AD-293174.1	UUUAAGACTGTUCAAGUAGCA	2582	1320-1340	UGCUACTUGAACAGUCUUAAACC	2877	1318-1340
AD-293177.1	AAGACUGUTCAAGUAGCAUUU	2584	1323-1343	AAAUGCTACUUGAACAGUCUUAA	2879	1321-1343
AD-293178.1	AGACUGUUCAAGUAGCAUUCU	2585	1324-1344	AGAATGCUACUTGAACAGUCUUA	2880	1322-1344
AD-293179.1	GACUGUUCAAGUAGCAUUCCA	2586	1325-1345	UGGAAUGCUACTUGAACAGUCUU	2881	1323-1345
AD-293180.1	ACUGUUCAAGTAGCAUUCCAA	2587	1326-1346	UTGGAATGCUACUTGAACAGUCU	2882	1324-1346
AD-293181.1	CUGUUCAAGUAGCAUUCCAAU	2588	1327-1347	ATUGGAAUGCUACTUGAACAGUC	2883	1325-1347
AD-293182.1	UGUUCAAGTAGCAUUCCAAUU	2589	1328-1348	AAUUGGAAUGCTACUUGAACAGU	2884	1326-1348

AD-293183.1	GUUCAAGUAGCAUUCCAAUCU	2590	1329-1349	AGAUTGGAAUGCUACUUGAACAG	2885	1327-1349
AD-293184.1	UUCAAGUAGCAUUCCAAUCUU	2591	1330-1350	AAGATUGGAAUGCTACUUGAACA	2886	1328-1350
AD-293186.1	CAAGUAGCAUTCCAAUCUGUA	2592	1332-1352	UACAGATUGGAAUGCUACUUGAA	2887	1330-1352
AD-293187.1	AAGUAGCATUCCAAUCUGUAU	2593	1333-1353	ATACAGAUUGGAATGCUACUUGA	2888	1331-1353
AD-293191.1	AGCAUUCCAATCUGUAGCCAU	2594	1337-1357	ATGGCUACAGATUGGAAUGCUAC	2889	1335-1357
AD-293218.1	GAAUAUCAACAAGAACACAGA	2595	1364-1384	UCUGTGTUCUUGUTGAUAUUCUG	2890	1362-1384
AD-293228.1	AAGAACACAGAAUGAGUGCAU	2596	1374-1394	ATGCACTCAUUCUGUGUUCUUGU	2891	1372-1394
AD-293230.1	GAACACAGAATGAGUGCACAU	2597	1376-1396	ATGUGCACUCATUCUGUGUUCUU	2892	1374-1396
AD-293231.1	AACACAGAAUGAGUGCACAGU	2598	1377-1397	ACUGTGCACUCAUTCUGUGUUCU	2893	1375-1397
AD-293235.1	CAGAAUGAGUGCACAGCUAAU	2599	1381-1401	ATUAGCTGUGCACTCAUUCUGUG	2894	1379-1401
AD-293271.1	AGGCAGCUTUAUCUCAACCUU	2600	1417-1437	AAGGTUGAGAUAAAGCUGCCUGC	2895	1415-1437

AD-293273.1	GCAGCUUUAUCUCAACCUGGA	2601	1419-1439	UCCAGGTUGAGAUAAAGCUGCCU	2896	1417-1439
AD-293306.1	UUCAGCAUTUGAAAGAUUUCU	2602	1452-1472	AGAAAUCUUUCAAAUGCUGAAUC	2897	1450-1472
AD-293309.1	AGCAUUUGAAAGAUUUCCCUA	2603	1455-1475	UAGGGAAAUCUTUCAAAUGCUGA	2898	1453-1475
AD-293311.1	CAUUUGAAAGAUUUCCCUAGU	2604	1457-1477	ACUAGGGAAAUCUTUCAAAUGCU	2899	1455-1477
AD-293312.1	AUUUGAAAGATUUCCCUAGCU	2605	1458-1478	AGCUAGGGAAATCTUUCAAAUGC	2900	1456-1478
AD-293315.1	UGAAAGAUTUCCCUAGCCUCU	2606	1461-1481	AGAGGCTAGGGAAAUCUUUCAAA	2901	1459-1481
AD-293323.1	UUCCCUAGCCTCUUCCUUUUU	2608	1469-1489	AAAAAGGAAGAGGCUAGGGAAAU	2903	1467-1489
AD-293353.1	AAAACGGUGCAACUCUAUUCU	2609	1499-1519	AGAATAGAGUUGCACCGUUUUGG	2904	1497-1519
AD-293354.1	AAACGGUGCAACUCUAUUCUU	2610	1500-1520	AAGAAUAGAGUTGCACCGUUUUG	2905	1498-1520
AD-293355.1	AACGGUGCAACUCUAUUCUGU	2611	1501-1521	ACAGAATAGAGTUGCACCGUUUU	2906	1499-1521
AD-293359.1	GUGCAACUCUAUUCUGGACUU	2613	1505-1525	AAGUCCAGAAUAGAGUUGCACCG	2908	1503-1525

AD-293360.1	UGCAACUCTATUCUGGACUUU	2614	1506-1526	AAAGTCCAGAATAGAGUUGCACC	2909	1504-1526
AD-293361.1	GCAACUCUAUTCUGGACUUUA	2615	1507-1527	UAAAGUCCAGAAUAGAGUUGCAC	2910	1505-1527
AD-293362.1	CAACUCUATUCUGGACUUUAU	2616	1508-1528	ATAAAGTCCAGAATAGAGUUGCA	2911	1506-1528
AD-293364.1	ACUCUAUUCUGGACUUUAUUA	2618	1510-1530	UAAUAAAGUCCAGAAUAGAGUUG	2913	1508-1530
AD-293365.1	CUCUAUUCTGGACUUUAUUAU	2619	1511-1531	ATAATAAAGUCCAGAAUAGAGUU	2914	1509-1531
AD-293368.1	UAUUCUGGACTUUAUUACUUU	2620	1514-1534	AAAGTAAUAAAGUCCAGAAUAGA	2915	1512-1534
AD-293369.1	AUUCUGGACUTUAUUACUUGA	2621	1515-1535	UCAAGUAAUAAAGTCCAGAAUAG	2916	1513-1535
AD-293370.1	UUCUGGACTUTAUUACUUGAU	2622	1516-1536	ATCAAGTAAUAAAGUCCAGAAUA	2917	1514-1536
AD-293410.1	UGAAGUCCACCAAAAGUGGAU	2623	1556-1576	ATCCACTUUUGGUGGACUUCAGA	2918	1554-1576
AD-293419.1	CCAAAAGUGGACCCUCUAUAU	2624	1565-1585	ATAUAGAGGGUCCACUUUUGGUG	2919	1563-1585
AD-293420.1	CAAAAGUGGACCCUCUAUAUU	2625	1566-1586	AAUATAGAGGGTCCACUUUUGGU	2920	1564-1586

AD-293422.1	AAAGUGGACCCUCUAUAUUUC	2626	1568-1588	GAAATATAGAGGGTCCACUUUUG	2921	1566-1588
AD-293423.1	AAGUGGACCCTCUAUAUUUCU	2627	1569-1589	AGAAAUAUAGAGGGUCCACUUUU	2922	1567-1589
AD-293530.1	CUUUCAUATATCCUUGGUCCU	2628	1699-1719	AGGACCAAGGATATAUGAAAGCA	2923	1697-1719
AD-293532.1	UUCAUAUATCCUUGGUCCCAU	2629	1701-1721	ATGGGACCAAGGATAUAUGAAAG	2924	1699-1721
AD-293554.1	GAUGUUUAGACAAUUUUAGGU	2630	1723-1743	ACCUAAAAUUGTCTAAACAUCUC	2925	1721-1743
AD-293555.1	AUGUUUAGACAAUUUUAGGCU	2631	1724-1744	AGCCTAAAAUUGUCUAAACAUCU	2926	1722-1744
AD-293557.1	GUUUAGACAATUUUAGGCUCA	2632	1726-1746	UGAGCCTAAAATUGUCUAAACAU	2927	1724-1746
AD-293558.1	UUUAGACAAUTUUAGGCUCAA	2633	1727-1747	UTGAGCCUAAAAUTGUCUAAACA	2928	1725-1747
AD-293559.1	UUAGACAATUTUAGGCUCAAA	2634	1728-1748	UTUGAGCCUAAAATUGUCUAAAC	2929	1726-1748
AD-293560.1	UAGACAAUTUTAGGCUCAAAA	2635	1729-1749	UTUUGAGCCUAAAAUUGUCUAAA	2930	1727-1749
AD-293562.1	GACAAUUUTAGGCUCAAAAAU	2636	1731-1751	ATUUTUGAGCCTAAAAUUGUCUA	2931	1729-1751

