

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191537 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.01.31

(22) Дата подачи заявки
2012.06.28

(51) Int. Cl. A61K 31/713 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2006.01)

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

(31) 11172235.1; 13/535,454

(32) 2011.06.30; 2012.06.28

(33) EP; US

(62) 202090994; 2012.06.28

(71) Заявитель:
ЭРРОУХЭД ФАРМАСЬЮТИКАЛС,
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чин Дэниел (US), Деккерт Йохен,
Хоссбах Маркус, Йон Маттиас (DE)

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

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

A1

202191537

202191537

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

Вирус гепатита В передается через кровь или продукты крови, сперму, вагинальный секрет или слюну. Употребление наркотиков и половое сношение являются факторами риска и поддерживают распространение вируса. Для инфекции может быть достаточно контакта поврежденного слизистого эпителия с зараженными жидкостями организма. Инкубационный период составляет от 40 до 200 дней. Риск инфекции пропорционален количеству полученных частиц вируса гепатита В. Младенцы часто

заражаются перинатально от матерей, имеющих вирус гепатита В, что является основной проблемой здоровья на эндемичных территориях.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Вторым средством для лечения является введение интерферона альфа. В данном случае пациент получает большие дозы интерферона альфа в течение 6 месяцев. В зависимости от генотипа вируса лечению поддаются более 50% хронических инфекций. Однако азиатский генотип В дает очень слабый уровень ответа. Коинфекция с гепатитом

Д или вирусом иммунодефицита человека делает терапию интерфероном альфа полностью неэффективной. Для пациентов с существенными повреждениями печени и тяжелыми фиброзными состояниями терапия интерфероном альфа не рекомендуется.

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

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

В одном варианте реализации, настоящее изобретение предусматривает молекулы двунитевой рибонуклеиновой кислоты (днРНК) для ингибирования экспрессии гена вируса гепатита В, в частности, экспрессии генов, относящихся к репликации или патогенезу вируса гепатита В. днРНК включает по меньшей мере две последовательности, комплементарные друг другу. днРНК включает кодирующую цепь, включающую первую

последовательность, и некодирующую цепь, включающую вторую последовательность, см. последовательности, представленные в перечне последовательностей, а также специфичные пары днРНК в прилагаемых Таблице 1 и Таблице 2. В одном варианте реализации, кодирующая последовательность включает последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична по меньшей мере части мРНК вируса гепатита В. Указанная последовательность расположена в области комплементарности кодирующей цепи к некодирующей цепи, предпочтительно в пределах нуклеотидов 2-7 с 5'-конца некодирующей цепи. В одном предпочтительном варианте реализации, днРНК специфически нацелена на ген вируса гепатита В, который кодирует коровый белок, вирусную полимеразу, поверхностный антиген, антиген Е или белок Х. Более того, предпочтительно, что днРНК специфически нацелена на консенсусную последовательность, которая имеет высоко консервативную последовательность нуклеиновой кислоты среди геномных последовательностей генотипов А, В, С и D вируса гепатита В. Предпочтительно консенсусная последовательность представляет собой по меньшей мере 13 последовательных нуклеотидов в длину, более предпочтительно по меньшей мере 17 последовательных нуклеотидов и наиболее предпочтительно по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов. Предпочтительные высоко консервативные последовательности нуклеиновой кислоты представлены в Таблице 5.

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ

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

ФИГ.2 Таблица 2. Характеристика днРНК, нацеленных на вирус гепатита В:

Исследование активности с единичной дозой. Заглавные буквы обозначают нуклеотиды РНК, строчные буквы «с», «g», «a» и «u» обозначают 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, «s» обозначает фосфотиоат, «dT» обозначает дезокситимидин, заглавные буквы A, C, G, U, за которыми следует «f», обозначают 2'-фтор нуклеотид. Строчная «p» обозначает 5'-фосфат. (invdT) обозначает инвертированный дезокситимидин (3'3'связанный).

ФИГ.3. Таблица 3. Характеристика днРНК, нацеленных на вирус гепатита В: Стабильность. $t_{1/2}$ = период полужизни цепи, как определено в примерах.

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

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

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

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

ФИГ.8. Таблица 8. Последовательности отрицательного контроля днРНК, использованные в скрининговом анализе psiCHECK™-2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Прилагаемая Таблица 1 относится к предпочтительным молекулам, используемым в качестве днРНК в соответствии с настоящим изобретением. Также в настоящей заявке предусматриваются модифицированные молекулы днРНК, которые являются, в частности, раскрытыми в прилагаемой Таблице 2, представляющей иллюстративные примеры модифицированных молекул днРНК согласно настоящему изобретению. Как указано выше по тексту, Таблица 2 содержит иллюстративные примеры

модифицированных днРНК согласно настоящему изобретению (тем самым, соответствующие кодирующая цепь и не кодирующая цепь приведены в данной Таблице). Взаимосвязь предпочтительных немодифицированных молекул, приведенных в Таблице 1, с модифицированными днРНК из Таблицы 2 проиллюстрирована в Таблице 4. При этом иллюстративные модификации этих компонентов днРНК согласно настоящему изобретению приведены в настоящей заявке в качестве примеров модификаций.

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

Некоторые из предпочтительных молекул днРНК представлены в прилагаемой Таблице 1, где, среди прочего и предпочтительно, кодирующая цепь выбрана из группы, состоящей из последовательностей нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 26. Не кодирующая цепь выбрана из группы, состоящей из последовательностей нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NO: 157, 158, 160, 161, 162, 163, 164 и 186. Соответственно, молекула днРНК согласно настоящему изобретению может, среди прочего, включать пары последовательностей, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/157, 2/158, 3/160, 4/161, 5/162, 6/163, 7/164 и 26/186. В контексте специфичных молекул днРНК, предусмотренных настоящей заявкой, пары номеров SEQ ID NO относятся к соответствующим последовательностям кодирующей и не кодирующей цепи (от 5' до 3'), как показано в Таблицах.

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

В другом предпочтительном варианте реализации, молекулы днРНК включают кодирующую цепь с 3' липким концом длиной 1-5 нуклеотидов, предпочтительно длиной 1-2 нуклеотида и не кодирующую цепь с 3' липким концом длиной 1-5 нуклеотидов, предпочтительно длиной 1-2 нуклеотида. Предпочтительно указанный липкий конец

кодирующей цепи содержит урацил или нуклеотиды, которые являются по меньшей мере на 90% идентичными прегенотипной РНК и/или мРНК, кодирующей белок, необходимый для репликации или патогенеза вируса гепатита В, и указанный липкий конец некодирующей цепи содержит урацил или нуклеотиды, которые являются по меньшей мере на 90% комплементарными мРНК, кодирующей белок, необходимый для репликации или патогенеза вируса гепатита В.

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

В предпочтительном варианте реализации, молекулы днРНК согласно настоящему изобретению содержат модифицированные нуклеотиды, подробно описанные в последовательностях, представленных в Таблице 2. В одном предпочтительном варианте реализации, молекула днРНК согласно настоящему изобретению включает пары последовательностей, которые выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/157, 2/158, 3/160, 4/161, 5/162, 6/163, 7/164 и 26/186, и включает липкие концы на некодирующей и/или кодирующей цепи, состоящие из 1-2 дезокситимидинов. В одном предпочтительном варианте реализации, молекула днРНК согласно настоящему

изобретению включает пары последовательностей, которые выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1/157, 2/158, 3/160, 4/161, 5/162, 6/163, 7/164 и 26/186, и содержит модификации, детально описанные в Таблице 2. Предпочтительные молекулы днРНК, включающие модифицированные нуклеотиды, перечислены в Таблицах 2-4, из них наиболее предпочтительные молекулы днРНК представлены в SEQ ID No: 321/485, 322/486, 324/488, 325/489, 326/490, 327/491, 328/492 и 350/514.

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

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

В другом варианте реализации, предусматривается последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует кодирующую цепь и/или не кодирующую цепь, включенную в днРНК, как определено в настоящей заявке.

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

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

(а) введение в клетку, ткань или организм двунитевой рибонуклеиновой кислоты

(днРНК), как определено в настоящей заявке; и

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

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

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

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

322/486 и 346/510, 322/486 и 330/494 и 322/486 и 324/488.

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

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

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

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

ими: хронический гепатит (ХГ), цирроз печени (ЦП) и гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК).

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

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

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

Молекулы днРНК, специфичные к гену вируса гепатита В, предусмотренные в настоящей заявке, или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие отдельные цепи этих молекул днРНК согласно настоящему изобретению, можно также встраивать в векторы и применять в качестве векторов генной терапии для пациентов людей. Векторы генной

терапии можно доставлять субъекту посредством, например, внутривенной инъекции, местного введения (см. Патент США 5,328,470) или посредством стереотаксической инъекции (см., например Chen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91:3054-3057). Фармацевтический препарат вектора генной терапии может включать вектор генной терапии в подходящем растворителе или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включен наполнитель для доставки генов. В качестве альтернативы, если полноценный вектор доставки генов можно в готовом виде получить из рекомбинантных клеток, например, ретровирусные векторы, фармацевтические препараты могут включать одну или более клеток, которые продуцируют систему доставки генов.

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

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

Векторы, экспрессирующие рекомбинантную днРНК, предпочтительно представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Вирусные векторы, экспрессирующие днРНК, можно сконструировать на основе, но не ограничиваясь ими, аденоассоциированного вируса (для обзора, см. Muzyczka et al., *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129); аденовируса (см., например, Berkner et al., *BioTechniques* (1998) 6:616; Rosenfeld et al. *Science* (1991) 252:431-434; и Rosenfeld et al. *Cell* (1992) 68:143-155); или альфавируса, а также других, известных в данной области техники. Ретровирусы использовали для введения множества генов в клетки различных типов,

включая эпителиальные клетки, *in vitro* и/или *in vivo* (см., например, Danos and Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 85:6460-6464). Рекомбинантные ретровирусные векторы, способные трансдуцировать и экспрессировать гены, встроенные в геном клетки, можно получать путем трансфицирования рекомбинантного ретровирусного генома в подходящие пакующие клеточные линии, такие как PA317 и Psi-CRIP (Comette et al., *Human Gene Therapy* (1991) 2:5-10; Cone et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984) 81:6349). Рекомбинантные аденовирусные векторы можно использовать для инфицирования широкого разнообразия клеток и тканей в восприимчивых хозяевах (например, крыса, хомяк, собака и шимпанзе) (Hsu et al., *J. Infectious Disease*, (1992) 166:769); они обладают преимуществом, которое заключается в отсутствии потребности в миотически активных клетках для инфицирования.

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

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

Рекомбинантные векторы, обеспечивающие экспрессию молекул днРНК, предпочтительно доставляют, как описано ниже, и поддерживают в клетках-мишенях. В качестве альтернативы, можно использовать вирусные векторы, которые обеспечивают

временную экспрессию молекул днРНК. Такие векторы при необходимости можно вводить неоднократно. Один раз экспрессированная днРНК связывается с РНК-мишенью и модулирует ее функцию или экспрессию. Доставка векторов, экспрессирующих днРНК, может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения в клетки-мишени, отобранные от пациента, с последующим повторным введением пациенту, или может осуществляться любым другим способом, который позволяет введение в желаемую клетку-мишень.

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

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

Определения

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

Каждый из «G», «C», «A», «U» и «T» или «dT» соответственно обычно означает нуклеотид, который содержит в качестве основания гуанин, цитозин, аденин, урацил и дезокситимидин, соответственно. Однако термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более детально описано

ниже, или к заместительной группе-заменителю. Последовательности, включающие такие заместительные группы, представляют собой варианты реализации настоящего изобретения. Как детально описано ниже, описанные в настоящей заявке молекулы днРНК могут также включать «липкие концы», т.е. неспаренные выступающие нуклеотиды, которые не вовлечены непосредственно в двунитевую структуру РНК, в норме образуемую определенной в настоящей заявке парой «кодирующей цепи» и «некодирующей цепи». Часто такой выступающий участок содержит нуклеотид дезокситимидин, а в большинстве вариантов реализации – два дезокситимидина на 3'-конце. Такие липкие концы будут описаны и проиллюстрированы ниже.

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

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

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

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

модифицированные нуклеотиды.

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

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

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

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

Термин «двунитевая РНК», «молекула днРНК» или «днРНК», используемый в настоящей заявке, относится к молекуле рибонуклеиновой кислоты или к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющих структуру дуплекса, включающую две антипараллельные и в значительной степени комплементарные цепи нуклеиновой кислоты. Две цепи, образующие структуру дуплекса, могут представлять собой различные части одной большей молекулы РНК или могут представлять собой отдельные молекулы РНК. Когда две цепи являются частями одной большей молекулы, в результате чего являются соединенными непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и

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

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

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

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

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

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

Термин «фиброзные состояния», используемый в настоящей заявке, относится к

функциональной проблеме органов, которая может быть вызвана ростом фиброзной ткани. Примером такого типа заболевания является цирроз печени (ЦП).

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

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

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

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

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

Как проиллюстрировано в прилагаемых примерах и прилагаемых Таблицах, представленных в настоящей заявке, молекулы днРНК согласно настоящему изобретению способны ингибировать экспрессию вируса гепатита В по меньшей мере на 60%, предпочтительно по меньшей мере на 70%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 80% в анализе *in vitro*, т.е. *in vitro*. Термин «*in vitro*», используемый в настоящей заявке,

включает, но не ограничивается им, анализ на культуре клеток. Специалист в данной области техники может легко определить степень такого ингибирования и связанных с ним эффектов, в частности в свете анализов, представленных в настоящей заявке.

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

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

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

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

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

является эффективным для получения предполагаемого фармакологического, терапевтического или превентивного результата.

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

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

Фармацевтические композиции для внутримышечного, подкожного и внутривенного применения согласно настоящему изобретению будут обычно поставляться в стерильных водных растворах или суспензиях, забуференных до подходящего рН и изотоничности. В предпочтительном варианте реализации, носитель состоит исключительно из водного буфера. В данном контексте, «исключительно» означает отсутствие вспомогательных агентов или инкапсулирующих субстанций, которые могут влиять или опосредовать захват днРНК клетками, экспрессирующими ген вируса гепатита В. Водные суспензии в соответствии с настоящим изобретением могут включать суспендирующие агенты, такие как производные целлюлозы, альгинат натрия, поливинил-пирролидон и трагантовую камедь, и увлажняющий агент, такой как лецитин. Подходящие консерванты для водных суспензий включают этил и n-пропил р-

гидроксibenзоат. Фармацевтические композиции, полезные в соответствии с настоящим изобретением, также включают инкапсулированные составы для защиты днРНК от быстрого выведения из организма, такие как составы с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфир и полимолочную кислоту. Способы приготовления таких составов будут очевидными специалистам в данной области техники. В качестве фармацевтически приемлемых носителей можно также использовать липосомальные суспензии и биспецифические антитела. Их можно приготовить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, описанными в публикации РСТ WO91/06309 и WO2011/003780, которые включены посредством ссылки в настоящую заявку.