AD-293569.1	UUAGGCUCAAAAAUUAAAGCU	2637	1738-1758	AGCUTUAAUUUTUGAGCCUAAAA	2932	1736-1758
AD-293570.1	UAGGCUCAAAAAUUAAAGCUA	2638	1739-1759	UAGCTUTAAUUTUTGAGCCUAAA	2933	1737-1759
AD-293571.1	AGGCUCAAAAAUUAAAGCUAA	2639	1740-1760	UTAGCUTUAAUTUTUGAGCCUAA	2934	1738-1760
AD-293572.1	GGCUCAAAAATUAAAGCUAAU	2640	1741-1761	ATUAGCTUUAATUTUUGAGCCUA	2935	1739-1761
AD-293573.1	GCUCAAAAAUTAAAGCUAACA	2641	1742-1762	UGUUAGCUUUAAUTUUUGAGCCU	2936	1740-1762
AD-293574.1	CUCAAAAATUAAAGCUAACAU	2642	1743-1763	ATGUTAGCUUUAATUUUUGAGCC	2937	1741-1763
AD-293575.1	UCAAAAAUTAAAGCUAACACA	2643	1744-1764	UGUGTUAGCUUTAAUUUUUGAGC	2938	1742-1764
AD-293576.1	CAAAAAUUAAAGCUAACACAU	2644	1745-1765	ATGUGUTAGCUTUAAUUUUUGAG	2939	1743-1765
AD-293579.1	AAAUUAAAGCTAACACAGGAA	2645	1748-1768	UTCCTGTGUUAGCTUUAAUUUUU	2940	1746-1768
AD-293586.1	AGCUAACACAGGAAAAGGAAU	2646	1755-1775	ATUCCUTUUCCTGTGUUAGCUUU	2941	1753-1775
AD-293589.1	UAACACAGGAAAAGGAACUGU	2647	1758-1778	ACAGTUCCUUUTCCUGUGUUAGC	2942	1756-1778

AD-293592.1	CACAGGAAAAGGAACUGUACU	2648	1761-1781	AGUACAGUUCCTUTUCCUGUGUU	2943	1759-1781
AD-293594.1	CAGGAAAAGGAACUGUACUGU	2649	1763-1783	ACAGTACAGUUCCTUUUCCUGUG	2944	1761-1783
AD-293601.1	AGGAACUGTACUGGCUAUUAU	2650	1770-1790	ATAATAGCCAGTACAGUUCCUUU	2945	1768-1790
AD-293872.1	CGACUCCCACTACAUCAAGAU	2652	2186-2206	ATCUTGAUGUAGUGGGAGUCGGA	2947	2184-2206
AD-293875.1	CUCCCACUACAUCAAGACUAA	2653	2189-2209	UTAGTCTUGAUGUAGUGGGAGUC	2948	2187-2209
AD-293876.1	UCCCACUACATCAAGACUAAU	2654	2190-2210	ATUAGUCUUGATGTAGUGGGAGU	2949	2188-2210
AD-293877.1	CCCACUACAUCAAGACUAAUU	2655	2191-2211	AAUUAGTCUUGAUGUAGUGGGAG	2950	2189-2211
AD-293878.1	CCACUACATCAAGACUAAUCU	2656	2192-2212	AGAUTAGUCUUGATGUAGUGGGA	2951	2190-2212
AD-293879.1	CACUACAUCAAGACUAAUCUU	2657	2193-2213	AAGATUAGUCUTGAUGUAGUGGG	2952	2191-2213
AD-293880.1	ACUACAUCAAGACUAAUCUUU	2658	2194-2214	AAAGAUTAGUCTUGAUGUAGUGG	2953	2192-2214
AD-293881.1	CUACAUCAAGACUAAUCUUGU	2659	2195-2215	ACAAGATUAGUCUTGAUGUAGUG	2954	2193-2215

AD-293882.1	UACAUCAAGACUAAUCUUGUU	2660	2196-2216	AACAAGAUUAGTCTUGAUGUAGU	2955	2194-2216
AD-293898.1	UUGUGUGUTUTUCACAUGUAU	2662	2217-2237	ATACAUGUGAAAAACACACAAAA	2957	2215-2237
AD-293902.1	GUGUUUUUCACAUGUAUUAUA	2663	2221-2241	UAUAAUACAUGTGAAAAACACAC	2958	2219-2241
AD-293909.1	UCACAUGUAUTAUAGAAUGCU	2664	2228-2248	AGCATUCUAUAAUACAUGUGAAA	2959	2226-2248
AD-293910.1	CACAUGUATUAUAGAAUGCUU	2665	2229-2249	AAGCAUTCUAUAATACAUGUGAA	2960	2227-2249
AD-293914.1	UGUAUUAUAGAAUGCUUUUGU	2666	2233-2253	ACAAAAGCAUUCUAUAAUACAUG	2961	2231-2253
AD-293915.1	GUAUUAUAGAAUGCUUUUGCA	2667	2234-2254	UGCAAAAGCAUTCTAUAAUACAU	2962	2232-2254
AD-293919.1	UAUAGAAUGCTUUUGCAUGGA	2668	2238-2258	UCCATGCAAAAGCAUUCUAUAAU	2963	2236-2258
AD-293923.1	GAAUGCUUTUGCAUGGACUAU	2670	2242-2262	ATAGTCCAUGCAAAAGCAUUCUA	2965	2240-2262
AD-293925.1	AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU	2671	2244-2264	AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC	2966	2242-2264
AD-293928.1	CUUUUGCATGGACUAUCCUCU	2672	2247-2267	AGAGGATAGUCCATGCAAAAGCA	2967	2245-2267

AD-293931.1	UUGCAUGGACTAUCCUCUUGU	2673	2250-2270	ACAAGAGGAUAGUCCAUGCAAAA	2968	2248-2270
AD-293932.1	UGCAUGGACUAUCCUCUUGUU	2674	2251-2271	AACAAGAGGAUAGTCCAUGCAAA	2969	2249-2271
AD-293933.1	GCAUGGACTATCCUCUUGUUU	2675	2252-2272	AAACAAGAGGATAGUCCAUGCAA	2970	2250-2272
AD-293934.1	CAUGGACUAUCCUCUUGUUUU	2676	2253-2273	AAAACAAGAGGAUAGUCCAUGCA	2971	2251-2273
AD-293935.1	AUGGACUATCCUCUUGUUUUU	2677	2254-2274	AAAAACAAGAGGATAGUCCAUGC	2972	2252-2274
AD-293936.1	UGGACUAUCCTCUUGUUUUUA	2678	2255-2275	UAAAAACAAGAGGAUAGUCCAUG	2973	2253-2275
AD-293937.1	GGACUAUCCUCUUGUUUUUAU	2679	2256-2276	ATAAAAACAAGAGGAUAGUCCAU	2974	2254-2276
AD-293938.1	GACUAUCCTCTUGUUUUUAUU	2680	2257-2277	AAUAAAAACAAGAGGAUAGUCCA	2975	2255-2277
AD-293940.1	CUAUCCUCTUGUUUUUAUUAA	2681	2259-2279	UTAATAAAAACAAGAGGAUAGUC	2976	2257-2279

*Мишень: HSD17B13

Таблица 12

Скрининг ДНК HSD17B13 NonF in vitro в концентрации 10 нМ на клетках Cos-7 (вектор двойной люциферазой psiCHECK2) и первичных гепатоцитах обезьяны Cynomolgus

Название дуплекса	% оставшихся транскриптов человека 10 нМ	% оставшихся транскриптов человека 0,1 нМ	% оставшихся транскриптов обезьяны Cynomolgus 10 нМ	% оставшихся транскриптов обезьяны Cynomolgus 0,1 нМ
AD-291929.1	71,9	80,9	83,6	83,4
AD-291931.1	110,8	84,8	100,1	97,8
AD-291988.1	78,0	104,0	65,3	97,3
AD-291993.1	102,1	100,5	78,9	69,1
AD-291998.1	81,6	97,4	26,3	60,9
AD-292005.1	101,3	93,7	69,2	74,9
AD-292006.1	45,7	93,2	58,7	81,7
AD-292007.1	130,7	101,5	62,4	100,0
AD-292008.1	99,4	102,4	63,7	91,3
AD-292010.1	72,6	87,1	49,5	95,8
AD-292012.1	79,5	83,6	86,8	86,3
AD-292013.1	61,3	94,1	45,2	83,9
AD-292014.1	50,0	87,4	40,0	40,1
AD-292015.1	44,9	88,2	31,6	78,8
AD-292016.1	52,6	84,2	48,2	90,8
AD-292017.1	43,8	86,8	54,8	96,7
AD-292028.1	77,4	88,2	107,2	91,5
AD-292137.1	96,9	83,6	105,7	103,9