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

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

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

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

днРНК согласно настоящему изобретению могут содержать одно или более

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

Как указано выше, по меньшей мере один конец/одна цепь днРНК может иметь одноцепочечный липкий конец, состоящий из от 1 до 5, предпочтительно 1 или 2 нуклеотидов. днРНК, имеющая по меньшей мере один липкий конец, имеет неожиданно превосходящие ингибиторные свойства, чем ее копия с тупыми концами. Более того, авторы настоящего изобретения установили, что наличие липкого конца из всего лишь одного нуклеотида усиливает интерферирующую активность днРНК без влияния на ее общую стабильность. Было доказано, что днРНК, имеющая только один липкий конец, является чрезвычайно стабильной и эффективной *in vivo*, также как в разнообразии клеток, культуральных сред клеток, крови и сыворотки. Предпочтительно одноцепочечный липкий конец расположен на 3'-конце некодирующей цепи или, в качестве альтернативы, на 3'-конце кодирующей цепи. днРНК может также иметь тупой конец, предпочтительно расположенный на 5'-конце некодирующей цепи. Предпочтительно некодирующая цепь днРНК имеет липкий конец на 3'-конце, и 5'-конец является тупым. В другом варианте реализации, один или более из нуклеотидов на липком конце заменены на нуклеозидтрифосфат.

днРНК согласно настоящему изобретению можно также химически модифицировать для повышения стабильности. Нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению можно синтезировать и/или модифицировать с помощью методов, прочно установившихся в данной области техники. Химические модификации могут включать, но не ограничиваться ими, 2'-модификации, введение оснований, не существующих в природе, ковалентное присоединение к лиганду и замену фосфатных связей тиофосфатными связями, инвертированные дезокситимидины. В данном варианте реализации, целостность структуры дуплекса усилена по меньшей мере одной, а предпочтительно двумя химическими связями. Химические связи можно образовать с помощью любой из разнообразия хорошо известных методик, например, путем введения ковалентных, ионных или водородных связей; гидрофобных взаимодействий, вандерваальсовых или стекинг-взаимодействий, с помощью координации ионами

металлов или посредством использования аналогов пурина. Предпочтительно химические группы, которые можно использовать для модификации днРНК, включают, без ограничения, метиленовый синий; бифункциональные группы, предпочтительно бис-(2-хлорэтил)амин; N-ацетил-N'-(p-глиоксибензоил)цистамин; 4-тиоурацил; и псорален. В одном предпочтительном варианте реализации, линкер представляет собой гекса-этиленгликолевый линкер. В данном случае днРНК получают с помощью твердофазного синтеза, и гекса-этиленгликолевый линкер встраивают в соответствии со стандартными способами (например, Williams DJ and Hall KB, *Biochem.* (1996) 35:14665-14670). В частном варианте реализации, 5'-конец некодирующей цепи и 3'-конец кодирующей цепи химически связаны посредством гекса-этиленгликолевого линкера. В другом варианте реализации, по меньшей мере один нуклеотид днРНК содержит фосфотиоатную или фосфодитиоатную группы. Химическая связь на концах днРНК предпочтительно образована связями тройной спирали.

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

В других вариантах реализации, нуклеотиды на одной или на обеих из двух отдельных цепей могут быть модифицированы для предотвращения или ингибирования активации клеточных ферментов, например, определенных нуклеаз. Методики для ингибирования активации клеточных ферментов известны в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, 2'-амино-модификации, 2'-амино-модификации сахаров, 2'-F-модификации сахаров, 2'-F-модификации, 2'-алкил-модификации сахаров, незаряженные модификации остова, модификации морфолино, 2'-О-метил-модификации и фосфорамидат (см., например, Wagner, *Nat. Med.* (1995) 1:1116-8). Таким образом, по меньшей мере одну 2'-гидроксильную группу нуклеотидов днРНК заменяют химической группой, предпочтительно 2'-амино или 2'-метильной группой. Также по меньшей мере один нуклеотид можно модифицировать для образования замкнутого нуклеотида. Такой

замкнутый нуклеотид содержит метиленовый мостик, который соединяет 2'-кислород рибозы с 4' углеродом рибозы. Введение замкнутого нуклеотида в олигонуклеотид улучшает аффинность комплементарных последовательностей и повышает температуру плавления на несколько градусов.

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

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

В некоторых случаях, конъюгация катионного лиганда с олигонуклеотидами часто приводит к улучшенной устойчивости к нуклеазам. Типичными примерами катионных

лигандов являются пропиламмоний и диметилпропиламмоний. Примечательно, что антисмысловые нуклеотиды, как было сообщено, сохраняют свою высокую связывающую аффинность к мРНК, когда катионный лиганд диспергируют по всей длине олигонуклеотида. См. Manoharan M, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* (2002) 12:103 и включенные в нее ссылки.

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

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

Указания, относящиеся к синтезу конкретных модифицированных олигонуклеотидов, можно найти в следующих Патентах США: Патенте США №

5,218,105, который описывает нуклеотиды, конъюгированные с полиамином, Патенты США №№ 5,541,307, который описывает олигонуклеотиды с модифицированными остовами; Патент США № 5,521,302, который описывает процессы для приготовления олигонуклеотидов, имеющих хиральные фосфорные связи; Патент США № 5,539,082, который описывает пептидо-нуклеиновые кислоты; Патент США № 5,554,746, который описывает олигонуклеотиды с β -лактамными остовами; Патент США № 5,571,902, который описывает способы и материалы для синтеза олигонуклеотидов; Патент США № 5,578,718, который описывает нуклеотиды, имеющие алкилтиольные группы, где такие группы можно использовать в качестве линкеров к другим группам, присоединенным к любому из множества положений нуклеозида; Патент США № 5,587,361, который описывает олигонуклеотиды, имеющие фосфотиоатные связи высокой хиральной чистоты; Патент США № 5,506,351, который описывает процессы приготовления 2'-О-алкилгуанозина и родственных соединений, включая соединения 2,6-диаминопурина; Патент США № 5,587,469, который описывает олигонуклеотиды, имеющие N-2-замещенные пурины; Патент США № 5,587,470, который описывает олигонуклеотиды, имеющие 3дезапурины; Патент США № 5,608,046, который описывает конъюгированные с аналогами 4'десметильного нуклеозида; Патент США № 5,610,289, который описывает остов-модифицированные аналоги нуклеотидов; Патент США № 6,262,241, который описывает, среди прочего, способы синтеза 2'-фтор-олигонуклеотидов.

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

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

синтезируют с помощью автоматического синтезатора, используя фосфорамидиты, происходящие от конъюгатов лиганд-нуклеозид в дополнение к коммерчески доступным фосфорамидитам.

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

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

В одном предпочтительном варианте реализации способов согласно настоящему изобретению, получение олигонуклеотидов, конъюгированных с лигандом, начинают с выбора молекул подходящего предшественника, на основании которого конструируют молекулу лиганда. Обычно предшественник представляет собой соответствующим образом защищенное производное широко используемых нуклеозидов. Например, синтетические предшественники для синтеза олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению, конъюгированных с лигандом, включают, но не ограничиваются ими, 2'-аминоалкилокси-5'-ODMT-нуклеозиды, 2'-аминоалкиламино-5'-ODMT-нуклеозиды, 5'-6-аминоалкокси-2'-дезоксинуклеозиды, 5'-6-аминоалкокси-2'-защищенные-нуклеозиды, 3'-6-

аминоалкокси -5'-ODMT- нуклеозиды и 3'-аминоалкиламино-5'-ODMT-нуклеозиды, которые могут быть защищены в части нуклеинового основания молекулы. Способы синтеза таких аминосвязанных защищенных предшественников нуклеозидов известны среднему специалисту в данной области техники.

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

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

Дополнительно защитные группы для аминогрупп включают, но не ограничиваются ими, карбаматные защитные группы, такие как 2-триметилсилилэтоксикарбонил (Teoc), 1-метил-1-(4-бифенилил)-этоксикарбонил (Broc), t-бутоксикарбонил (BOC), аллилоксикарбонил (Alloc), 9флуоренил-метилоксикарбонил (Fmoc) и бензилоксикарбонил (Cbz); амидные защитные группы, такие как формил, ацетил, тригалоацетил, бензоил и нитрофенилацетил; сульфонамидные защитные группы, такие как 2-нитробензенсульфонил; и имино- и циклические имидные защитные группы, такие как фталимид и дитиасукциноил. Соединения и способы согласно настоящему изобретению также предусматривают эквиваленты этих аминозащитных групп.

Многие твердые подложки являются коммерчески доступными, и средний специалист в данной области техники может легко выбрать твердую подложку для использования на этапах твердофазного синтеза. В определенных вариантах реализации, используют универсальные подложки. Универсальная подложка, хорошо известная в

данной области техники, позволяет получать олигонуклеотиды, имеющие необычные или модифицированные нуклеотиды, расположенные на 3'-конце олигонуклеотида. В дополнение, было сообщено, что олигонуклеотид можно удалить с универсальной подложки под действием более мягких условий реакции, если олигонуклеотид присоединен к твердой подложке посредством син-1,2-ацетоксифосфатной группы, которая легче подвергается щелочному гидролизу. См. Guzaev AI, and Manoharan MJ. *Am. Chem. Soc.* (2003) 125:2380.

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

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

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

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

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

Типичные Патенты Соединенных Штатов, имеющие отношение к получению вышеописанных связей, содержащих атом фосфора, включают, но не ограничиваются ими, Патенты США №№ 4,469,863, 5,023,243, 5,264,423, 5,321,131, 5,399,676, 5,405,939, 5,453,496, 5,455,233 и 5,466,677, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки.

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

Типичные Патенты Соединенных Штатов, имеющие отношение к получению вышеописанных олигонуклеотидов, включают, но не ограничиваются ими, Патенты США №№ 5,034,506, 5,214,134, 5,216,141, 5,264,562, 5,466,677, 5,470,967, 5,489,677, 5,602,240 и 5,663,312, каждый из которых включен в настоящую заявку посредством ссылки.

В других предпочтительных миметиках олигонуклеотидов, как сахар, так и внутринуклеозидная связь (т.е. остов) единиц нуклеозидов замещены новыми группами. Единицы нуклеинового основания поддерживаются для гибридизации с соответствующим соединением-мишенью нуклеиновой кислоты. Один такой нуклеотид, миметик олигонуклеотида, для которого были продемонстрированы превосходные

гибридизационные свойства, называют пептидо-нуклеиновой кислотой (ПНК). В соединениях ПНК сахарный остов олигонуклеотида замещен амидосодержащим остовом, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания сохраняются и являются связанными непосредственно или опосредованно с атомами амидной части остова. Указания относительно соединений ПНК можно найти, например, в Патенте США № 5,539,082.

Некоторые предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения применяют олигонуклеотиды с фосфотиоатными связями и олигонуклеотиды с гетероатомными остовами, в частности $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ [известный как метиленовый (метилямино) или MMI остов], $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ и $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ [где нативный фосфодиэфирный остов представлен как $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$] согласно данной выше ссылке на Патент США № 5,489,677, и амидные остовы согласно данной выше ссылке на Патент США № 5,602,240. Также предпочтительными являются олигонуклеотиды, имеющие остов из структур морфолино согласно данной выше ссылке на Патент США № 5,034,506.

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

Другие нуклеиновые основания включают основания, раскрытые в Патенте США № 3,687,808, или каким-либо другим образом известные в данной области техники или коммерчески доступные. Некоторые из этих нуклеиновых оснований являются особенно

полезными для повышения связывающей аффинности олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6- азапиримидины и N-2, N-6 и O-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Замены на 5метилцитозин, как было показано, повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,61,2°C и являются в настоящее время предпочтительными заменами оснований, даже более предпочтительными при комбинации с 2'-метоксиэтиловыми модификациями сахара.

Примеры патентов Соединенных Штатов, имеющие отношение к получению некоторых из вышеупомянутых модифицированных нуклеиновых оснований, также как и других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, но не ограничиваются ими, Патент США № 3,687,808, а также Патенты США №№ 5,134,066, 5,459,255, 5,552,540, 5,594,121 и 5,596,091, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

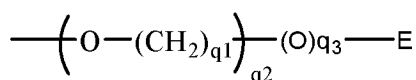
В некоторых вариантах реализации, олигонуклеотиды, применяемые в олигонуклеотидах согласно настоящему изобретению, конъюгированных с лигандами, могут дополнительно или в качестве альтернативы включать одну или более замещенных групп сахаров. Предпочтительные олигонуклеотиды включают одну из следующих групп в положении 2': OH; F; O-, S- или N-алкил, O-, S- или N-алкенил или O, S- или N-алкенил, где алкил, алкенил и алкинил могут представлять собой замещенные или незамещенные с C₁-C₁₀ алкил или C₂ - C₁₀ алкенил и алкинил. Особенно предпочтительными являются O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m представляют собой числа от 1 до приблизительно 10. Другие предпочтительные олигонуклеотиды включают одну из следующих групп 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, SO₂ CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокалкиламино, полиалкиламино, замещенный силил и РНК-расщепляющая группа, репортерная группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств олигонуклеотида или группа для улучшения фармакодинамических свойств олигонуклеотида и другие заместители, имеющие подобные свойства. Предпочтительная модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ), т.е., алкоксиалкоксигруппу. Еще одна предпочтительная модификация включает 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е., группу O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известную как 2'-DMAOE, как описано в Патенте США № 6,127,533.