AD-292140.1	30,6	95,0	26,3	59,0
AD-292143.1	38,4	79,3	33,9	85,3
AD-292182.1	127,2	99,8	91,8	71,1
AD-292183.1	95,2	91,8	102,5	87,6
AD-292185.1	50,6	91,7	74,5	93,3
AD-292186.1	48,6	95,0	81,3	85,6
AD-292187.1	90,1	89,5	82,7	95,5
AD-292188.1	53,1	99,0	42,5	81,8
AD-292189.1	103,9	78,7	73,2	104,0
AD-292190.1	67,5	81,6	105,5	81,9
AD-292238.1	40,6	86,1	71,7	86,6
AD-292244.1	92,8	78,7	116,0	91,8
AD-292245.1	62,2	75,2	55,5	97,0
AD-292247.1	51,0	84,4	63,4	87,5
AD-292248.1	77,4	104,3	51,0	94,8
AD-292250.1	31,0	85,4	44,9	92,2
AD-292251.1	45,7	91,0	74,1	90,6
AD-292252.1	60,0	83,4	88,6	102,1
AD-292253.1	29,1	121,4	35,3	75,7
AD-292254.1	50,1	94,7	32,3	62,3
AD-292257.1	54,9	96,3	57,6	84,8
AD-292309.1	93,2	108,1	93,4	87,1

AD-292310.1	94,4	101,0	87,9	101,6
AD-292315.1	86,1	88,8	62,9	90,8
AD-292318.1	67,1	105,0	85,3	85,5
AD-292344.1	36,1	91,7	33,0	53,0
AD-292345.1	68,5	88,1	81,9	106,0
AD-292346.1	38,8	80,4	63,7	66,2
AD-292363.1	85,2	76,8	96,0	101,8
AD-292366.1	75,3	82,9	100,2	107,5
AD-292367.1	86,9	70,2	97,0	113,8
AD-292369.1	96,6	88,6	91,3	91,6
AD-292370.1	44,8	84,8	59,7	88,9
AD-292371.1	47,1	76,8	78,3	96,3
AD-292373.1	83,4	79,9	32,3	128,5
AD-292374.1	126,7	92,9	78,8	98,5
AD-292376.1	63,8	89,3	73,9	87,3
AD-292377.1	47,5	79,9	49,7	77,6
AD-292379.1	92,9	99,8	99,0	86,5
AD-292380.1	69,1	82,6	46,5	70,2
AD-292381.1	30,1	73,4	58,1	95,4
AD-292382.1	42,1	86,7	87,3	97,4
AD-292383.1	18,7	69,7	47,1	41,7
AD-292384.1	27,4	83,2	36,6	83,8

AD-292385.1	59,5	107,0	51,1	115,1
AD-292388.1	33,9	80,2	37,4	51,4
AD-292389.1	54,9	90,8	79,0	92,4
AD-292390.1	43,4	81,4	49,8	82,4
AD-292394.1	20,8	74,8	56,3	57,0
AD-292397.1	87,6	80,3	56,8	79,6
AD-292398.1	25,3	84,3	21,9	56,5
AD-292399.1	43,1	84,4	26,6	61,1
AD-292403.1	75,2	91,7	19,6	59,7
AD-292404.1	99,9	89,7	68,5	70,8
AD-292405.1	65,8	93,2	39,0	49,5
AD-292406.1	77,3	70,4	89,7	96,8
AD-292407.1	47,4	91,5	64,1	50,3
AD-292408.1	67,3	102,5	72,1	89,8
AD-292409.1	47,3	84,2	88,6	91,7
AD-292410.1	90,3	89,2	50,5	94,3
AD-292434.1	109,2	85,6	97,7	118,1
AD-292486.1	87,6	93,4	81,4	70,9
AD-292487.1	71,1	91,4	83,5	101,3
AD-292492.1	55,7	89,0	83,1	104,7
AD-292495.1	74,2	87,6	39,8	89,4
AD-292498.1	59,5	94,1	48,3	102,0

AD-292499.1	40,6	95,4	36,7	69,9
AD-292526.1	82,6	90,8	66,4	71,7
AD-292531.1	95,5	81,2	100,4	110,5
AD-292534.1	78,2	88,3	60,2	76,1
AD-292536.1	55,9	90,9	43,0	82,7
AD-292541.1	88,3	74,4	27,8	41,9
AD-292566.1	19,9	72,5	13,2	52,6
AD-292574.1	24,4	71,6	26,1	73,5
AD-292575.1	65,6	81,9	77,2	81,2
AD-292576.1	16,5	80,7	28,5	43,3
AD-292577.1	43,3	95,8	25,8	68,5
AD-292578.1	23,4	58,8	15,6	68,8
AD-292579.1	39,4	80,5	18,5	81,3
AD-292582.1	53,7	89,0	56,3	96,1
AD-292596.1	71,7	90,7	34,6	78,4
AD-292601.1	80,9	103,8	83,1	101,7
AD-292606.1	72,8	93,1	71,1	110,5
AD-292607.1	64,0	94,9	96,3	81,4
AD-292610.1	76,6	83,1	88,3	90,3
AD-292612.1	52,9	81,4	66,2	81,5
AD-292613.1	27,9	79,6	53,3	96,2
AD-292614.1	51,4	92,8	87,1	96,4

AD-292615.1	75,1	88,2	92,9	108,1
AD-292616.1	73,9	90,6	90,3	85,7
AD-292624.1	54,2	97,1	59,3	99,4
AD-292625.1	28,1	83,1	22,7	73,4
AD-292629.1	25,7	80,1	49,1	63,6
AD-292630.1	26,4	99,1	31,1	47,4
AD-292631.1	53,9	70,9	84,9	103,8
AD-292634.1	74,5	92,9	89,3	82,6
AD-292638.1	50,1	88,5	74,8	79,7
AD-292639.1	73,9	86,3	62,4	85,5
AD-292640.1	17,0	71,2	49,7	48,3
AD-292641.1	55,1	100,4	70,5	92,6
AD-292642.1	29,7	93,0	50,8	81,0
AD-292646.1	41,7	95,5	79,8	92,7
AD-292650.1	85,5	84,2	104,5	95,4
AD-292651.1	44,4	94,8	72,9	84,0
AD-292652.1	78,7	85,1	73,9	97,5
AD-292667.1	91,8	83,0	108,4	95,8
AD-292668.1	24,5	61,0	95,9	83,9
AD-292671.1	18,8	61,8	42,5	93,0
AD-292673.1	41,0	77,7	35,8	79,4
AD-292677.1	73,0	74,0	111,0	90,7

AD-292678.1	60,3	90,4	56,9	95,8
AD-292679.1	45,0	74,8	45,1	72,5
AD-292680.1	42,9	89,4	22,9	44,0
AD-292681.1	56,4	99,9	94,6	105,1
AD-292682.1	63,9	84,7	64,0	64,5
AD-292684.1	24,2	81,8	16,2	88,1
AD-292685.1	55,6	89,3	40,6	81,3
AD-292691.1	27,0	82,0	27,8	59,7
AD-292692.1	56,9	76,9	57,8	85,9
AD-292693.1	24,3	76,9	16,6	47,8
AD-292694.1	26,5	84,2	61,0	91,0
AD-292695.1	35,8	82,1	24,0	62,8
AD-292696.1	32,5	87,4	27,5	60,8
AD-292697.1	51,8	79,1	33,8	57,3
AD-292725.1	49,1	61,8	101,5	90,3
AD-292726.1	41,3	71,5	81,7	90,6
AD-292727.1	64,4	82,9	78,5	96,0
AD-292728.1	54,9	65,4	96,9	121,5
AD-292757.1	38,0	71,0	53,7	72,0
AD-292759.1	93,8	89,4	89,7	82,5
AD-292761.1	47,1	97,8	29,0	84,6
AD-292766.1	139,5	89,6	92,1	105,5

AD-292787.1	57,9	77,4	79,6	95,3
AD-292788.1	23,2	88,1	75,5	85,9
AD-292789.1	14,8	78,8	47,7	73,0
AD-292793.1	16,8	62,8	16,1	33,1
AD-292795.1	14,3	57,5	53,5	43,0
AD-292796.1	22,7	56,2	18,2	71,8
AD-292797.1	5,6	28,2	10,4	17,0
AD-292800.1	9,6	58,3	12,8	25,3
AD-292802.1	13,0	70,4	18,8	60,5
AD-292806.1	14,9	63,8	9,9	39,7
AD-292808.1	76,4	90,2	64,5	85,2
AD-292870.1	11,8	42,5	33,1	50,4
AD-292893.1	19,5	60,5	126,3	95,7
AD-292906.1	26,3	32,8	39,7	80,9
AD-292915.1	19,4	49,0	41,4	38,1
AD-292935.1	73,8	82,0	42,3	64,3
AD-292936.1	60,6	74,3	51,1	53,1
AD-292967.1	11,4	46,8	51,2	89,8
AD-292970.1	17,0	58,6	48,2	87,4
AD-292974.1	23,3	72,1	68,3	78,4
AD-292975.1	22,3	80,7	52,6	79,2
AD-292978.1	23,6	77,6	29,9	74,0