Другие предпочтительные модификации включают 2'-метокси (2'-O-CH₃), 2'-

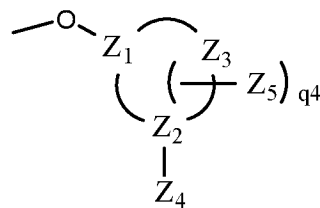
аминопропокси ($2'\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) и 2'-фтор (2'-F). Подобные модификации можно также осуществить в других положениях олигонуклеотида, особенно в положении 3' сахара на 3' -концевом нуклеотиде или в 2'-5' связанных олигонуклеотидах.

Используемый в настоящей заявке термин «замещающая группа сахара» или «2'-замещающая группа» включает группы, присоединенные к положению 2' рибофуранозильной группы с или без атома кислорода. Замещающие группы сахара включают, но не ограничиваются ими, фтор, О-алкил, Оалкиламино, О-алкилалкокси, защищенную О-алкиламино, О-алкиламиноалкил, О-алкилимидазол и полиэфиры формулы (О-алкил) m , где m представляет собой число от 1 до приблизительно 10. Предпочтительными среди этих полиэфиров являются линейные и циклические полиэтиленгликоли (PEG) и (PEG)-содержащие группы, такие как краун-эфиры и, среди прочего, раскрытые Delgado с соавт. (*Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* (1992) 9:249). Дополнительные модификации сахаров были раскрыты Cook (*Anti-fibrosis Drug Design*, (1991) 6:585-607). Фтор, О-алкил, Оалкиламино, О-алкилимидазол, О-алкиламиноалкил и алкиламино-заместители описаны в Патенте США № 6,166,197 под названием «Олигомерные соединения, имеющие пиримидиновый(ые) нуклеотид(ы) с 2' и 5'-заместителями», включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

Дополнительные замещающие группы сахара, соответствующие настоящему изобретению, включают группы 2'-SR и 2'-NR₂, где каждый R представляет собой независимо водород, защитную группу или замещенный или незамещенный алкил, алкенил или алкинил. Нуклеозиды 2'-SR раскрыты в Патенте США № 5,670,633, включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Включение синтонов мономера 2'-SR раскрыто Hamm с соавторами (*J. Org. Chem.*, (1997) 62:3415-3420). Нуклеозиды 2'NR раскрыты Thomson JB, *J. Org. Chem.*, (1996) 61:6273-6281; и Polushin с соавторами, *Tetrahedron Lett.*, (1996) 37:3227-3230. Еще одни типичные 2'-замещенные группы, соответствующие настоящему изобретению, включают замещенные группы, имеющие группу согласно формуле I или II:



I



II

где

Е представляет собой C_1-C_{10} алкил, $N(Q3)(Q4)$ или $N=C(Q3)(Q4)$; каждый из Q3 и Q4 представляет собой, независимо, H, C_1-C_{10} алкил, диалкиламиноалкил, защитную группу азота, связанную или несвязанную группу конъюгата, линкер к твердой подложке, или Q3 и Q4, оба вместе образуют защитную группу азота или кольцевую структуру, дополнительно включающую по меньшей мере один дополнительный гетероатом, который выбирают из N и O;

q1 представляет собой число от 1 до 10;

q2 представляет собой число от 1 до 10;

q3 представляет собой 0 или 1;

q4 представляет собой 0, 1 или 2;

каждый из Z1, Z2 и Z3 представляет собой, независимо, C_4-C_7 циклоалкил, C_5-C_{14} арил или C_3-C_{15} гетероциклил, где гетероатом в указанной гетероциклильной группе выбирают из кислорода, азота и серы;

Z4 представляет собой OM1, SM1 или $N(M1)_2$; каждый M1 представляет собой, независимо, H, C_1-C_8 алкил, C_1-C_8 галоалкил, $C(=NH)N(H)M2$, $C(=O)N(H)M2$ или $OC(=O)N(H)M2$; M2 представляет собой H или C_1-C_8 алкил; и

Z5 представляет собой C_1-C_{10} алкил, C_1-C_{10} галоалкил, C_2-C_{10} алкенил, C_2-C_{10} алкинил, C_6-C_{14} арил, $N(Q3)(Q4)$, OQ3, гало, SQ3 или CN.

Типичные замещающие группы для 2'-О-сахаров согласно формуле I раскрыты в Патенте США № 6,172,209 под названием «Кэпированные 2'-оксиэтокси-олигонуклеотиды», включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте. Типичные циклические замещающие группы для 2'-О-сахаров согласно формуле II раскрыты в Патенте США № 6,271,358 под названием «Нацеленные на РНК 2'-модифицированные олигонуклеотиды, которые являются конформационно предварительно организованными», включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей своей полноте.

Сахара, имеющие О-заместители на рибозильном кольце, также соответствуют настоящему изобретению. Типичные заместители для О кольца включают, но не ограничиваются ими, S, CH_2 , CHF и CF_2 .

Олигонуклеотиды могут также иметь миметики сахара, такие как циклобутиловые группы, вместо пентофуранозного сахара. Типичные Патенты Соединенных Штатов, относящиеся к получению таких модифицированных сахаров, включают, но не ограничиваются ими, Патенты США №№ 5,359,044, 5,466,786, 5,519,134, 5,591,722, 5,597,909, 5,646,265 и 5,700,920, все из которых включены в настоящую заявку посредством ссылки.

Дополнительные модификации можно также вводить в других положениях олигонуклеотида, особенно в положении 3' сахара на 3'-концевом нуклеотиде. Например, одна дополнительная модификация олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению, конъюгированных с лигандом, включает химическое связывание с олигонуклеотидом одной или более дополнительных нелигандных групп или конъюгатов, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточный захват олигонуклеотида. Такие группы включают, но не ограничиваются ими, липидные группы, такие как группа холестерина (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989) 86:6553), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (1994) 4:1053), тиоэфир, например, гексил-S-тримитилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1992) 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (1993) 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, (1992) 20:533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, (1991) 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, (1990) 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, (1993) 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, (1995) 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, (1990) 18:3777), полиаминовую или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, (1995) 14:969) или уксусную кислоту адамантана (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, (1995) 36:3651), палмитильную группу (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, (1995) 1264:229), или октадециламин- или гексиламинокарбонил-оксихолестериновую группу (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1996) 277:923).

Настоящее изобретение также охватывает композиции, в которых используют олигонуклеотиды, которые являются в значительной степени хирально чистыми по отношению к конкретным положениям олигонуклеотидов. Примеры в значительной степени хирально чистых олигонуклеотидов включают, но не ограничиваются ими, олигонуклеотиды, имеющие фосфотиоатные связи, которые по меньшей мере на 75% являются Sp или Rp (Cook et al., Патент США № 5,587,361), и олигонуклеотиды, имеющие в значительной степени хирально чистые (Sp или Rp) алкилфосфонатные, фосфорамидатные или фосфотриэфирные связи (Cook, Патенты США №№ 5,212,295 и 5,521,302).

В некоторых случаях, олигонуклеотид можно модифицировать с помощью нелигандной группы. Количество нелигандных молекул, конъюгированных с олигонуклеотидами с целью повышения активности, улучшения клеточного распределения или клеточного захвата олигонуклеотида, и процедуры для осуществления такого конъюгирования доступны в научной литературе. Такие нелигандные группы

включают липидные группы, такие как холестерин (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989, 86:6553), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (1994) 4:1053), тиозфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, (1992) 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, (1993) 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, (1992) 20:533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, (1991) 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, (1990) 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, (1993) 75:49), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтиламмоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, (1995) 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, (1990) 18:3777), полиаминовую или полиэтиленгликолевую цепь (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, (1995) 14:969) или уксусную кислоту адамантана (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, (1995) 36:3651), палмитильную группу (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, (1995) 1264:229), или октадециламин- или гексиламинокарбонил-оксихолестериновую группу (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, (1996) 277:923). Типичные процедуры конъюгации включают синтез олигонуклеотидов, несущих аминокликер в одном или более положениях последовательности. Аминогруппа затем реагирует с конъюгируемой молекулой, при участии соответствующего связывающего или активирующего агента. Реакцию конъюгации можно осуществлять с олигонуклеотидом, который остается связанным с твердой подложкой, или после отделения олигонуклеотида в жидкой фазе. Очистка конъюгата олигонуклеотидов с помощью ВЭЖХ обычно позволяет получать чистый конъюгат.

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

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

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

Также были представлены пути и способы введения молекул днРНК. Например, направленная доставка с помощью гликозилированных и модифицированных фолиевой кислотой молекул, включая использование полимерных носителей с лигандами, такими как галактоза и лактоза, или присоединение фолиевой кислоты к различным макромолекулам, позволяет осуществлять связывание молекул, которые необходимо доставить, с рецепторами фолиевой кислоты. Известна направленная доставка с помощью пептидов и белков, отличных от антител, например, включая RGDмодифицированные наночастицы для доставки миРНК *in vivo* или мультикомпонентные (невирусные) системы доставки, включая короткие циклодекстрины, адамантин-PEG. Также предусмотрена направленная доставка с использованием антител или фрагментов антител, включая (моновалентные) Fab-фрагменты антитела (или другие фрагменты такого антитела) или одноцепочечные антитела. Подходы для инъекций для целевой направленной доставки включают, среди прочего, гидродинамическую внутривенную инъекцию. Также для направленной доставки можно использовать холестериновые конъюгаты днРНК, где конъюгация с липофильными группами повышает клеточный захват и улучшает фармакокинетику и биораспределение олигонуклеотидов в тканях. Также известны катионные системы доставки, в соответствии с которыми синтетические векторы с результирующим положительным (катионным) зарядом облегчают образование комплекса с полианионной нуклеиновой кислотой и взаимодействие с отрицательно заряженной мембраной клетки. Такие катионные системы доставки включают также катионные липосомальные системы доставки, катионные системы доставки на основе полимеров и пептидов. Другие системы доставки для клеточного захвата днРНК/миРНК представляют собой аптамерные дс/миРНК. Также подходы генной терапии могут быть использованы для доставки молекул днРНК согласно настоящему изобретению или молекул нуклеиновой кислоты, их кодирующих. Такие системы включают использование непатогенных вирусов, модифицированных вирусных векторов, а также доставку посредством наночастиц или липосом. Другие способы доставки для клеточного захвата днРНК являются экстракорпоральными, например, обработка клеток, органов и тканей *ex*

vivo. Некоторые из этих технологий описаны и обобщены в публикациях, таких как Akhtar, *Journal of Clinical Investigation* (2007) 117:3623-3632, Nguyen et al., *Current Opinion in Molecular Therapeutics* (2008) 10:158-167, Zamboni, *Clin Cancer Res* (2005) 11:8230-8234 or Ikeda et al., *Pharmaceutical Research* (2006) 23:1631-1640.

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

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

ПРИМЕРЫ

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

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

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

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

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

Последовательности длиной 19 нуклеотидов определяли как скрывающие выбранные 17меры в положениях со 2 по 18.

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

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

Отделение и снятие защитных групп с присоединенного к подложке олигомера. После окончания твердофазного синтеза удаляли цианоэтильные защитные группы с

помощью 30-минутной обработки 20% диэтиламином в ацетонитриле без отделения олигонуклеотидов от подложки. Затем высушенную твердую подложку переносили в пробирку вместимостью 15 мл и обрабатывали концентрированным водным аммиаком (Aldrich) в течение 18 ч при 40°C. После центрифугирования супернатант переносили в новую пробирку и промывали стекла с контролируемым размером пор водным аммиаком. Объединенные растворы испаряли, твердый остаток растворяли в буфере А (см. ниже).

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

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

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

Создание векторов psiCHECK, содержащих последовательности-мишени. С

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

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

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

Данные относительно ингибирования представлены в прилагаемой Таблице 2.

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

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

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

Применяли следующий градиент:

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

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты, способная ингибировать экспрессию гена вируса гепатита В, причем указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты включает смысловую цепь и антисмысловую цепь, где указанная антисмысловая цепь по меньшей мере частично комплементарна указанной смысловой цепи, где указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты специфично таргетирует консенсусную последовательность среди геномных последовательностей генотипа А, В, С и D вируса гепатита В, где указанная консенсусная последовательность представляет собой 5' GUGUGCACUUCGCUUCA или 5' UGUGCACUUCGCUUCAC, и где указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

2. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по п. 1, где указанная смысловая цепь содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности по меньшей мере части мРНК вируса гепатита В, где указанная последовательность расположена в области комплементарности указанной смысловой цепи указанной антисмысловой цепи, и где указанная часть мРНК вируса гепатита В имеет консенсусную последовательность среди геномных последовательностей генотипа А, В, С и D вируса гепатита В, где указанная консенсусная последовательность представляет собой 5' GUGUGCACUUCGCUUCA или 5' UGUGCACUUCGCUUCAC.

3. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по п. 1 или 2, где указанная смысловая цепь содержит последовательность 5' GUGUGCACUUCGCUUCA или 5' UGUGCACUUCGCUUCAC.

4. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, где указанная антисмысловая цепь дополнительно содержит 3'-липкий конец длиной 1-5 нуклеотидов.

5. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по п. 4, где указанная антисмысловая цепь содержит 3' липкий конец длиной 1-2 нуклеотида.

6. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по п. 4 или 5, где указанный липкий конец антисмысловой цепи содержит урацил.

7. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 4-6, где 5'-конец антисмысловой цепи является тупым.

8. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из группы, состоящей из: 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего

5'-фосфотиоатную группу, терминального нуклеотида, связанного с производным холестерина, терминального нуклеотида, связанного с бисдециламидной группой додекановой кислоты, 2'-дезоксигуанидина, 2'-дезоксигуанидина, 2'-дезоксигуанидина, замкнутого нуклеотида, нуклеотида, лишенного азотистого основания, дезокситимидина, инвертированного дезокситимидина, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида морфолино, фосфорамидата и нуклеотида, включающего основание, не встречающееся в природе.

9. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по п. 6, где указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере один следующих модифицированных нуклеотидов: 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, и дезокситимидина.

10. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты имеет длину дуплекса в диапазоне 16-30 нуклеотидов.

11. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты имеет длину дуплекса 19, 21 или 23 нуклеотида.

12. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где указанная молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты имеет длину дуплекса 19 нуклеотидов.

13. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по п. 1, которая конъюгирована с лигандом.

14. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по п. 13, где указанный лиганд представляет собой кластер углеводов.

15. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где указанная антисмысловая цепь содержит SEQ ID NO: 257 (5' GGUGAAGCGAAGUGCACAC) или SEQ ID NO:228 (5' GUGAAGCGAAGUGCACACG).

16. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из предшествующих пунктов, где указанная смысловая цепь содержит SEQ ID NO:94 (5' GUGUGCACUUCGCUUCACC) или SEQ ID NO:65 (5' CGUGUGCACUUCGCUUCAC).

17. Фармацевтическая композиция, содержащая молекулу двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-16.

18. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-16 или фармацевтическая композиция по п. 17 для применения в качестве лекарственного средства.

19. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция по п. 18, где указанное лекарственное средство предназначено для применения в лечении пациента, инфицированного вирусом гепатита В.

20. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-16 или фармацевтическая композиция по п. 17 для применения в способе лечения субъекта, имеющего хроническое заболевание печени.

21. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-16 или фармацевтическая композиция по п. 17 для применения в лечении инфекции вируса гепатита В у пациентов, ко-инфицированных гепатитом С, гепатитом D или вирусом иммунодефицита человека.

22. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-21, где указанный пациент ко-инфицирован различными генотипами вируса гепатита В.

23. Молекула двунитевой рибонуклеиновой кислоты или фармацевтическая композиция по любому из пп. 19-22, где молекулу двунитевой рибонуклеиновой кислоты или фармацевтическую композицию вводят внутримышечно, подкожно или внутривенно.

По доверенности

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

SEQ ID NO	Последовательность кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID NO	Последовательность не кодирующей цепи (5'-3')
1	CAAGGUAUGUUGCCCGUUU	157	AAACGGGCAACAUACCUUG
2	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	158	TACCAAUUUUAUGCCUACAG
3	UCUGCGGCGUUUUAUCAUA	159	UAUGAUAAAACGCCGCAGA
3	UCUGCGGCGUUUUAUCAUA	160	TAUGAUAAAACGCCGCAGA
4	ACCUCUGCCUAAUCAUCUC	161	GAGAUGAUUAGGCAGAGGU
5	UUUACUAGUGCCAUUUGUA	162	TACAAUUGGCACUAGUAAA
6	ACCUCUGCCUAAUCAUCUA	163	TAGAUGAUUAGGCAGAGGU
7	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	164	GACCAAUUUUAUGCCUACAG
8	UGUCUGCGGCGUUUUAUCA	165	UGAUAAAACGCCGCAGACA
8	UGUCUGCGGCGUUUUAUCA	166	TGAUAAAACGCCGCAGACA
9	UACUAGUGCCAUUUGUUA	167	UGAACAAUUGGCACUAGUA
9	UACUAGUGCCAUUUGUUA	168	TGAACAAUUGGCACUAGUA
10	CAACUUUUUCACCUUGCA	169	TGCAGAGGUGAAAAAGUUG
11	CCAUUUGUUCAGUGGUUCG	170	CGAACCACUGAACAAUUGG
12	CCAAGUGUUUGCUGACGCA	171	UGCGUCAGCAAACACUUGG
12	CCAAGUGUUUGCUGACGCA	172	TGCGUCAGCAAACACUUGG
13	CCAUUUGUUCAGUGGUUA	173	TGAACCACUGAACAAUUGG
14	UUUACUAGUGCCAUUUGUU	174	AACAAUUGGCACUAGUAAA
15	CACCUUGGCCUAAUCAUCA	175	TGAUGAUUAGGCAGAGGUG
16	CUGGCUCAGUUUACUAGUG	176	CACUAGUAAACUGAGCCAG
17	CAAGGUAUGUUGCCCGUUA	177	TAACGGGCAACAUACCUUG
18	CUGGCUCAGUUUACUAGUA	178	TACUAGUAAACUGAGCCAG
19	GAGGCUGUAGGCAUAAAUU	179	AAUUUAUGCCUACAGCCUC
20	CAGUUUACUAGUGCCAUUU	180	AAUUGGCACUAGUAAACUG
21	AGGUAUGUUGCCCGUUUGU	181	ACAAACGGGCAACAUACCU
22	UAUGUUGCCCGUUUGUCCA	182	UGGACAAACGGGCAACAU
23	GAGGCUGUAGGCAUAAUA	183	TAUUUAUGCCUACAGCCUC
24	GUCUGCGGCGUUUUAUCAU	184	AUGAUAAAACGCCGCAGAC
25	CAACUUUUUCACCUUGCC	185	GGCAGAGGUGAAAAAGUUG
26	CCGUGUGCACUUCGCUUCA	186	UGAAGCGAAGUGCACACGG
26	CCGUGUGCACUUCGCUUCA	187	TGAAGCGAAGUGCACACGG
27	UCAAGGUAUGUUGCCCGUA	188	TACGGGCAACAUACCUUGA
28	CAGUUUACUAGUGCCAUUA	189	TAAUGGCACUAGUAAACUG
29	UGGUGGACUUCUCUCAAUU	190	AAUUGAGAGAAGUCCACCA
30	AGGUAUGUUGCCCGUUUGA	191	TCAAACGGGCAACAUACCU
31	CUGCUCGUGUUACAGGCGG	192	CCGCCUGUAAACAGAGCAG
32	UAUGUUGCCCGUUUGUCCU	193	AGGACAAACGGGCAACAU
33	UCAAGGUAUGUUGCCCGUU	194	AACGGGCAACAUACCUUGA
34	UCUUAUCAACACUUCGGA	195	UCCGGAAGUGUUGAUAGA
34	UCUUAUCAACACUUCGGA	196	TCCGGAAGUGUUGAUAGA
35	CACCUUGGCCUAAUCAUCU	197	AGAUGAUUAGGCAGAGGUG
36	AUAAGAGGACUCUUGGACU	198	AGUCCAAGAGUCCUCUUAU
37	GUCUGCGGCGUUUUAUCAA	199	TUGAUAAAACGCCGCAGAC
38	GGCGCUGAAUCCCGCGGAC	200	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC

ФИГ. 1

39	CGCGUCGCAGAAGAUUCUA	201	UGAGAUUCUUCUGCGACGCG
40	AAUGUCAACGACCGACCUU	202	AAGGUCGGUCGUUGACAUU
41	GCUCAGUUUACUAGUGCCA	203	UGGCACUAGUAAACUGAGC
42	UGGUGGACUUCUCUCAAUA	204	TAUUGAGAGAAGUCCACCA
43	AUCGCCGCGUCGCAGAAGA	205	UCUUCUGCGACGCGGCGAU
44	GCCAUUUGUUCAGUGGUUC	206	GAACCACUGAACAAAUGGC
45	CGAUCCAUACUGCGGAACU	207	AGUUCCGCAGUAUGGAUCG
46	UCACCUCUGCCUAAUCAUC	208	GAUGAUUAGGCAGAGGUGA
47	GUGGACUUCUCUCAAUUUU	209	AAAAUUGAGAGAAGUCCAC
48	GGGUCACCAUUAUUCUUGGG	210	CCCAAGAAUAUGGUGACCC
49	GCCGCGUCGCAGAAGAUUC	211	AGAUUCUUCGCGACGCGGC
50	UCAAUCGCCGCGUCGCAGA	212	UCUGCGACGCGGCGAUUGA
51	UGGAUGUGUCUGCGGCGUU	213	AACGCCGCAGACACAUCCA
52	UACUGUUAAGCCUCCAAG	214	CUUGGAGGCUUGAACAGUA
53	GUUUACUAGUGCCAUUUGU	215	ACAAAUGGCACUAGUAAAC
54	ACUAGUGCCAUUUGUUCAG	216	CUGAACAAAUGGCACUAGU
55	CCGCGUCGCAGAAGAUUC	217	GAGAUUCUUCGCGACGCGG
56	UAUCUUAUCAACACUCCG	218	CGGAAGUGUUGAUAAAGUA
57	GGCCAAAAUUCGCAGUCCC	219	GGGACUGCGAAUUUUGGCC
58	UUCACCUCUGCCUAAUCAU	220	AUGAUUAGGCAGAGGUGAA
59	CUCAGUUUACUAGUGCCAU	221	AUGGCACUAGUAAACUGAG
60	UGUUGCCCGUUUGUCCUCU	222	AGAGGACAAACGGGCAACA
61	UAGUGCCAUUUGUUCAGUG	223	CACUGAACAAAUGGCACUA
62	AGGCUGUAGGCAUAAAUUG	224	CAAUUUAUGCCUACAGCCU
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUUA	225	UAAAACGCCGCAGACACAU
63	AUGUGUCUGCGGCGUUUUA	226	TAAAACGCCGCAGACACAU
64	ACUUCGCUUCACCUCUGCA	227	UGCAGAGGUGAAGCGAAGU
65	CGUGUGCACUUCGCUUCAC	228	GUGAAGCGAAGUGCACACG
66	GUGGUGGACUUCUCUCAAU	229	AUUGAGAGAAGUCCACCAC
67	UGUGUCUGCGGCGUUUUAU	230	AUAAAACGCCGCAGACACA
68	AAGGUUUGUUGCCCGUUUG	231	CAAACGGGCAACAUACCUU
69	UCAACGACCGACCUUGAGG	232	CCUCAAGGUCGGUCGUUGA
70	CAUAAGAGGACUCUUGGAC	233	GUCCAAGAGUCCUCUUAUG
71	GUCAACGACCGACCUUGAG	234	CUCAAGGUCGGUCGUUGAC
72	AUAUUCUUGGGAACAAGAG	235	CUCUUGUUCCCAAGAUUAU
73	UGCUCGUGUACAGGCGGG	236	CCCGCCUGUAAACACGAGCA
74	CAAUCGCCGCGUCGCAGAA	237	UUCUGCGACGCGGCGAUUG
75	ACUGUUAAGCCUCCAAGC	238	GCUUGGAGGCUUGAACAGU
76	CGCCGCGUCGCAGAAGAUC	239	GAUCUUCUGCGACGCGGCG
77	CAUUUGUUCAGUGGUUCGU	240	ACGAACCACUGAACAAAUG
78	CGCUGAAUCCCGCGGACGA	241	UCGUCCGCGGGAUUCAGCG
79	UGGGUACCAUAUUCUUGG	242	CCAAGAAUAUGGUGACCCA
80	UCCUCUGCCGAUCCAUAUCU	243	AGUAUGGAUCGGCAGAGGA
81	AUGUCAACGACCGACCUUG	244	CAAGGUCGGUCGUUGACAU
82	CCUCUGCCUAAUCAUCUA	245	UGAGAUGAUUAGGCAGAGG
83	ACCGUGUGCACUUCGCUUC	246	GAAGCGAAGUGCACACGGU
84	UGCCGAUCCAUAUCGCGGA	247	UCCGCAGUAUGGAUCGGCA

ФИГ. 1 (продолжение)

85	CAGAGUCUAGACUCGUGGU	248	ACCACGAGUCUAGACUCUG
86	CUGUUAAGCCUCCAAGCU	249	AGCUUGGAGGCUUGAACAG
87	GGAGGCUGUAGGCAUAAAU	250	AUUUAUGCCUACAGCCUCC
88	AGGAGGCUGUAGGCAUAAA	251	UUUAUGCCUACAGCCUCCU
89	GGUGGACUUCUCUCAUUUU	252	AAAUUGAGAGAAGUCCACC
90	GCAACUUUUUACACCUCUGC	253	GCAGAGGUGAAAAAGUUGC
91	CUGCUCGUGUACAGGCGA	254	TCGCCUGUAACACGAGCAG
92	CUAGUGCCAUUUUGUUCAGU	255	ACUGAACAAAUGGCACUAG
93	CUGCCGAUCCAUAUCGCGG	256	CCGCAGUAUGGAUCGGCAG
94	GUGUGCACUUCGCUUCACC	257	GGUGAAGCGAAGUGCACAC
95	GCUCGUGUACAGGCGGGC	258	GCCCCCUGUAACACGAGC
96	CCUAUCUUAUCAACACUUC	259	GAAGUGUUGAUAGAUAGG
97	UCUCAAUUCGCCGCGUCGCA	260	UGCGACGCGGCGAUUGAGA
98	GCCCCGUCUGGCCUUCUCA	261	UGAGAAGGCACAGACGGGC
99	CUAUCUUAUCAACACUCC	262	GGAAGUGUUGAUAAAGAUAG
100	AUGUUGCCCCGUUUGUCCUC	263	GAGGACAAACGGGCAACAU
101	GUAUGUUGCCCCGUUUGUCC	264	GGACAAACGGGCAACAUAC
102	CUUCGCUUCACCUCUGCAC	265	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG
103	UGUGCACUUCGCUUCACCU	266	AGGUGAAGCGAAGUGCACA
104	GCCAAAUUCGAGUCCCG	267	CGGGACUGCGAAUUUUGGC
105	CCUGCUCGUGUACAGGCG	268	CGCCUGUAACACGAGCAGG
106	UGGAGUGUGGAUUCGCACU	269	AGUGCGAAUCCACACUCCA
107	AACGACCGACCUUGAGGCA	270	UGCCUCAAGGUCGGUCGUU
108	ACAGAGUCUAGACUCGUGG	271	CCACGAGUCUAGACUCUGU
109	AAUCGCCGCGUCGCAGAAG	272	CUUCUGCGACGCGGCGAUU
110	GGUAUGUUGCCCGUUUGUC	273	GACAAACGGGCAACAUACC
111	GCCGAUCCAUAUCGCGGAA	274	UUCGCGAGUAUGGAUCGGC
112	GCCCUAUCUUAUCAACACU	275	AGUGUUGAUAGAUAGGGC
113	AGUUUAUCUAGUGCCAUUUG	276	CAAUUGGCACUAGUAAACU
114	UGUCAACGACCGACCUUGA	277	UCAAGGUCGGUCGUUGACA
115	ACUUCUCUCAAUUUUCUAG	278	CUAGAAAAUUGAGAGAAGU
116	GCGCGGGACGUCCUUUGUC	279	GACAAAGGACGUCCCGCGC
117	UCUAGACUCGUGGUGGACU	280	AGUCCACCACGAGUCUAGA
118	GAUCCAUAUCGCGGAACUC	281	GAGUUCGCGAGUAUGGAUC
119	CUCUGCCGAUCCAUAUCUGC	282	GCAGUAUGGAUCGGCAGAG
120	UCUGCCGAUCCAUAUCUGCG	283	CGCAGUAUGGAUCGGCAGA
121	CCUCUGCCGAUCCAUAUCUG	284	CAGUAUGGAUCGGCAGAGG
122	GCACCUCUCUUUACGCGGU	285	ACCGCGUAAAGAGAGGUGC
123	AAGAACUCCUCGCCUCGC	286	GCGAGGCGAGGGAGUUCUU
124	GAACUCCUCGCCUCGCAG	287	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC
125	UCUCUCAAUUUUCUAGGGC	288	GCCCUAGAAAAUUGAGAGA
126	GGGCGCACCUCUCUUUACG	289	CGUAAAGAGAGGUGCGCCC
127	CCGAUCCAUAUCGCGGAAC	290	GUUCCGCGAUUGGAUCGG
128	AACUCCUCGCCUCGCAGA	291	UCUGCGAGGCGAGGGAGUU
129	CUCCUCUGCCGAUCCAUAAC	292	GUUUGGAUCGGCAGAGGAG
130	GGAGUGUGGAUUCGCACUC	293	GAGUGCGAAUCCACACUCC
131	CGGGCGCACCUCUCUUUAC	294	GUAAAGAGAGGUGCGCCC