AD-292979.1	50,5	84,9	54,2	97,1
AD-292980.1	36,4	107,7	42,5	91,0
AD-292981.1	67,7	79,8	76,1	107,9
AD-292982.1	27,1	76,5	42,7	74,1
AD-292983.1	21,5	71,3	39,1	77,3
AD-292984.1	24,2	73,5	36,2	69,6
AD-293027.1	37,3	82,5	41,7	86,2
AD-293028.1	59,8	81,3	64,4	92,3
AD-293034.1	30,5	89,4	40,2	54,5
AD-293037.1	45,8	77,7	42,3	81,9
AD-293039.1	25,3	76,7	37,8	49,6
AD-293099.1	47,1	87,8	50,8	77,5
AD-293153.1	71,0	85,3	75,2	104,1
AD-293156.1	38,3	93,0	46,6	131,7
AD-293162.1	53,5	82,3	65,5	99,4
AD-293163.1	36,1	84,2	74,8	96,1
AD-293166.1	55,4	86,7	56,3	79,2
AD-293167.1	69,9	94,9	52,4	63,0
AD-293168.1	68,5	77,5	62,5	74,1
AD-293169.1	62,0	89,4	51,6	98,0
AD-293170.1	27,7	93,7	39,6	64,8
AD-293171.1	14,1	67,7	42,0	36,4

AD-293172.1	63,2	82,8	64,9	88,2
AD-293174.1	19,3	95,6	50,2	68,6
AD-293176.1	20,5	63,7	36,4	40,1
AD-293177.1	21,4	93,0	31,5	44,8
AD-293178.1	24,3	73,6	70,8	75,4
AD-293179.1	52,5	78,7	51,1	85,3
AD-293180.1	34,0	91,7	60,7	71,5
AD-293181.1	58,7	107,6	35,6	78,0
AD-293182.1	16,9	60,5	39,5	45,0
AD-293183.1	31,4	78,1	74,7	83,4
AD-293184.1	25,6	58,7	59,7	50,9
AD-293186.1	48,4	78,2	41,4	73,5
AD-293187.1	41,7	78,8	50,4	84,9
AD-293191.1	56,1	103,5	72,3	84,1
AD-293218.1	36,6	67,3	44,9	69,3
AD-293228.1	83,7	92,4	84,0	74,2
AD-293230.1	76,4	95,3	76,2	67,1
AD-293231.1	57,6	83,2	56,3	101,8
AD-293235.1	56,7	97,6	99,6	86,3
AD-293271.1	112,7	85,7	85,7	110,6
AD-293273.1	60,2	92,6	38,6	89,9
AD-293306.1	33,9	90,2	42,6	70,4

AD-293309.1	28,6	68,9	33,4	58,9
AD-293311.1	13,4	66,4	28,2	41,2
AD-293312.1	21,7	88,7	46,9	92,5
AD-293315.1	29,4	88,6	50,1	82,0
AD-293316.1	32,7	75,3	40,2	67,0
AD-293323.1	85,3	103,1	49,1	91,3
AD-293353.1	64,0	76,6	83,0	84,7
AD-293354.1	50,9	79,2	64,5	84,5
AD-293355.1	78,0	110,8	76,0	88,7
AD-293358.1	46,0	106,3	91,5	98,3
AD-293359.1	77,0	73,5	74,2	82,4
AD-293360.1	75,9	104,8	56,5	88,2
AD-293361.1	73,4	87,3	72,7	86,0
AD-293362.1	38,3	81,1	75,0	84,3
AD-293363.1	35,2	72,6	78,9	79,4
AD-293364.1	83,5	86,1	80,9	74,2
AD-293365.1	55,0	88,5	69,3	114,8
AD-293368.1	19,6	50,5	40,7	66,8
AD-293369.1	14,3	63,5	38,5	63,5
AD-293370.1	93,8	84,2	99,4	112,0
AD-293410.1	99,6	81,5	111,6	112,2
AD-293419.1	84,8	89,5	88,7	66,7

AD-293420.1	65,4	89,3	72,7	75,8
AD-293422.1	55,1	104,1	99,0	97,0
AD-293423.1	58,8	75,0	82,0	101,6
AD-293530.1	33,5	86,1	54,2	103,1
AD-293532.1	42,7	95,8	84,4	91,4
AD-293554.1	63,0	84,0	106,1	100,8
AD-293555.1	49,0	87,7	85,4	110,5
AD-293557.1	34,8	90,9	42,7	71,2
AD-293558.1	34,0	63,5	56,9	62,9
AD-293559.1	23,4	53,8	52,4	48,2
AD-293560.1	23,8	75,6	45,8	46,4
AD-293562.1	54,3	67,3	45,0	68,8
AD-293569.1	54,2	99,4	144,4	123,6
AD-293570.1	43,8	106,2	66,9	67,3
AD-293571.1	17,8	67,2	45,3	58,4
AD-293572.1	25,4	78,2	43,2	52,5
AD-293573.1	33,1	88,7	43,2	61,4
AD-293574.1	89,3	84,3	70,6	94,1
AD-293575.1	50,3	80,2	50,3	73,4
AD-293576.1	47,3	88,6	42,2	69,7
AD-293579.1	37,0	88,6	43,0	78,7
AD-293586.1	109,6	101,6	69,8	111,1

AD-293589.1	66,1	82,7	86,4	104,3
AD-293592.1	54,7	84,6	63,6	95,7
AD-293594.1	41,8	82,8	53,7	80,9
AD-293601.1	40,1	80,8	69,9	68,9
AD-293602.1	78,8	77,2	75,2	72,3
AD-293872.1	89,1	88,4	106,8	116,8
AD-293875.1	74,4	78,5	78,7	84,3
AD-293876.1	25,1	68,3	70,4	61,4
AD-293877.1	26,8	77,7	35,9	50,4
AD-293878.1	13,3	80,2	75,0	64,2
AD-293879.1	34,1	59,4	45,2	54,3
AD-293880.1	19,0	80,8	59,2	55,4
AD-293881.1	16,3	78,2	38,7	49,0
AD-293882.1	11,9	39,5	33,7	47,3
AD-293883.1	8,9	58,7	50,9	34,1
AD-293898.1	23,0	64,6	41,5	76,4
AD-293902.1	16,0	53,9	43,3	56,9
AD-293909.1	75,9	112,6	74,2	91,0
AD-293910.1	32,6	89,6	54,3	79,9
AD-293914.1	35,0	88,0	52,9	72,0
AD-293915.1	22,7	87,0	39,4	82,5
AD-293919.1	31,8	79,6	59,5	84,2

AD-293922.1	53,2	96,2	37,0	65,9
AD-293923.1	48,5	76,0	77,7	99,7
AD-293925.1	31,1	81,9	53,0	87,7
AD-293928.1	29,4	73,5	68,8	95,5
AD-293931.1	27,5	85,4	52,5	79,1
AD-293932.1	14,2	61,7	55,5	65,7
AD-293933.1	49,1	80,3	42,1	74,9
AD-293934.1	30,9	79,7	46,1	87,7
AD-293935.1	48,7	79,1	68,3	70,8
AD-293936.1	55,0	84,6	45,8	90,3
AD-293937.1	29,6	80,1	58,5	83,9
AD-293938.1	24,7	67,9	58,4	94,8
AD-293940.1	17,7	61,9	51,9	69,0

Пример 3. Идентификация мутации с потерей функции, которая защищает от NASH

Неалкогольный стеатогепатит (NASH) представляет прогрессирующее заболевание, характеризующееся накоплением жира в печени и воспалением, которое может привести к циррозу. Полагается, что NASH является основной основным показанием для трансплантации печени к 2020 году. Смертность, связанная с болезнями печени, растет экспоненциально с прогрессированием фиброза.

Вариант сплайсинга (rs72613567:TA) HSD17B13 приводит к синтезу нестабильного и усеченного белка со сниженной ферментативной активностью на стероидных субстратах и, таким образом, представляет собой вариант с потерей функции HSD17B13. HSD17B13:rs72613567:A воспроизводимо ассоциировался со снижением активности аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST) в сыворотке, и, как показано на фиг. 1, этот вариант связан со значительным снижением риска развития алкогольной и неалкогольной болезни печени, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы, в зависимости от частоты аллеля образом.

HSD17B13, экспрессируемый в гепатоцитах, таким образом, является привлекательной мишенью для лечения NASH и других хронических заболеваний печени с использованием средств на основе дцРНК, которые ингибируют экспрессию HSD17B13 и имитируют вариант с потерей функции rs72613567:TA.

Пример 4: эффективность in vivo средств на основе дцРНК, нацеленных на HSD17B13

A. Эффективность перекрестно-реактивной миРНК человека/NHP для эктопически экспрессируемого HSD17B13 человека у мышей

Мышам (n=3/группу) вводили аденоассоциированный вирус (AAV), экспрессирующий HSD17B13 человека. Через 14 суток после инъекции AAV мышам подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг AD-288917. Через 10 суток после введения определяли экспрессию HSD17B13 человека в печени с помощью ОТ-кПЦР и нормализовали по отношению к экспрессии HSD17B13 человека у контрольных животных, которым инъецировали PBS. Как показано на фиг. 2A, однократная доза AD-288917 эффективно подавляет экспрессию HSD17B13 человека.

B. Эффективность перекрестно-реактивной миРНК человека/NHP для эндогенного HSD17B13 у приматов, отличных от человека

Обезьянам Cynomolgus (n=3/группу) подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг AD-288917. Через 21 сутки после введения дуплекса 1 в биоптатах печени определяли экспрессию эндогенного HSD17B13 с помощью ОТ-кПЦР и нормализовали относительно экспрессии эндогенного HSD17B13 у контрольных животных, которым вводили PBS. Как показано на фиг. 2B, однократная доза AD-288917 эффективно подавляет экспрессию эндогенного HSD17B13.

Пример 5: эффективность in vivo средств на основе дцРНК, нацеленных на HSD17B13

Обезьянам Cynomolgus (n=3/группу) подкожно вводили однократную дозу 3 мг/кг или однократную дозу 10 мг/кг средства, указанного в таблице 13. Через 21 сутки после введения дуплекса в печени определяли эндогенную экспрессию HSD17B13 в биопсийном материале (левая и правая доли) с помощью ОТ-кПЦР и нормализовали относительно экспрессии эндогенного HSD17B13 контрольных животных, которым вводили PBS. Как показано в таблице 14, однократная доза 3 мг/кг или 10 мг/кг всех тестированных средств эффективно ингибировала экспрессию эндогенного HSD17B13.

Таблица 14

Группы (n=3/группу)	**3 мг/кг**			**10 мг/кг**		
	Левая доля	**Правая доля**	**Среднее значение левая+правая доля**	**Левая доля**	**Правая доля**	**Среднее значение левая+ правая доля**
AD-288917 AVG	0,58	0,58	0,58	0,25	0,26	0,25
AD-288917 SEM	0,26	0,26	0,26	0,01	0,05	0,03
AD-288996 AVG	0,28	0,18	0,23	0,11	0,11	0,11
AD-288996 SEM	0,08	0,09	0,07	0,06	0,05	0,05
AD-413639 AVG	0,35	0,34	0,34	0,14	0,13	0,13
AD-413639 SEM	0,16	0,11	0,13	0,07	0,06	0,06
AD-413644 AVG	0,33	0,30	0,32	0,10	0,11	0,11
AD-413644 SEM	0,13	0,09	0,10	0,02	0,03	0,02
AD-413669 AVG	0,33	0,23	0,28	0,23	0,20	0,21
AD-413669 SEM	0,09	0,07	0,08	0,11	0,10	0,10
PBS (контроль) AVG	1,06	1,02	1,04			
PBS (контроль) SEM	0,26	0,20	0,23			

Результаты представляют экспрессию HSD17B13 (кратное изменение против контрольной группы с PBS)

Таблица 13

Дуплекс ID	Цепь	Модифицированная последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:	Немодифицированные последовательности (5'-3')	SEQ ID NO:
AD-288917	смысловая цепь	usascaucAfaGfAfCfuaaucuuguuL96	4486	UACAUCAAGACUAAUCUUGUU	4496
	антисмысловая цепь	asAfscaag(Agn)uuagucUfuGfauguasgsu	4487	AACAAGAUUAGUCUUGAUGUAGU	4497
AD-288996	смысловая цепь	asusgcuuUfuGfCfAfuggacuaucuL96	4488	AUGCUUUUGCAUGGACUAUCU	4498
	антисмысловая цепь	asGfsauag(Tgn)ccaugcAfaAfagcaususc	4489	AGAUAGTCCAUGCAAAAGCAUUC	4499
AD-413639	смысловая цепь	csgsuaugCfaGfAfAfuauucaauuuL96	4490	CGUAUGCAGAAUAUUCAAUUU	4500
	антисмысловая цепь	asAfsauuGf(Agn)auauucUfgCfauacgsasu	4491	AAAUUGAAUAUUCUGCAUACGAU	4501
AD-413644	смысловая цепь	csgsuaugCfaGfAfAfuauucaauuuL96	4492	CGUAUGCAGAAUAUUCAAUUU	4502
	антисмысловая цепь	asAfsaUfuGf(Agn)auauUfcUfgCfaUfaCfgsasu	4493	AAAUUGAAUAUUCUGCAUACGAU	4503
AD-413669	смысловая цепь	csusacauCfaAfGfAfcuaaucuuguL96	4494	CUACAUCAAGACUAAUCUUGU	4504
	антисмысловая цепь	asCfsaaga(Tgn)uaguCfuUfgAfuguagsusg	4495	ACAAGATUAGUCUUGAUGUAGUG	4505

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9.

2. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где указанная антисмысловая цепь включает область комплементарности с мРНК, кодирующей HSD17B13, которая содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11, или 13.

3. Средство на основе дцРНК по пп.1 или 2, где указанное средство на основе дцРНК содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

4. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-3, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию.

5. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-3, где по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

6. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-3, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

7. Средство на основе двухцепочечной РНК (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17'-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где средство на основе двухцепочечной РНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9,

где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и

где смысловая цепь конъюгирована с лигандом, присоединенным к 3'-концу.

8. Средство на основе дцРНК по п.7, где все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию.

9. Средство на основе дцРНК по п.7, где все нуклеотиды антисмысловой цепи

содержат модификацию.

10. Средство на основе дцРНК по п.7, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

11. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 3-10, где по меньшей мере один из указанных модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого дезокситиминнуклеотида(dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтормодифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, закрытого нуклеотида, раскрытого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, нуклеотида без основания, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинонуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида, и их комбинаций.

12. Средство на основе дцРНК по п.11, где модификации нуклеотидов представляют 2'-О-метил- и/или 2'-фтор-модификации.

13. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-12, где область комплементарности составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину.

14. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-13, где область комплементарности составляет 19-30 нуклеотидов в длину.

15. Средство на основе дцРНК по п. 14, где область комплементарности составляет 19-25 нуклеотидов в длину.

16. Средство на основе дцРНК по п.15, где область комплементарности составляет 21-23 нуклеотида в длину.

17. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-16, где каждая цепь составляет не более 30 нуклеотидов в длину.

18. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-17, где каждая цепь независимо составляет 19-30 нуклеотидов в длину.

19. Средство на основе дцРНК по п.18, где каждая цепь независимо составляет 19-25 нуклеотидов в длину.

20. Средство на основе дцРНК по п.18, где каждая цепь независимо составляет 21-23 нуклеотида в длину.

21. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-20, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида.

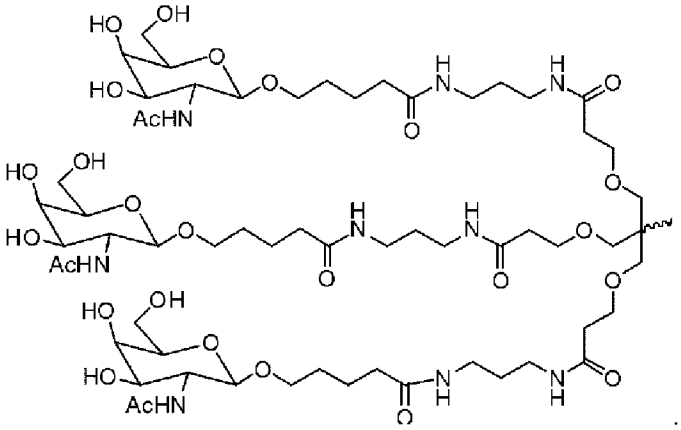
22. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 21, где по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

23. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 1-6 и 11-22, дополнительно содержащее лиганд.