ФИГ. 1 (продолжение)

132	GUCUCAUUCGCCGCGUCGC	295	GCGACGCGGCGAUUGAGAC
133	AUCCAUAUCUGCGGAACUCC	296	GGAGUUCGCGAGUAUGGAU
134	CGCACCUCUCUUUACGCGG	297	CCGCGUAAAGAGAGGUGCG
135	CAACGACCGACCUUGAGGC	298	GCCUCAAGGUCGGUCGUUG
136	CCAUACUGCGGAACUCCUA	299	UAGGAGUUCGCGAGUAUGG
137	UGAAUCCCGCGGACGACCC	300	GGGUCGUCCGCGGGAUUCA
138	AGAACUCCUCGCCUCGCA	301	UGCGAGGCGAGGGAGUUCU
139	GGCGCACCUCUCUUUACGC	302	GCGUAAAGAGAGGUGCGCC
140	GCGCACCUCUCUUUACGCG	303	CGCGUAAAGAGAGGUGCGC
141	GCUGAAUCCCGCGGACGAC	304	GUCGUCCGCGGGAUUCAGC
142	CACUUCGCUUACCCUCUGC	305	GCAGAGGUGAAGCGAAGUG
143	CUCAAUCGCCGCGUCGCAG	306	CUGCGACGCGGCGAUUGAG
144	UCCCGUCGGCGCUGAAUCC	307	GGAUUCAGCGCCGACGGGA
145	CUGAAUCCCGCGGACGACC	308	GGUCGUCCGCGGGAUUCAG
146	AGAGUCUAGACUCGUGGUG	309	CACCACGAGUCUAGACUCU
147	UCCAUACUGCGGAACUCCU	310	AGGAGUUCGCGAGUAUGGA
148	GCGCUGAAUCCCGCGGACG	311	CGUCCGCGGGAUUCAGCGC
149	AGUGUGGAUUCGCACUCCU	312	AGGAGUGCGAAUCCACACU
150	CCCUUGCUCGUGUACAGGC	313	GCCUGUAACACGAGCAGGG
151	GAAUCCCGCGGACGACCCG	314	CGGGUCGUCCGCGGGAUUC
152	AAGCUGUGCCUUGGGUGGC	315	GCCACCCAAGGCACAGCUU
153	GCCCUGCUCGUGUACAGG	316	CCUGUAACACGAGCAGGGC
154	GUCCCGUCGGCGCUGAAUC	317	GAUUCAGCGCCGACGGGAC
155	AUCUUAUCAACACUCCGG	318	CCGGAAGUGUUGAUAAAGAU
156	CUUAUCAACACUCCGGAA	319	UUCGGAAGUGUUGAUAAAG
156	CUUAUCAACACUCCGGAA	320	TUCCGGAAGUGUUGAUAAAG

ФИГ. 1 (продолжение)

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

				Изучение активности в репортерной системе psiCHECK2 в клетках COS7			
				10 нМ миРНК		1 нМ миРНК	
SEQ ID NO	Последовательность кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID NO	Последовательность некодирующей цепи (5'-3')	Остаточная мРНК (среднее) (%)	Стандартное отклонение (%)	Остаточная мРНК (среднее) (%)	Стандартное отклонение (%)
321	caAGGuAuGuuGcccGuuudTsdT	485	AAACGGGcAAcAuACCUUGdTsdT	13	1	13	1
322	CfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuUfgGfuAf(invdT)	486	pdTAfcCfaAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgdTsdT	8	2	14	2
323	ucuGcGGcGuuuuAucAuAdTsdT	487	uAUGAuAAAACGCCGcAGAdTsdT	15	7	29	11
324	UfcUfgCfgGfcGfuUfuUfaUfcAfuAf(invdT)	488	pdTAfuGfaUfaAfaAfcGfcCfgCfaGfadTsdT	6	2	15	4
325	accucuGccuAAucAucucdTsdT	489	GAGAUGAUuAGGcAGAGGUdTsdT	17	1	16	2
326	UfuUfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuAf(invdT)	490	pdTAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfgUfaAfadTsdT	8	0	17	1
327	AfcCfuCfuGfcCfuAfaUfcAfuCfuAf(invdT)	491	pdTAfgAfuGfaUfuAfgGfcAfgAfgGfudTsdT	6	2	19	3
328	cuGuAGGcAuAAAUuGGucdTsdT	492	GACcAAUuAUGCCuAcAGdTsdT	23	2	28	6
329	ugucuGcGGcGuuuuAucAdTsdT	493	UGAuAAAACGCCGcAGAcAdTsdT	33	3	34	10
330	UfgUfcUfgCfgGfcGfuUfuUfaUfcAf(invdT)	494	pdTGfaUfaAfaAfcGfcCfgCfaGfaCfadTsdT	6	0	20	3
331	uacuAGuGccAuuuGuucAdTsdT	495	UGAAcAAAUGGcACuAGuAdTsdT	18	3	20	2
332	UfaCfuAfgUfgCfcAfuUfuGfuUfcAf(invdT)	496	pdTGfaAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfgUfadTsdT	6	2	21	4
333	CfaAfcUfuUfuUfcAfcCfuCfuGfcAf(invdT)	497	pdTGfcAfgAfgGfuGfaAfaAfaGfuUfgdTsdT	6	2	21	3
334	ccAuuuGuucAGuGGuucGdTsdT	498	CGAACcACUGAAcAAAUGGdTsdT	12	1	21	1
335	ccAAGuGuuuGcuGAcGcAdTsdT	499	UGCGUcAGcAAAcACUUGGdTsdT	18	2	23	4
336	CfcAfaGfuGfuUfuGfcUfgAfcGfcAf(invdT)	500	pdTGfcGfuCfaGfcAfaAfcAfcUfuGfgdTsdT	8	1	23	5
337	CfcAfuUfuGfuUfcAfgUfgGfuUfcAf(invdT)	501	pdTGfaAfcCfaCfuGfaAfcAfaAfuGfgdTsdT	7	2	24	3
338	uuuAcuAGuGccAuuuGuudTsdT	502	AAcAAAUGGcACuAGuAAAdTsdT	21	2	24	4
339	CfaCfcUfcUfgCfcUfaAfuCfaUfcAf(invdT)	503	pdTGfaUfgAfuUfaGfgCfaGfaGfgUfgdTsdT	9	0	25	2
340	cuGGcucAGuuuAcuAGuGdTsdT	504	cACuAGuAAACUGAGCcAGdTsdT	34	3	29	7
341	CfaAfgGfuAfuGfuUfgCfcCfgUfuAf(invdT)	505	pdTAfaCfgGfgCfaAfcAfuAfcCfuUfgdTsdT	8	0	31	3
342	CfuGfgCfuCfaGfuUfuAfcUfaGfuAf(invdT)	506	pdTAfcUfaGfuAfaAfcUfgAfgCfcAfgdTsdT	11	3	32	5
343	gaGGcuGuAGGcAuAAAUudTsdT	507	AAUuAUGCCuAcAGCCUCdTsdT	16	1	32	8

ФИГ. 2

344	caGuuuAcuAGuGccAuuudTsdT	508	AAAUGGcACuAGuAAACUGdTsdT	37	1	33	8
345	agGuAuGuuGcccGuuuGudTsdT	509	AcAAACGGGcAAcAuACCUDTsdT	33	3	34	4
346	UfaUfgUfuGfcCfcGfuUfuGfuCfcAf(invdt)	510	pdTGfgAfcAfaAfcGfgGfcAfaCfaUfadTsdT	9	3	35	5
347	GfaGfgCfuGfuAfgGfcAfuAfaAfuAf(invdt)	511	pdTAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfgCfcUfcdTsdT	9	1	36	4
348	gucuGcGGcGuuuuAucAudTsdT	512	AUGAuAAAACGCCGcAGACdTsdT	26	3	36	14
349	caAcuuuuucAccucuGccdTsdT	513	GGcAGAGGUGAAAAAGUUGdTsdT	24	2	37	9
350	ccGuGuGcAcuucGcuucAdTsdT	514	UGAAGCGAAGUGcAcACGGdTsdT	13	1	16	5
351	CfcGfuGfuGfcAfcUfuCfcCfuUfcAf(invdt)	515	pdTGfaAfgCfgAfaGfuGfcAfcAfcGfgdTsdT	13	2	38	4
352	UfcAfaGfgUfaUfgUfuGfcCfcGfuAf(invdt)	516	pdTAfcGfgGfcAfaCfaUfaCfcUfuGfadTsdT	12	1	38	4
353	CfaGfuUfuAfcUfaGfuGfcCfaUfuAf(invdt)	517	pdTAfaUfgGfcAfcUfaGfuAfaAfcUfgdTsdT	12	2	38	5
354	ugGuGGAcuucucucAAuudTsdT	518	AAUUGAGAGAAGUCCACcAdTsdT	24	6	39	16
355	AfgGfuAfuGfuUfgCfcCfuUfuUfgAf(invdt)	519	pdTCfaAfaCfgGfgCfaAfcAfuAfcCfudTsdT	18	1	40	4
356	cuGcucGuGuuAcAGGcGGdTsdT	520	CCGCCUGuAAcACGAGcAGdTsdT	26	2	40	11
357	uauGuuGcccGuuuGuccdTsdT	521	AGGAcAAACGGGcAAcAuAdTsdT	42	1	40	3
358	ucAAGGuAuGuuGcccGuudTsdT	522	AACGGGcAAcAuACCUUGAdTsdT	31	4	42	12
359	ucuuAucAAcAcuuccGGAdTsdT	523	UCCGGAAGUGUUGAuAAGAdTsdT	35	2	43	38
360	UfcUfuAfuCfaAfcAfcUfuCfcGfgAf(invdt)	524	pdTCfcGfgAfaGfuGfuUfgAfuAfaGfadTsdT	32	2	46	3
361	caccucuGccuAAucAucdTsdT	525	AGAUGAUuAGGcAGAGGUGdTsdT	31	3	47	8
362	auAAGAGGAcucuuGGAcdTsdT	526	AGUCcAAGAGUCCUCUuAuAdTsdT	28	1	49	6
363	GfuCfuGfcGfgCfuUfuUfuAfuCfaAf(invdt)	527	pdTUfgAfuAfaAfaCfcCfcGfcAfgAfcdTsdT	15	0	51	4
364	ggcGcuGAAucccGcGGAcdTsdT	528	GUCCGCGGGAUUcAGCGCCdTsdT	24	3	51	10
365	cgcGucGcAGAAGAUcucAdTsdT	529	UGAGAUCUUCUGCGACGCGdTsdT	46	3	53	6
366	aaUGucAAcGAccGAccuudTsdT	530	AAGGUCGGUCGUUGAcAUUdTsdT	40	1	54	8
367	gcucAGuuuAcuAGuGccAdTsdT	531	UGGcACuAGuAAACUGAGCdTsdT	37	5	51	4
368	UfgGfuGfgAfcUfuCfuCfuCfaAfuAf(invdt)	532	pdTAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfcAfcCfadTsdT	20	4	58	6
369	aucGccGcGucGcAGAAGAdTsdT	533	UCUUCUGCGACGCGCGAUdTsdT	57	6	58	1
370	gccAuuuGuucAGuGGUucdTsdT	534	GAACcACUGAAcAAAUGGCdTsdT	36	3	60	6
371	cgAuuccAuAcuGcGGAAcudTsdT	535	AGUCCGcAGuAUGGAUCGdTsdT	43	8	61	9
372	ucAccucuGccuAAucAucdTsdT	536	GAUGAUuAGGcAGAGGUGAdTsdT	48	4	61	10
373	guGGAcuucucucAAuuuudTsdT	537	AAAAUUGAGAGAAGUCCAcCdTsdT	31	4	61	5
374	ggGucAccAuAuucuuGGGdTsdT	538	CCcAAGAAuAUGGUGACCCdTsdT	58	6	62	10

ФИГ. 2 (продолжение)