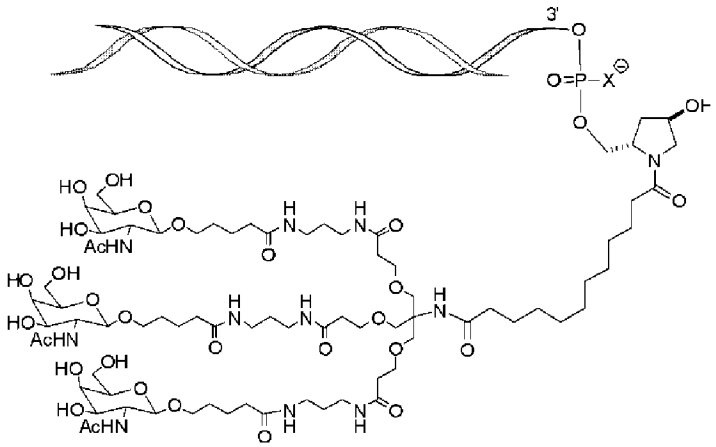
24. Средство на основе дцРНК по п.23, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи средства на основе дцРНК.

25. Средство на основе дцРНК по пп.7 или 24, где лиганд представляет производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

26. Средство на основе дцРНК по п. 25, где лиганд представляет:



27. Средство на основе дцРНК по п.26, где средство на основе дцРНК конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет O или S.

28. Средство на основе дцРНК по п.27, где X представляет O.

29. Средство на основе дцРНК по п. 2, где область комплементарности включает любую из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13.

30. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где указанная антисмысловая цепь содержит

область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где указанное средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая: 5' np -Na -(X X X) i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'

антисмысловая: 3' np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(Z′Z′Z′)l-Na′-nq′ 5' (III)

где:

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

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

Na и Na' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

Nb и Nb' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

np, np', nq и nq' каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

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

модификации в Nb отличаются от модификации в Y, и модификации в Nb' отличаются от модификации в Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

31. Средство на основе дцРНК по п.30, где i равно 0; j равно 0; i равно 1; j равно 1; оба i и j равны 0; или оба i и j равны 1.

32. Средство на основе дцРНК по п.30, где k равно 0; l равно 0; k равно 1; l равно 1; оба k и l равны 0; или оба k и l равны 1.

33. Средство на основе дцРНК по п.30, где XXX комплементарен X'X'X', YYY комплементарен Y'Y'Y', и ZZZ комплементарен Z'Z'Z'.

34. Средство на основе дцРНК по п.30, где мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или рядом с ним.

35. Средство на основе дцРНК по п.30, где мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12 и 13 антисмысловой цепи от 5'-конца.

36. Средство на основе дцРНК по п.30, где формула (III) представлена формулой (IIIa):

смысловая: 5' np -Na -Y Y Y -Na - nq 3'

антисмысловая: 3' np′-Na′- Y′Y′Y′- Na′- nq′ 5' (IIIa)

37. Средство на основе дцРНК по п.30, где формула (III) представлена формулой (IIIb):

смысловая: 5' np -Na -Y Y Y -Nb -Z Z Z -Na - nq 3'

антисмысловая 3' np′-Na′- Y′Y′Y′-Nb′-Z′Z′Z′- Na′- nq′ 5' (IIb)

где каждый Nb и Nb' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

38. Средство на основе дцРНК по п.30, где формула (III) представлена формулой (IIIc):

смысловая: 5' np -Na -X X X -Nb -Y Y Y -Na - nq 3'

антисмысловая: 3' np′-Na′- X′X′X′-Nb′- Y′Y′Y′- Na′- nq′ 5' (IIIc)

где каждый Nb и Nb' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

39. Средство на основе дцРНК по п.30, где формула (III) представлена формулой (IIId):

смысловая: 5' np -Na-X X X-Nb-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3'

антисмысловая: 3' np′-Na′-X′X′X′-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-Z′Z′Z′-Na′-nq′ 5' (IIId)

где Nb и Nb' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, и каждый Na и Na' независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

40. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-39, где область комплементарности составляет по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину.

41. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-39, где область комплементарности составляет 19-30 нуклеотидов в длину.

42. Средство на основе дцРНК по п. 41, где область комплементарности составляет 19-25 нуклеотидов в длину.

43. Средство на основе дцРНК по п. 42, где область комплементарности составляет 21-23 нуклеотида в длину.

44. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-43, где каждая цепь составляет не более 30 нуклеотидов в длину.

45. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-43, где каждая цепь независимо составляет 19-30 нуклеотидов в длину.

46. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-45, где модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей LNA, HNA, CeNA, 2’-метоксиэтила, 2’-О-алкила, 2’-О-аллила, 2’-С-аллила, 2’-С-аллила, 2’-фтора, 2'-О-метила, 2'-дезокси, 2'-гидроксила и их комбинаций.

47. Средство на основе дцРНК по п.46, где модификации нуклеотидов представляют 2’-О-метил- или 2’-фтор-модификации.

48. Средство на основе дцРНК по любому из пп.30-46, где Y' представляет 2'-О-метил- или 2’-фтор-модифицированный нуклеотид.

49. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-48, где по меньшей мере одна

цепь содержит 3’-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида.

50. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-49, где по меньшей мере одна цепь содержит 3’-выступ по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

51. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-50, где средство на основе дцРНК дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

52. Средство на основе дцРНК К по п.51, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3’-конце одной цепи.

53. Средство на основе дцРНК по п.52, где указанная цепь представляет антисмысловую цепь.

54. Средство на основе дцРНК по п. 52, где указанная цепь является смысловой цепью.

55. Средство на основе дцРНК по п.51, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5’-конце одной цепи.

56. Средство на основе дцРНК по п.55, где указанная цепь является антисмысловой цепью.

57. Средство на основе дцРНК по п. 55, где указанная цепь является смысловой цепью.

58. Средство на основе дцРНК по п.51, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5’-, так и на 3’-конце одной цепи.

59. Средство на основе дцРНК по п. 30, где пара оснований в положении 1 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет пару оснований AU.

60. Средство на основе дцРНК по п.30, где p' > 0.

61. Средство на основе дцРНК по п.30, где p' = 2.

62. Средство на основе дцРНК по п. 61, где q’ = 0, p=0, q=0, и выступающие нуклеотиды p’ комплементарны мРНК-мишени.

63. Средство на основе дцРНК по п. 61, где q’ = 0, p=0, q=0, и выступающие нуклеотиды p’ не комплементарны мРНК-мишени.

64. Средство на основе дцРНК по п.30, где смысловая цепь содержит в целом 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь содержит в целом 23 нуклеотида.

65. Средство на основе дцРНК по п.30, где по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь.

66. Средство на основе дцРНК по п. 65, где все np' связаны с соседними нуклеотидами через фосфоротиоатные связи.

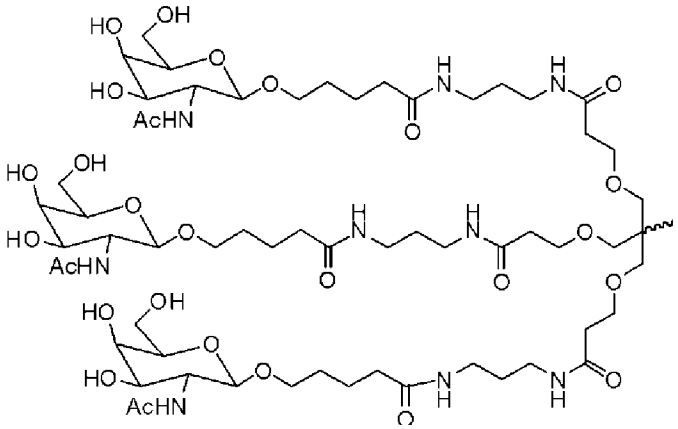
67. Средство на основе дцРНК по п.30, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

68. Средство на основе дцРНК по любому из пп. 30-67, где лиганд конъюгирован с 3’-концом смысловой цепи средства на основе дцРНК.

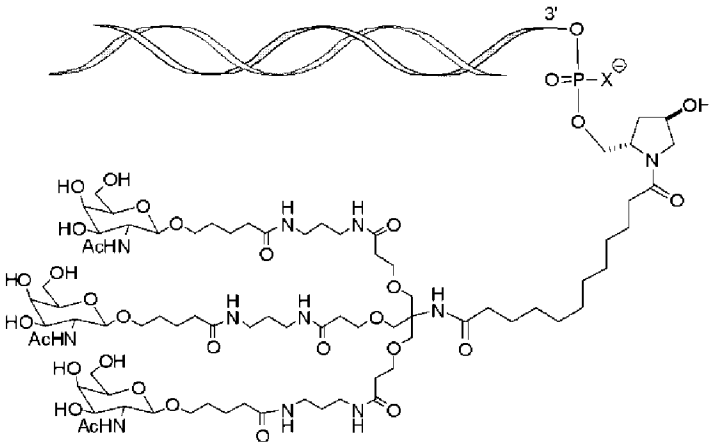
69. Средство на основе дцРНК по п.68, где лиганд представляет одно или более производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc), присоединенных через одновалентный,

двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

70. Средство на основе дцРНК по п. 69, где лиганд представляет:



71. Средство на основе дцРНК по п. 70, где средство на основе дцРНК конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет O или S.

72. Средство на основе дцРНК по п.71, где X представляет O.

73. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая:	5' np -Na -(X X X) i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'	
антисмысловая:	3'np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(Z′Z′Z′)l-Na′-nq′ 5'	(III)

где:

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

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

Na и Na' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность,

содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

Nb и Nb' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

np, np', nq и nq' каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации в Nb отличаются от модификации в Y, и модификации в Nb' отличаются от модификации в Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

74. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая:	5' np -Na -(X X X) i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'	
антисмысловая:	3' np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(Z′Z′Z′)l-Na′- nq′ 5'	(III)

где:

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

каждый np, nq и nq' каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

p, q и q'каждый независимо равен 0-6;

np' > 0 и по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

Na и Na' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

Nb и Nb' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации в Nb отличаются от модификации в Y, и модификации в Nb' отличаются от модификации в Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

75. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь включает область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая:	5' np -Na -(X X X) i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'	
антисмысловая:	3'np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-Z′Z′Z′)l-Na′-nq′ 5'	(III)

где:

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

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

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

np' > 0 и по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

Na и Na' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

Nb и Nb' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-O-метил- или 2'-F-модификации;

модификации в Nb отличаются от модификации в Y, и модификации в Nb' отличаются от модификации в Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

76. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК

представлено формулой (III):

смысловая: 5' np -Na -(X X X) i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'

антисмысловая: 3'np′-Na′-(X′X′X′)k-Nb′-Y′Y′Y′-Nb′-(Z′Z′Z′)l-Na′- nq′ 5' (III)

где:

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

np, nq и nq' каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

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

np' > 0 и по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

Na и Na' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

Nb и Nb' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-O-метил- или 2'-фтор-модификации;

модификации в Nb отличаются от модификации в Y, и модификации в Nb' отличаются от модификации в Y';

где смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

77. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит область, комплементарную участку мРНК, кодирующей HSD17B13, где каждая цепь составляет примерно от 14 до примерно 30 нуклеотидов в длину, где средство на основе дцРНК представлено формулой (III):

смысловая: 5' np -Na -Y Y Y - Na - nq 3'

антисмысловая: 3' np′-Na′- Y′Y′Y′- Na′- nq′ 5' (IIIa)

где:

np, nq и nq' каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет выступающий нуклеотид;

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

np' > 0 и по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь;

Na и Na' каждый независимо представляет олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые являются модифицированными или немодифицированными, или их комбинациями, каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

YYY и Y'Y'Y' каждый независимо представляет один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и где модификации представляют 2'-O-метил- и/или 2β-фтор- модификации;

где смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лиганд представляет одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

78. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или 2, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8 или 9,

где по существу все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из модификации 2'-O-метил- и/или 2'-фтор-модификации,

где смысловая цепь включает две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце,

где по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-O-метил- и/или 2'-фтор-модификации,

где антисмысловая цепь включает две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и

где смысловая цепь конъюгирована с одним или более производными GalNAc, присоединенными через моновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер на 3'-конце.

79. Средство на основе дцРНК по п.78, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

80. Средство на основе дцРНК по любому из пп.2, 30 и 73-79, где область комплементарности включает любую из антисмысловых последовательностей, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13.

81. Средство на основе дцРНК по любому из пп.1-80, где смысловая цепь и антисмысловая цепь содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из нуклеотидных последовательностей любого из средств, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13.

82. Клетка, содержащая средство на основе дцРНК по любому из пп.1-81.

83. Вектор, кодирующий по меньшей мере одну цепь средства на основе дцРНК по любому из пп.1-81.

84. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена 17'-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13), содержащая средство на основе дцРНК по любому из пп.1-81.

85. Фармацевтическая композиция по п. 84, где средство формулировано в незабуференном растворе.

86. Фармацевтическая композиция по п.85, где незабуференный раствор представляет физиологический раствор или воду.

87. Фармацевтическая композиция по п.84, где средство формулировано в забуференном растворе.

88. Фармацевтическая композиция по п.87, где указанный забуференный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

89. Фармацевтическая композиция по п.87, где забуференный раствор представляет забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

90. Способ ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, включающий приведение в контакт клетки со средством по любому из пп.1-81 или фармацевтической композицией по любому из пп.84-89, тем самым обеспечивая ингибирование экспрессии HSD17B13 в клетке.

91. Способ по п.90, где указанная клетка находится в организме субъекта.

92. Способ по п.91, где субъектом является человек.

93. Способ по любому из пп.90-92, где экспрессия HSD17B13 ингибируется по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или ниже уровня детектирования экспрессии HSD17B13.

94. Способ по п.93, где человек страдает заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13.

95. Способ по п.94, где заболевание, расстройство или патологическое состояние, ассоциированное с HSD17B13, представляет хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени.

96. Способ по п.95, где хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени связано с накоплением и/или увеличением липидных капель в печени.

97. Способ по п.95, где хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени выбрано из группы, состоящей воспаления печени, фиброза печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), цирроза печени, алкогольного стеатогепатита (ASH), алкогольных болезней печени (ALD), цирроза,

ассоциированного с HCV, лекарственно-индуцированного поражения печени и гепатоцеллюлярного некроза.

98. Способ ингибирования экспрессии HSD17B13 у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции по любому из пп.84-89, тем самым обеспечивая ингибирование экспрессии HSD17B13 у указанного субъекта.

99. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции по любому из пп.84-89, тем самым обеспечивая лечение субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13.

100. Способ профилактики по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества средства по любому из пп.1-31, или фармацевтической композиции по любому из пп.34-39, тем самым обеспечивая профилактику по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13.

101. Способ снижения риска развития хронического заболевания печени у субъекта, страдающего стеатозом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции по любому из пп.84-89, тем самым обеспечивая снижение риска развития хронического заболевания печени у субъекта, страдающего стеатозом.

102. Способ подавления прогрессирования стеатоза в стеатогепатит у субъекта, страдающего стеатозом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции любого из них по пп.84-89, тем самым обеспечивая подавление прогрессирования стеатоза в стеатогепатит у субъекта.

103. Способ ингибирования накопления липидных капель в печени субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции по любому из пп.84-89, и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая ингибирование накопления жира в печени субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13.

104. Способ лечения субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или

патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции по любому из пп. пп.84-89, и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая лечение субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, ассоциированным с HSD17B13.

105. Способ профилатики по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое окажет положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества средства по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции по любому из пп.84-89, и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая профилактику по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, на которое может оказать положительное действие снижение экспрессии гена HSD17B13.

106. Способ снижения риска развития хронического заболевания печени у субъекта, страдающего стеатозом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции по любому из пп.84-89, и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНК, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая снижение риска развития хронического заболевания печени у субъекта, страдающего стеатозом.

107. Способ подавления прогрессирования стеатоза в стеатогепатит у субъекта, страдающего стеатозом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе дцРНК по любому из пп.1-81 или фармацевтической композиции любого из по пп.84-89, и средства на основе дцРНК, нацеленного на ген PNPLA3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе дцРНКа, нацеленное на ген PNPLA3, тем самым обеспечивая подавление прогрессирования стеатоза в стеатогепатит у субъекта.

108. Способ по любому из пп.91-107, где введение средства на основе дцРНК или фармацевтической композиции субъекту вызывает снижение ферментативной активности HSD17B13, снижение накопления белка HSD17B13, снижение ферментативной активности PNPLA3 и снижение накопления белка PNPLA3 и/или снижение накопления жира и/или увеличения количества липидных капель в печени субъекта.

109. Способ по любому из пп.99-108, где заболевание, расстройство или патологическое состояние, ассоциированное с HSD17B13, представляет хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени.

110. Способ по п.109, где хроническое фиброзно-воспалительное заболевание

печени связано с накоплением и/или увеличением липидных капель в печени.

111. Способ по п.109, где хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени выбрано из группы, состоящей из накопления жира в печени, воспаления печени, фиброза печени, неалкогольного стеатогепатита (NASH), неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD), цирроза печени, алкогольного стеатогепатита (ASH), алкогольных болезней печени (ALD), цирроза, ассоциированного с HCV, лекарственно-индуцированного поражения печени и гепатоцеллюлярного некроза.