375	gccGcGucGcAGAAGaucudTsdT	539	AGAUCUUCUGCGACGCGGCdTsdT	59	3	64	7
376	ucAAucGccGcGucGcAGAdTsdT	540	UCUGCGACGCGGCGAUUGAdTsdT	59	1	64	9
377	ugGAuGuGucuGcGGcGuudTsdT	541	AACGCCGcAGAcAcAUCcAdTsdT	44	8	65	12
378	uacuGuucAAGccuccAAGdTsdT	542	CUUGGAGGCUUGAAcAGuAdTsdT	51	2	65	32
379	guuuAcuAGuGccAuuuGudTsdT	543	AcAAAUGGcACuAGuAAACdTsdT	44	5	66	6
380	acuAGuGccAuuuGuucAGdTsdT	544	CUGAAcAAAUGGcACuAGUdTsdT	56	0	66	5
381	ccGcGucGcAGAAGaucudTsdT	545	GAGAUUCUUCUGCGACGCGGdTsdT	59	3	67	11
382	uaucuuAucAAcAcuuccGdTsdT	546	CGGAAGUGUUGAuAAGAuAdTsdT	37	1	67	51
383	ggccAAAAuucGcAGucccdTsdT	547	GGGACUGCGAAUUUUGGCCdTsdT	49	6	67	7
384	uucAccucuGccuAAucAudTsdT	548	AUGAUuAGGcAGAGGUGAAdTsdT	50	4	68	7
385	cucAGuuuAcuAGuGccAudTsdT	549	AUGGcACuAGuAAACUGAGdTsdT	52	2	68	6
386	uguuGcccGuuuGuccucudTsdT	550	AGAGGAcAAACGGGcAacAdTsdT	50	2	69	4
387	uaGuGccAuuuGuucAGuGdTsdT	551	cACUGAAcAAAUGGcACuAdTsdT	46	1	70	8
388	agGcuGuAGGcAuAAAUuGdTsdT	552	cAAUUuAUGCCuAcAGCCUdTsdT	69	3	71	13
389	auGuGucuGcGGcGuuuuAdTsdT	553	uAAAACGCCGcAGAcAcAudTsdT	17	6	33	12
390	AfuGfuGfuCfuGfcGfgCfgUfuUfuAf(invdt)	554	pdTAfaAfaCfcGfcGfcAfgAfcAfcAfudTsdT	24	3	72	4
391	acuucGcuucAccucuGcAdTsdT	555	UGcAGAGGUGAAGCGAAGUdTsdT	49	4	73	4
392	cguGuGcAcuucGcuucAcdTsdT	556	GUGAAGCGAAGUGcAcACGdTsdT	45	3	73	10
393	guGGuGGAcuucucucAAudTsdT	557	AUUGAGAGAAGUCCAcCcAdTsdT	47	5	73	5
394	uguGucuGcGGcGuuuuAudTsdT	558	AuAAAACGCCGcAGAcAcAdTsdT	62	8	75	14
395	aaGGuAuGuuGcccGuuuGdTsdT	559	cAAACGGGcAAcAuACCUUdTsdT	61	3	76	2
396	ucAAcGAccGaccuuGAGGdTsdT	560	CCUcAAGGUCGGUCGUUGAdTsdT	57	1	76	16
397	cauAAGAGGAcucuuGGAcdTsdT	561	GUCcAAGAGUCCUCUuAUGdTsdT	62	4	76	4
398	gucAAcGAccGaccuuGAGdTsdT	562	CUcAAGGUCGGUCGUUGACdTsdT	55	2	77	13
399	auAuucuuGGGAAcAAGAGdTsdT	563	CUCUUGUCCcAAGAAuAUdTsdT	56	5	77	11
400	ugcucGuGuuAcAGGcGGGdTsdT	564	CCCGCCUGuAAcACGAGcAdTsdT	61	5	78	4
401	caAucGccGcGucGcAGAAdTsdT	565	UUCUGCGACGCGGCGAUUGdTsdT	65	1	78	4
402	acuGuucAAGccuccAAGcdTsdT	566	GCUUGGAGGCUUGAAcAGUdTsdT	86	3	78	5
403	cgccGcGucGcAGAAGaucdTsdT	567	GAUCUUCUGCGACGCGGCGdTsdT	71	3	79	2
404	cauuuGuucAGuGGuucGudTsdT	568	ACGAACcACUGAAcAAAUgdTsdT	54	5	80	4
405	cgcuGAuuccGcGGAcGAdTsdT	569	UCGUCCGCGGGAUUCAGCGdTsdT	62	2	80	7

ФИГ. 2 (продолжение)

406	ugGGucAccAuAuucuuGGdTsdT	570	CcAAGAAuAUGGUGACcAdTsdT	75	2	80	16
407	uccucuGccGAuccAuAcudTsdT	571	AGuAUGGAUCGGcAGAGAdTsdT	73	2	81	3
408	auGucAAcGAccGAccuuGdTsdT	572	cAAGGUCGGUCGUUGAcAUdTsdT	69	8	81	7
409	ccucuGccuAAucAucucAdTsdT	573	UGAGAUGAUuAGGcAGAGGdTsdT	81	4	81	4
410	accGuGuGcAcuucGcuucdTsdT	574	GAAGCGAAGUGcAcACGGUdTsdT	46	5	81	7
411	ugccGAuccAuAcuGcGGAdTsdT	575	UCCGcAGuAUGGAUCGGcAdTsdT	61	8	81	5
412	caGAGucuAGAcucGuGGudTsdT	576	ACcACGAGUCuAGACUCUGdTsdT	65	9	81	5
413	cuGuucAAGccuccAAGcudTsdT	577	AGCUUGGAGGCUUGAAcAGdTsdT	82	3	82	21
414	ggAGGcuGuAGGcAuAAAdTsdT	578	AUUuAUGCCuAcAGCCUCCdTsdT	68	2	82	12
415	agGAGGcuGuAGGcAuAAAdTsdT	579	UUuAUGCCuAcAGCCUCCUdTsdT	55	4	83	5
416	gguGGAcuucucAAuuuTsdT	580	AAAUUGAGAGAAGUCcACcTdTsdT	62	7	84	2
417	gcAAcuuuuucAccucuGcdTsdT	581	GcAGAGGUGAAAAAGUUGCdTsdT	93	1	85	5
418	CfuGfcUfcGfuGfuUfaCfaGfgCfGfAf(invdt)	582	pdTCfgCfcUfgUfaAfcAfcGfaGfcAfgdTsdT	56	1	86	2
419	cuAGuGccAuuuGuucAGudTsdT	583	ACUGAAcAAAUGGcACuAGdTsdT	66	0	86	6
420	cuGccGAuccAuAcuGcGGdTsdT	584	CCGcAGuAUGGAUCGGcAGdTsdT	73	8	86	5
421	guGuGcAcuucGcuucAccdTsdT	585	GGUGAAGCGAAGUGcAcAcdTsdT	54	4	87	4
422	gcucGuGuuAcAGGcGGGcdTsdT	586	GCCCGCCUGuAAcACGAGCdTsdT	91	4	87	5
423	ccuAucuuAucAAcAcuucdTsdT	587	GAAGUGUUGAuAAGAuAGGdTsdT	37	2	88	45
424	ucucAAucGccGcGucGcAdTsdT	588	UGCGACGCGCGGAUUGAGAdTsdT	79	4	88	6
425	gcccGucuGuGccuucucAdTsdT	589	UGAGAAGGcAcAGACGGGcdTsdT	85	4	88	16
426	cuAucuuAucAAcAcuuccdTsdT	590	GGAAGUGUUGAuAAGAuAGdTsdT	43	3	90	23
427	auGuuGcccGuuuGuuccdTsdT	591	GAGGAcAAACGGGcAAcAUdTsdT	87	5	90	4
428	guAuGuuGcccGuuuGuuccdTsdT	592	GGAcAAACGGGcAAcAuACdTsdT	88	4	90	11
429	cuucGcuucAccucuGcAcdTsdT	593	GUGcAGAGGUGAAGCGAAGdTsdT	69	7	91	5
430	uguGcAcuucGcuucAccudTsdT	594	AGGUGAAGCGAAGUGcAcAdTsdT	76	3	91	14
431	gccAAAAuucGcAGuccGdTsdT	595	CGGGACUGCGAAUUUUGGCdTsdT	81	3	92	3
432	ccuGcucGuGuuAcAGGcGdTsdT	596	CGCCUGuAAcACGAGcAGGdTsdT	86	3	92	1
433	ugGAGuGuGGAuucGcAcudTsdT	597	AGUGCGAAUCCAcACUCcAdTsdT	87	4	92	3
434	aacGAccGAccuuGAGGcAdTsdT	598	UGCCUcAAGGUCGGUCGUUdTsdT	83	9	92	3
435	acAGAGucuAGAcucGuGGdTsdT	599	CcACGAGUCuAGACUCUGUdTsdT	89	4	92	4
436	aaucGccGcGucGcAGAAGdTsdT	600	CUUCUGCGACGCGGCGAUUdTsdT	85	6	92	2

ФИГ. 2 (продолжение)

437	gggAuGuuGcccGuuuGucdTsdT	601	GAcAAACGGGcAAcAuACcdTsdT	80	2	93	3
438	gccGAuccAuAcuGcGGAAdTsdT	602	UUCCGcAGuAUGGAUCGGCdTsdT	79	3	93	3
439	gcccAuucuuAucAAcAcudTsdT	603	AGUGUUGAuAAGAuAGGGCdTsdT	84	4	94	50
440	aguuuAcuAGuGccAuuuGdTsdT	604	cAAAUGGcACuAGuAAACUdTsdT	89	7	95	8
441	ugucAAcGAccGAccuuGAdTsdT	605	UcAAGGUCGGUCGUUGAcAdTsdT	84	5	95	8
442	acuuucucucAAuuuuuAGdTsdT	606	CuAGAAAAUUGAGAGAAGUdTsdT	103	3	95	6
443	gcGcGGGAcGuuccuuuGucdTsdT	607	GAcAAAGGACGUCCCGCGCdTsdT	88	4	97	3
444	ucuAGAcucGuGGuGGAcudTsdT	608	AGUCcACcACGAGUCuAGAdTsdT	90	5	97	2
445	gauccAuAcuGcGGAAcucdTsdT	609	GAGUUCCGcAGuAUGGAUCdTsdT	73	6	98	4
446	cucuGccGAuccAuAcuGcdTsdT	610	GcAGuAUGGAUCGGcAGAGdTsdT	100	5	99	7
447	ucuGccGAuccAuAcuGcGdTsdT	611	CGcAGuAUGGAUCGGcAGAdTsdT	88	6	99	4
448	ccucuGccGAuccAuAcuGdTsdT	612	cAGuAUGGAUCGGcAGAGdTsdT	98	11	99	5
449	gcAccucucuuuAcGcGGudTsdT	613	ACCGCGuAAAGAGAGGUGCdTsdT	82	7	100	4
450	aaGAACuccucGccucGcdTsdT	614	GCGAGGCGAGGGAGUUCUdTsdT	97	6	100	1
451	gaAcuuccucGccucGcAGdTsdT	615	CUGCGAGGCGAGGGAGUUCdTsdT	100	2	100	2
452	ucucucAAuuuuuAGGGcdTsdT	616	GCCCuAGAAAAUUGAGAGAdTsdT	102	4	100	8
453	ggGcGcAccucucuuuAcGdTsdT	617	CGuAAAGAGAGGUGCGCCCdTsdT	80	4	100	3
454	ccGAuccAuAcuGcGGAAdTsdT	618	GUUCCGcAGuAUGGAUCGGdTsdT	83	5	101	3
455	aacuccucGccucGcAGAdTsdT	619	UCUGCGAGGCGAGGGAGUUDTsdT	100	2	101	2
456	cuccucuGccGAuccAuAcdTsdT	620	GuAUGGAUCGGcAGAGGAGdTsdT	93	2	101	2
457	ggAGuGuGGAuucGcAcudTsdT	621	GAGUGCGAAUCcAcACUCCdTsdT	97	5	101	3
458	cgGGcGcAccucucuuuAcdTsdT	622	GuAAAGAGAGGUGCGCCCGdTsdT	83	6	101	6
459	gucucAAucGccGcGucGcdTsdT	623	GCGACGCGGCGAUUGAGACdTsdT	92	4	102	9
460	auccAuAcuGcGGAAcuccdTsdT	624	GGAGUUCGcAGuAUGGAUDTsdT	88	3	102	7
461	cgcAccucucuuuAcGcGGdTsdT	625	CCGCGuAAAGAGAGGUGCGdTsdT	78	1	102	10
462	caAcGAccGAccuuGAGGcdTsdT	626	GCCUcAAGGUCGGUCGUUGdTsdT	88	4	102	8
463	ccAuAcuGcGGAACuccuAdTsdT	627	uAGGAGUUCGcAGuAUGGdTsdT	85	3	102	5
464	ugAAucccGcGGAcGAcccdTsdT	628	GGGUCGUCCGCGGAUUCAdTsdT	92	4	103	3
465	agAAcuccucGccucGcAdTsdT	629	UGCGAGGCGAGGGAGUUCUdTsdT	94	5	103	2
466	ggcGcAccucucuuuAcGcdTsdT	630	GCGuAAAGAGAGGUGCGCCdTsdT	97	7	103	10
467	gcGcAccucucuuuAcGcGdTsdT	631	CGCGuAAAGAGAGGUGCGCdTsdT	99	5	104	7

ФИГ. 2 (продолжение)

468	gcuGAAucccGcGGAcGAcdTsdT	632	GUUGUCCGCGGGAUUCAGCdTsdT	84	2	104	3
469	cacuucGcuucAccucucGcdTsdT	633	GcAGAGGUGAAGCGAAGUGdTsdT	90	4	105	12
470	cucAAucGccGcGucGcAGdTsdT	634	CUGCGACGCGGCGAUUGAGdTsdT	99	3	105	14
471	ucccGucGGcGcuGAAuccdTsdT	635	GGAUUCAGCGCCGACGGGAdTsdT	91	3	106	7
472	cuGAAucccGcGGAcGAcCdTsdT	636	GGUCGUCCGCGGGAUUCAGdTsdT	96	2	106	6
473	agAGucuAGAcucGuGGuGdTsdT	637	cACcACGAGUCuAGACUCUdTsdT	93	4	107	9
474	uccAuAcuGcGGAACuccudTsdT	638	AGGAGUUCGcAGuAUGGAdTsdT	91	4	107	7
475	gcGcuGAAucccGcGGAcGdTsdT	639	CGUCCGCGGGAUUCAGCGCdTsdT	90	3	108	3
476	aguGuGGAuucGcAcuccudTsdT	640	AGGAGUGCGAAUCcAcACUdTsdT	94	4	111	3
477	cccuGcucGuGuuAcAGGcdTsdT	641	GCCUGuAAcACGAGcAGGGdTsdT	99	11	111	10
478	gaAucccGcGGAcGAcCdTsdT	642	CGGGUCGUCCGCGGGAUUCdTsdT	96	3	115	5
479	aaGcuGuGccuuGGGuGGcdTsdT	643	GCcACcAAGGcAcAGCUUdTsdT	99	5	116	53
480	gccccGcucGuGuuAcAGGdTsdT	644	CCUGuAAcACGAGcAGGGCdTsdT	96	5	116	11
481	gucccGucGGcGcuGAAucdTsdT	645	GAUUCAGCGCCGACGGGACdTsdT	93	2	118	4
482	aucuuAucAAcAcuuccGGdTsdT	646	CCGGAAGUGUUGAuAAGAUdTsdT	76	3	126	23
483	cuuAucAAcAcuuccGGAAdTsdT	647	UUCCGGAAGUGUUGAuAAGdTsdT	39	6	42	3

ФИГ. 2 (продолжение)