112. Способ по п.111, где хроническое фиброзно-воспалительное заболевание печени представляет неалкогольный стеатогепатит (NASH).

113. Способ по любому из пп. 91-112, где субъект страдает ожирением.

114. Способ по любому из пп.91-113, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

115. Способ по любому из пп.91-114, где средство на основе дцРНК вводят субъекту в дозе примерно от 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг или примерно от 0,5 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

116. Способ по любому из пп.91-115, где средство вводят субъекту внутривенно, внутримышечно или подкожно.

117. Способ по любому из пп.91-116, дополнительно включающий определение уровня HSD17B13 у субъекта.

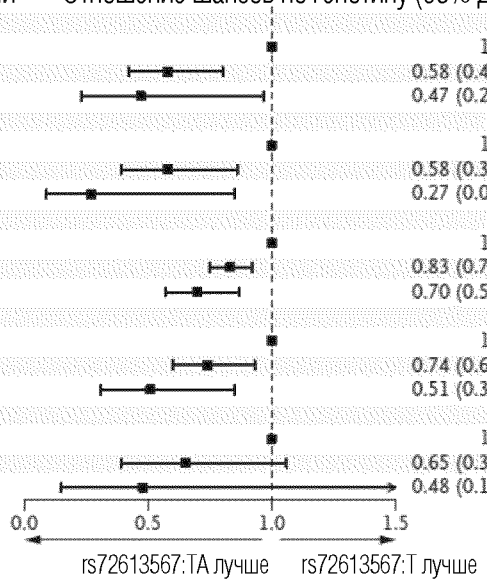
118. Средство на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии 17β-гидроксистероиддегидрогеназы типа 13 (HSD17B13) в клетке, где указанное средство на основе дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующих двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность любого из средств, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность любого из средств, приведенных в любой из таблиц 2, 3, 7, 8, 10, 11 или 13,

где по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и

где средство на основе дцРНК конъюгировано с лигандом.

A Когорта включения согласно системе GHS

Описание	Генотип	Случаи у пациентов	Контроли	Отношение шансов по генотипу (95% ДИ)	Отношение шансов по аллелю (95% ДИ)	P значение
Алкогольная болезнь печени (N = 190) по сравнению с нормой (N = 29 928)					0.62 (0.48–0.81)	1.8×10^{-4}
	T/T	128	16,084	1		
	T/TA	54	11,754	0.58 (0.42–0.80)		
	TA/TA	8	2,090	0.47 (0.23–0.97)		
Алкогольный цирроз печени (N = 124) по сравнению с нормой (N = 29 923)					0.56 (0.41–0.78)	3.4×10^{-4}
	T/T	85	16,084	1		
	T/TA	36	11,754	0.58 (0.39–0.86)		
	TA/TA	3	2,090	0.27 (0.09–0.85)		
Неалкогольная болезнь печени (N = 1857) по сравнению с нормой (N = 29 928)					0.84 (0.78–0.91)	1.3×10^{-5}
	T/T	1090	16,084	1		
	T/TA	665	11,754	0.83 (0.75–0.92)		
	TA/TA	102	2,090	0.70 (0.57–0.87)		
Неалкогольный цирроз печени (N = 374) по сравнению с нормой (N = 29 928)					0.74 (0.62–0.88)	4.8×10^{-4}
	T/T	231	16,084	1		
	T/TA	127	11,754	0.74 (0.60–0.93)		
	TA/TA	16	2,090	0.51 (0.31–0.85)		
Гепатоцеллюлярная карцинома (N = 75) по сравнению с нормой (N = 29 928)					0.67 (0.45–1.00)	0.047
	T/T	49	16,084	1		
	T/TA	23	11,754	0.65 (0.39–1.06)		
	TA/TA	3	2,090	0.48 (0.15–1.56)		



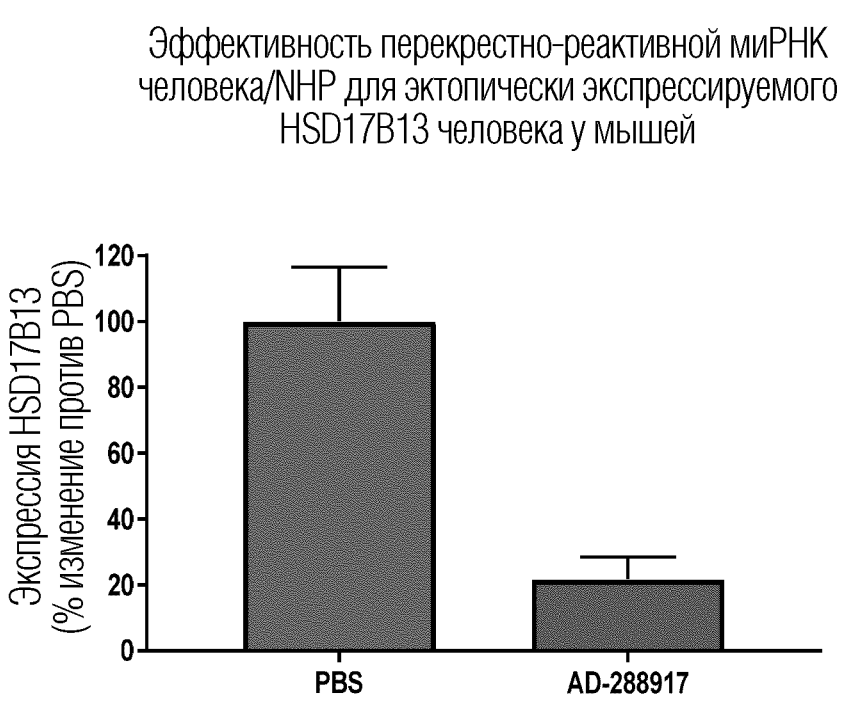
Хронические заболевания печени нуждаются в решении вопросов лечения

Таким образом, HSD17B13 является привлекательной мишенью для лечения NASH и других хронических заболеваний печени

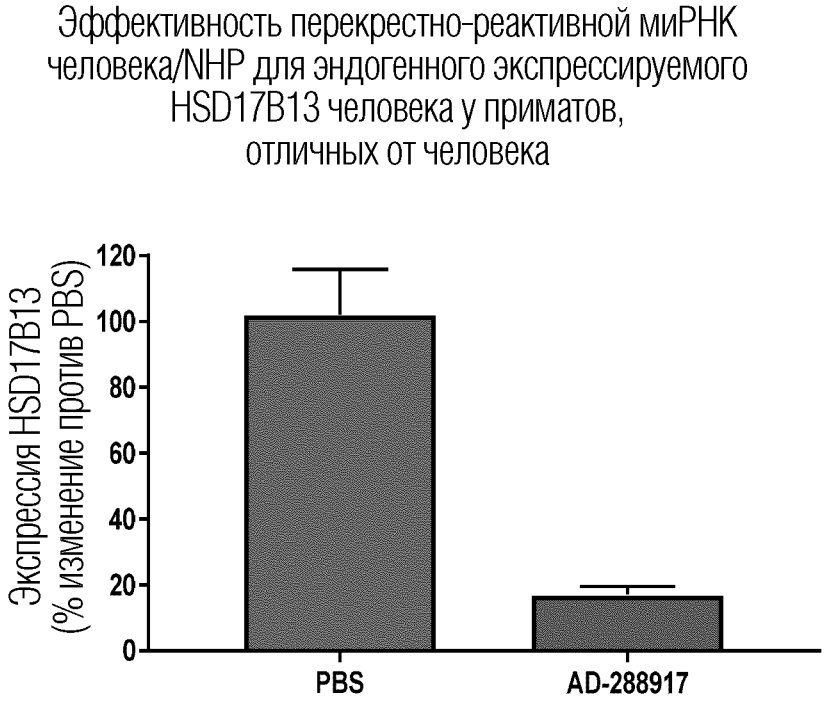
Аллель (TA) с протективным действием достоверно снижает заболеваемость NASH, ASH, циррозом и HCC

ФИГ. 1

564437


Эффективность перекрестно-реактивной миРНК человека/NHP для эктопически экспрессируемого HSD17B13 человека у мышей
Экспрессия HSD17B13 (% изменение против PBS)
120
100
80
60
40
20
0
PBS
AD-288917

ФИГ. 2A


Эффективность перекрестно-реактивной миРНК человека/NHP для эндогенного экспрессируемого HSD17B13 человека у приматов, отличных от человека
Экспрессия HSD17B13 (% изменение против PBS)
120
100
80
60
40
20
0
PBS
AD-288917

ФИГ. 2B