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

Пара SEQ ID No.	<u>Сыворотка мыши</u>		<u>Сыворотка человека</u>		<u>Сыворотка яванского макака</u>	
	Кодирующ ая цепь	Некодирую щая цепь	Кодирующ ая цепь	Некодирую щая цепь	Кодирующ ая цепь	Некодирую щая цепь
	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)	$t_{1/2}$ (ч)
321/485	26,4	0,5	>48	2,1	н.о.	н.о.
325/489	27,2	6,7	>48	8,8	н.о.	н.о.
350/514	11,3	2,6	>48	17,0	н.о.	н.о.
326/490	>48	11,7	>48	43,9	>48	5.5
324/488	>48	13,3	>48	44,7	>48	6.4
328/492	19,1	9,9	>48	>48	н.о.	н.о.
322/486	>48	14,5	>48	>48	>48	6.5
327/491	>48	16,0	>48	>48	>48	8.1

ФИГ. 3

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

Коровая последовательность				Модифицированная последовательность			
SEQ ID No.	Последовательность кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID No.	Последовательность не кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID No.	Последовательность кодирующей цепи (5'-3')	SEQ ID No.	Последовательность не кодирующей цепи (5'-3')
1	CAAGGUAUGUUGCCCGUUU	157	AAACGGGCAACAUACCUUG	321	caAGGuAuGuuGcccGuuu dTsdT	485	AAACGGGcAAcAuACCUUGd TsdT
2	CUGUAGGCAUAAAUUGGUA	158	TACCAAUUUUAUGCCUACAG	322	CfuGfuAfgGfcAfuAfaAfu UfgGfuAf(inv dT)	486	pdTAfcCfaAfuUfuAfuGfcCfu AfcAfgdTsdT
3	UCUGCGGCGUUUUAUCAUA	159	UAUGAUAAAACGCCGCAGA	323	ucuGcGGcGuuuuAucAuA dTsdT	487	uAUGAuAAAACGCCGcAGAd TsdT
3	UCUGCGGCGUUUUAUCAUA	160	TAUGAUAAAACGCCGCAGA	324	UfcUfgCfGfcGfuUfuUfa UfcAfuAf(inv dT)	488	pdTAfuGfaUfaAfaAfcGfcCfG CfaGfadTsdT
4	ACCUCUGCCUAAUCAUCUC	161	GAGAUGAUUAGGCAGAGGU	325	accucuGccuAAucAucucd TsdT	489	GAGAUGAUuAGGcAGAGGU dTsdT
5	UUUACUAGUGCCAUUUUGUA	162	TACAAUUGGCACUAGUAAA	326	UfuUfaCfuAfgUfgCfcAfu UfuGfuAf(inv dT)	490	pdTAfcAfaAfuGfgCfaCfuAfg UfaAfadTsdT
6	ACCUCUGCCUAAUCAUCUA	163	TAGAUGAUUAGGCAGAGGU	327	AfcCfuCfuGfcCfuAfaUfcA fuCfuAf(inv dT)	491	pdTAfgAfuGfaUfuAfgGfcAfg AfgGfudTsdT
7	CUGUAGGCAUAAAUUGGUC	164	GACCAAUUUUAUGCCUACAG	328	cuGuAGGcAuAAAuuGGu cdTsdT	492	GACcAAUuuAUGCCuAcAGd TsdT
8	UGUCUGCGGCGUUUUAUCA	165	UGAUAAAACGCCGCAGACA	329	ugucuGcGGcGuuuuAucA dTsdT	493	UGAuAAAACGCCGcAGAcAd TsdT
8	UGUCUGCGGCGUUUUAUCA	166	TGAUAAAACGCCGCAGACA	330	UfgUfcUfgCfGfcGfuUfu UfaUfcAf(inv dT)	494	pdTGfaUfaAfaAfcGfcCfG CfaGfaCfadTsdT
9	UACUAGUGCCAUUUGUUCA	167	UGAACAAUUGGCACUAGUA	331	uacuAGuGccAuuuGuucA dTsdT	495	UGAAcAAUUGGcACuAGuAd TsdT
9	UACUAGUGCCAUUUGUUCA	168	TGAACAAUUGGCACUAGUA	332	UfaCfuAfgUfgCfcAfuUfu GfuUfcAf(inv dT)	496	pdTGfaAfcAfaAfuGfgCfaCfu AfgUfadTsdT
10	CAACUUUUUCACCUCUG	169	TGCAGAGGUGAAAAAGUUG	333	CfaAfcUfuUfuUfcAfcCfuC	497	pdTGfcAfgAfgGfuGfaAfaAfa

ФИГ. 4

	CA				fuGfcAf(inv dT)		GfuUfgdTsdT
11	CCAUUUGUUCAGUGGU UCG	170	CGAACCACUGAACAAUUGG	334	ccAuuuGuucAGuGGuucG dTsdT	498	CGAACcACUGAAcAAAUGGd TsdT
12	CCAAGUGUUUGCUGAC GCA	171	UGCGUCAGCAAACACUUGG	335	ccAAGuGuuuGcuGAcGc AdTsdT	499	UGCGUcAGcAAAcACUUGGd TsdT
12	CCAAGUGUUUGCUGAC GCA	172	TGCGUCAGCAAACACUUGG	336	CfcAfaGfuGfuUfuGfcUfg AfcGfcAf(inv dT)	500	pdTGfcGfuCfaGfcAfaAfcAfc UfuGfgdTsdT
13	CCAUUUGUUCAGUGGU UCA	173	TGAACCACUGAACAAUUGG	337	CfcAfuUfuGfuUfcAfgUfg GfuUfcAf(inv dT)	501	pdTGfaAfcCfaCfuGfaAfcAfa AfuGfgdTsdT
14	UUUACUAGUGCCAUUU GUU	174	AACAAAUGGCACUAGUAAA	338	uuuAcuAGuGccAuuuGuu dTsdT	502	AAcAAAUGGcACuAGuAAAd TsdT
15	CACCUCUGCCUAAUCAU CA	175	TGAUGAUUAGGCAGAGGU G	339	CfaCfcUfcUfgCfcUfaAfuC faUfcAf(inv dT)	503	pdTGfaUfgAfuUfaGfgCfaGfa GfgUfgdTsdT
16	CUGGCUCAGUUUACUA GUG	176	CACUAGUAAACUGAGCCAG	340	cuGGcucAGuuuAcuAGu GdTsdT	504	cACuAGuAAACUGAGCcAGd TsdT
17	CAAGGUAUGUUGCCCG UUA	177	TAACGGGCAACAUACCUUG	341	CfaAfgGfuAfuGfuUfgCfc CfgUfuAf(inv dT)	505	pdTAfaCfgGfgCfaAfcAfuAfcC fuUfgdTsdT
18	CUGGCUCAGUUUACUA GUA	178	TACUAGUAAACUGAGCCAG	342	CfuGfgCfuCfaGfuUfuAfc UfaGfuAf(inv dT)	506	pdTAfcUfaGfuAfaAfcUfgAfg CfcAfgdTsdT
19	GAGGCUGUAGGCAUAA AUU	179	AAUUUAUGCCUACAGCCUC	343	gaGGcuGuAGGcAuAAAU udTsdT	507	AAUUuAUGCCuAcAGCCUCd TsdT
20	CAGUUUACUAGUGCCAU UU	180	AAAUGGCACUAGUAAACUG	344	caGuuuAcuAGuGccAuuu dTsdT	508	AAAUGGcACuAGuAAACUGd TsdT
21	AGGUAUGUUGCCCGUU UGU	181	ACAAACGGGCAACAUACCU	345	agGuAuGuuGcccGuuuGu dTsdT	509	AcAAACGGGcAAcAuACCUd TsdT
22	UAUGUUGCCCGUUUGU CCA	182	UGGACAAACGGGCAACAUA	346	UfaUfgUfuGfcCfcGfuUfu GfuCfcAf(inv dT)	510	pdTGfgAfcAfaAfcGfgGfcAfa CfaUfadTsdT
23	GAGGCUGUAGGCAUAA AUA	183	TAUUUAUGCCUACAGCCUC	347	GfaGfgCfuGfuAfgGfcAfu AfaAfuAf(inv dT)	511	pdTAfuUfuAfuGfcCfuAfcAfg CfcUfcdTsdT
24	GUCUGCGGCGUUUUUAU CAU	184	AUGAUAAAACGCCGCAGAC	348	gucuGcGGcGuuuuAucAu dTsdT	512	AUGAuAAAACGCCGcAGACd TsdT

ФИГ. 4 (продолжение)

25	CAACUUUUUCACCUCUG CC	185	GGCAGAGGUGAAAAAGUU G	349	caAcuuuuuucAccucuGccd TsdT	513	GGcAGAGGUGAAAAAGUUG dTsdT
26	CCGUGUGCACUUCGCUU CA	186	UGAAGCGAAGUGCACACGG	350	ccGuGuGcAcuucGcuucA dTsdT	514	UGAAGCGAAGUGcAcACGG dTsdT
26	CCGUGUGCACUUCGCUU CA	187	TGAAGCGAAGUGCACACGG	351	CfcGfuGfuGfcAfcUfuCfG CfuUfcAf(invdt)	515	pdTGfaAfgCfGfAfaGfuGfcAfc AfcGfgdTsdT
27	UCAAGGUAUGUUGCCC GUA	188	TACGGGCAACAUACCUUGA	352	UfcAfaGfgUfaUfgUfuGfc CfcGfuAf(invdt)	516	pdTAfcGfgGfcAfaCfaUfaCfc UfuGfadTsdT
28	CAGUUUACUAGUGCCAU UA	189	TAAUGGCACUAGUAAACUG	353	CfaGfuUfuAfcUfaGfuGfc CfaUfuAf(invdt)	517	pdTAfaUfgGfcAfcUfaGfuAfa AfcUfgdTsdT
29	UGGUGGACUUCUCUCA AUU	190	AAUUGAGAGAAGUCCACCA	354	ugGuGGAcuucucucAAuu dTsdT	518	AAUUGAGAGAAGUCcACcAd TsdT
30	AGGUAUGUUGCCCGUU UGA	191	TCAAACGGGCAACAUACCU	355	AfgGfuAfuGfuUfgCfcCfG UfuUfgAf(invdt)	519	pdTCfaAfaCfGfGfCfaAfcAfu AfcCfudTsdT
31	CUGCUCGUGUUACAGGC GG	192	CCGCCUGUAAACACGAGCAG	356	cuGeucGuGuuAcAGGeG GdTsdT	520	CCGCCUGuAAcACGAGcAGd TsdT
32	UAUGUUGCCCGUUUGU CCU	193	AGGACAAACGGGCAACAUA	357	uauGuuGcccGuuuGuccu dTsdT	521	AGGAcAAACGGGcAAcAuAd TsdT
33	UCAAGGUAUGUUGCCC GUU	194	AACGGGCAACAUACCUUGA	358	ucAAGGuAuGuuGcccGu udTsdT	522	AACGGGcAAcAuACCUUGAd TsdT
34	UCUUAUCAACACUCCG GA	195	UCCGGAAGUGUUGAUAAAG A	359	ucuuAucAAcAcuuccGGA dTsdT	523	UCCGGAAGUGUUGAuAAGA dTsdT
34	UCUUAUCAACACUCCG GA	196	TCCGGAAGUGUUGAUAAAG	360	UfcUfuAfuCfaAfcAfcUfuC fcGfgAf(invdt)	524	pdTCfcGfgAfaGfuGfuUfgAfu AfaGfadTsdT
35	CACCUCUGCCUAAUCAU CU	197	AGAUGAUUAGGCAGAGGU G	361	caccucuGccuAAucAucud TsdT	525	AGAUGAUuAGGcAGAGGUG dTsdT
36	AUAAGAGGACUCUUGG ACU	198	AGUCCAAGAGUCCUCUUAU	362	auAAGAGGAcucuuGGAc udTsdT	526	AGUCcAAGAGUCCUCUuAU dTsdT
37	GUCUGCGGCGUUUUUAU CAA	199	TUGAUAAAACGCCGAGAC	363	GfuCfuGfcGfgCfGfUfuUfu AfuCfaAf(invdt)	527	pdTUfgAfuAfaAfaCfGfCfcGfc AfgAfcdTsdT
38	GGCGCUGAAUCCCGCGG	200	GUCCGCGGGAUUCAGCGCC	364	ggcGcuGAucccGcGGAc	528	GUCCGCGGGAUucAGCGCC

ФИГ. 4 (продолжение)

	AC				dTsdT		dTsdT
39	CGCGUCGCAGAAGAUCU CA	201	UGAGAUCUUCUGCGACGCG	365	cgcGucGcAGAAGAUcucA dTsdT	529	UGAGAUCUUCUGCGACGCG dTsdT
40	AAUGUCAACGACCGACC UU	202	AAGGUCGGUCGUUGACAU U	366	aaUGucAAcGAccGAccuu dTsdT	530	AAGGUCGGUCGUUGAcAUU dTsdT
41	GCUCAGUUUACUAGUG CCA	203	UGGCACUAGUAAACUGAGC	367	gcucAGuuuAcuAGuGccA dTsdT	531	UGGcACuAGuAAACUGAGCd TsdT
42	UGGUGGACUUCUCUCA AUA	204	TAUUGAGAGAAGUCCACCA	368	UfgGfuGfgAfcUfuCfuCfu CfaAfuAf(invdt)	532	pdTAfuUfgAfgAfgAfaGfuCfc AfcCfadTsdT
43	AUCGCCGCGUCGCAGAA GA	205	UCUUCUGCGACGCGGCGAU	369	aucGccGcGucGcAGAAGA dTsdT	533	UCUUCUGCGACGCGGCGAU dTsdT
44	GCCAUUUGUUCAGUGG UUC	206	GAACCACUGAACAAAUGGC	370	gccAuuuGuucAGuGGuuc dTsdT	534	GAACcACUGAAcAAAUGGCd TsdT
45	CGAUCCAUAUCGCGGAA CU	207	AGUUCCGCAGUAUGGAUCG	371	cgAuccAuAcuGcGGAacu dTsdT	535	AGUUCCGcAGuAUGGAUCG dTsdT
46	UCACCUCUGCCUAAUCA UC	208	GAUGAUUAGGCAGAGGUG A	372	ucAccucuGccuAAucAucd TsdT	536	GAUGAUuAGGcAGAGGUGA dTsdT
47	GUGGACUUCUCUCAAU UUU	209	AAAAUUGAGAGAAGUCCAC	373	guGGAcuucucucAAuuuu dTsdT	537	AAAAUUGAGAGAAGUCcAC dTsdT
48	GGGUCACCAUAUUCUU GGG	210	CCCAAGAAUAUGGUGACCC	374	ggGucAccAuAuucuuGGG dTsdT	538	CCcAAGAAuAUGGUGACCCd TsdT
49	GCCGCGUCGCAGAAGAU CU	211	AGAUCUUCUGCGACGCGGC	375	gccGcGucGcAGAAGAUcu dTsdT	539	AGAUCUUCUGCGACGCGGC dTsdT
50	UCAAUCGCCGCGUCGCA GA	212	UCUGCGACGCGGCGAUUGA	376	ucAAucGccGcGucGcAGA dTsdT	540	UCUGCGACGCGGCGAUUGA dTsdT
51	UGGAUGUGUCUGCGGC GUU	213	AACGCCGCAGACACAUCCA	377	ugGAuGuGucuGcGGcGu udTsdT	541	AACGCCGcAGAcAcAUCcAdT sdT
52	UACUGUUCAAGCCUCCA AG	214	CUUGGAGGCUUGAACAGUA	378	uacuGuucAAGccuccAAG dTsdT	542	CUUGGAGGCUUGAAcAGuA dTsdT
53	GUUUACUAGUGCCAUU UGU	215	ACAAAUGGCACUAGUAAAC	379	guuuAcuAGuGccAuuuGu dTsdT	543	AcAAAUGGcACuAGuAAAc dTsdT

ФИГ. 4 (продолжение)

54	ACUAGUGCCAUUUGUU CAG	216	CUGAACAAAUGGCACUAGU	380	acuAGuGccAuuuGuucAG dTsdT	544	CUGAAcAAAUGGcACuAGUd TsdT
55	CCGCGUCGCAGAAGAUC UC	217	GAGAUCUUCUGCGACGCGG	381	ccGcGucGcAGAAGAUcuc dTsdT	545	GAGAUCUUCUGCGACGCGG dTsdT
56	UAUCUUAUCAACACUUC CG	218	CGGAAGUGUUGAUAAAGAU A	382	uauuuuAucAAcAuuuccGd TsdT	546	CGGAAGUGUUGAUAAAGAU dTsdT
57	GGCCAAAUUCGCAGUC CC	219	GGGACUGCGAAUUUUGGCC	383	ggccAAAuucGcAGucccd TsdT	547	GGGACUGCGAAUUUUGGCC dTsdT
58	UUCACCUCUGCCUAAUC AU	220	AUGAUUAGGCAGAGGUGA A	384	uucAccucuGccuAAucAud TsdT	548	AUGAUuAGGcAGAGGUGAA dTsdT
59	CUCAGUUUACUAGUGCC AU	221	AUGGCACUAGUAAACUGAG	385	cucAGuuuAcuAGuGccAu dTsdT	549	AUGGcACuAGuAAACUGAG dTsdT
60	UGUUGCCCGUUUGUCC UCU	222	AGAGGACAAACGGGCAACA	386	uguuGcccGuuuGuccucud TsdT	550	AGAGGAcAAACGGGcAAcAd TsdT
61	UAGUGCCAUUUGUUCA GUG	223	CACUGAACAAAUGGCACUA	387	uaGuGccAuuuGuucAGu GdTsdT	551	cACUGAAcAAAUGGcACuAd TsdT
62	AGGCUGUAGGCAUAAA UUG	224	CAUUUUAUGCCUACAGCCU	388	agGcuGuAGGcAuAAAUu GdTsdT	552	cAAUUuAUGCCuAcAGCCUd TsdT
63	AUGUGUCUGCGGCGUU UUA	225	UAAAACGCCGCAGACACAU	389	auGuGucuGcGGcGuuuu AdTsdT	553	uAAAACGCCGcAGAcAcAUd TsdT
63	AUGUGUCUGCGGCGUU UUA	226	TAAAACGCCGCAGACACAU	390	AfuGfuGfuCfuGfcGfgCfg UfuUfuAf(invdt)	554	pdTAfaAfaCfgCfcGfcAfgAfcA fcAfudTsdT
64	ACUUCGCUUCACCUCUG CA	227	UGCAGAGGUGAAGCGAAGU	391	acuucGcuucAccucuGcAd TsdT	555	UGcAGAGGUGAAGCGAAGU dTsdT
65	CGUGUGCACUUCGCUUC AC	228	GUGAAGCGAAGUGCACACG	392	cguGuGcAcuucGcuucAcd TsdT	556	GUGAAGCGAAGUGcAcACG dTsdT
66	GUGGUGGACUUCUCUC AAU	229	AUUGAGAGAAGUCCACCAC	393	guGGuGGAcuucucucAAu dTsdT	557	AUUGAGAGAAGUCcAcAcCd TsdT
67	UGUGUCUGCGGCGUUU UAU	230	AUAAAACGCCGCAGACACA	394	uguGucuGcGGcGuuuuAu dTsdT	558	AuAAAACGCCGcAGAcAcAdT sdT
68	AAGGUAUGUUGCCCGU	231	CAAACGGGCAACAUACCUU	395	aaGGuAuGuuGcccGuuu	559	cAAACGGGcAAcAuACCUUd

ФИГ. 4 (продолжение)

	UUG				GdTsdT		TsdT
69	UCAACGACCGACCUUGA GG	232	CCUCAAGGUCGGUCGUUGA	396	ucAAcGAccGAccuuGAGG dTsdT	560	CCUcAAGGUCGGUCGUUGA dTsdT
70	CAUAAGAGGACUCUUG GAC	233	GUCCAAGAGUCCUCUUAUG	397	cauAAGAGGAcucuuGGA cdTsdT	561	GUCcAAGAGUCCUCUuAUG dTsdT
71	GUCAACGACCGACCUUG AG	234	CUCAAGGUCGGUCGUUGAC	398	gucAAcGAccGAccuuGAG dTsdT	562	CUcAAGGUCGGUCGUUGAC dTsdT
72	AUAUUCUUGGGAACAA GAG	235	CUCUUGUUCCCAAGAAUUAU	399	auAuucuuGGGAACaAGA GdTsdT	563	CUCUUGUUCCcAAGAAuAU dTsdT
73	UGCUCGUGUACAGGC GGG	236	CCCGCCUGUAAACACGAGCA	400	ugcucGuGuuAcAGGcGG GdTsdT	564	CCCGCCUGuAAcACGAGcAd TsdT
74	CAAUCGCCGCGUCGCAG AA	237	UUCUGCGACGCGGCGAUUG	401	caAucGccGcGucGcAGAA dTsdT	565	UUCUGCGACGCGGCGAUUG dTsdT
75	ACUGUUCAAGCCUCCAA GC	238	GCUUGGAGGCUUGAACAG U	402	acuGuucAAGccuccAAGc dTsdT	566	GCUUGGAGGCUUGAAcAGU dTsdT
76	CGCCGCGUCGCAGAAGA UC	239	GAUCUUCUGCGACGCGGCG	403	cgccGcGucGcAGAAGaAuc dTsdT	567	GAUCUUCUGCGACGCGGCG dTsdT
77	CAUUUGUUCAGUGGUU CGU	240	ACGAACCACUGAACAAUUG	404	cauuuGuucAGuGGuucGu dTsdT	568	ACGAACcACUGAAcAAAUGd TsdT
78	CGCUGAAUCCCGCGGAC GA	241	UCGUCCGCGGGAUUCAGCG	405	cgcUGAAuccGcGGAcGA dTsdT	569	UCGUCCGCGGGAUuAGCG dTsdT
79	UGGGUCACCAUAUUCU UGG	242	CCAAGAAUAUGGUGACCCA	406	ugGGucAccAuAuucuuGG dTsdT	570	CcAAGAAuAUGGUGACcAd TsdT
80	UCCUCUGCCGAUCCAUA CU	243	AGUAUGGAUCGGCAGAGGA	407	uccucGccGAuccAuAcud TsdT	571	AGuAUGGAUCGGcAGAGGA dTsdT
81	AUGUCAACGACCGACCU UG	244	CAAGGUCGGUCGUUGACAU	408	auGucAAcGAccGAccuuG dTsdT	572	cAAGGUCGGUCGUUGAcAU dTsdT
82	CCUCUGCCUAAUCAUCU CA	245	UGAGAUGAUUAGGCAGAG G	409	ccucGccuAAucAucucAd TsdT	573	UGAGAUGAUuAGGcAGAGG dTsdT
83	ACCGUGUGCACUUCGCU UC	246	GAAGCGAAGUGCACACGGU	410	accGuGuGcAcuucGcuuc dTsdT	574	GAAGCGAAGUGcAcACGGU dTsdT

ФИГ. 4 (продолжение)

84	UGCCGAUCCAUAUCUGCG GA	247	UCCGCAGUAUGGAUCGGCA	411	ugccGAuccAuAcuGcGGA dTsdT	575	UCCGcAGuAUGGAUCGGcA dTsdT
85	CAGAGUCUAGACUCGUG GU	248	ACCACGAGUCUAGACUCUG	412	caGAGucuAGAcucGuGG udTsdT	576	ACcACGAGUCuAGACUCUGd TsdT
86	CUGUUCAAGCCUCCAAG CU	249	AGCUUGGAGGCUUGAACAG	413	cuGuuucAAGccuccAAGcu dTsdT	577	AGCUUGGAGGCUUGAAcAG dTsdT
87	GGAGGCUGUAGGCAUA AAU	250	AUUUAUGCCUACAGCCUCC	414	ggAGGcuGuAGGcAuAAA udTsdT	578	AUUuAUGCCuAcAGCCUCCd TsdT
88	AGGAGGCUGUAGGCAU AAA	251	UUUAUGCCUACAGCCUCCU	415	agGAGGcuGuAGGcAuAA AdTsdT	579	UUuAUGCCuAcAGCCUCCUd TsdT
89	GGUGGACUUCUCUCAA UUU	252	AAAUUGAGAGAAGUCCACC	416	gguGGAcuucucucAAuuu dTsdT	580	AAAUUGAGAGAAGUCcACC dTsdT
90	GCAACUUUUUCACCUCU GC	253	GCAGAGGUGAAAAAGUUGC	417	gcAAcuuuuuuAccucuGcd TsdT	581	GcAGAGGUGAAAAAGUUGC dTsdT
91	CUGCUCGUGUUACAGGC GA	254	TCGCCUGUAACACGAGCAG	418	CfuGfcUfcGfuGfuUfaCfa GfgCfgAf(inv dT)	582	pdTCfgCfcUfgUfaAfcAfcGfa GfcAfgdTsdT
92	CUAGUGCCAUUUGUUC AGU	255	ACUGAACAAAUGGCACUAG	419	cuAGuGccAuuuGuucAGu dTsdT	583	ACUGAAcAAAUGGcACuAGd TsdT
93	CUGCCGAUCCAUAUCUGC GG	256	CCGCAGUAUGGAUCGGCAG	420	cuGccGAuccAuAcuGcGG dTsdT	584	CCGcAGuAUGGAUCGGcAGd TsdT
94	GUGUGCACUUCGCUUCA CC	257	GGUGAAGCGAAGUGCACAC	421	guGuGcAcuucGcuucAccd TsdT	585	GGUGAAGCGAAGUGcAcAC dTsdT
95	GCUCGUGUUACAGGCG GGC	258	GCCCGCCUGUAACACGAGC	422	gcucGuGuuAcAGGcGGG cdTsdT	586	GCCCGCCUGuAAcACGAGCd TsdT
96	CCUAUCUUAUCAACACU UC	259	GAAGUGUUGAUAAAGAUAG G	423	ccuAucuuAucAAcAcuuccd TsdT	587	GAAGUGUUGAuAAGAuAGG dTsdT
97	UCUCAAU CGCCGCGUCG CA	260	UGCGACGCGGCGAUUGAGA	424	ucucAAucGccGcGucGcA dTsdT	588	UGCGACGCGGCGAUUGAGA dTsdT
98	GCCCGUCUGUGCCUUCU CA	261	UGAGAAGGCACAGACGGGC	425	gcccGucuGuGccuucucAd TsdT	589	UGAGAAGGcAcAGACGGGC dTsdT
99	CUAUCUUAUCAACACUU	262	GGAAGUGUUGAUAAAGAU	426	cuAucuuAucAAcAcuuccd	590	GGAAGUGUUGAuAAGAuAG

ФИГ. 4 (продолжение)

	CC		G		TsdT		dTsdT
100	AUGUUGCCCGUUUGUC CUC	263	GAGGACAAACGGGCAACAU	427	auGuuGcccGuuuGuccuc dTsdT	591	GAGGAcAAACGGGcAAcAUd TsdT
101	GUAUGUUGCCCGUUUG UCC	264	GGACAAACGGGCAACAUAC	428	guAuGuuGcccGuuuGucc dTsdT	592	GGAcAAACGGGcAAcAuACd TsdT
102	CUUCGCUUACCCUCUGC AC	265	GUGCAGAGGUGAAGCGAAG	429	cuucGcuucAccucuGcAcd TsdT	593	GUGcAGAGGUGAAGCGAAG dTsdT
103	UGUGCACUUCGCUUCAC CU	266	AGGUGAAGCGAAGUGCACA	430	uguGcAcuucGcuucAccud TsdT	594	AGGUGAAGCGAAGUGcAcA dTsdT
104	GCCAAAUUCGCAGUCC CG	267	CGGGACUGCGAAUUUUGGC	431	gccAAAuucGcAGucccG dTsdT	595	CGGGACUGCGAAUUUUGGC dTsdT
105	CCUGCUCGUGUUACAGG CG	268	CGCCUGUAACACGAGCAGG	432	ccuGcucGuGuuAcAGGcG dTsdT	596	CGCCUGuAAcACGAGcAGGd TsdT
106	UGGAGUGUGGAUUCGC ACU	269	AGUGCGAAUCCACACUCCA	433	ugGAGuGuGGAuucGcAc udTsdT	597	AGUGCGAAUCcAcACUCcAd TsdT
107	AACGACCGACCUUGAGG CA	270	UGCCUCAAGGUCGGUCGUU	434	aacGAccGAccuuGAGGcA dTsdT	598	UGCCUcAAGGUCGGUCGUU dTsdT
108	ACAGAGUCUAGACUCGU GG	271	CCACGAGUCUAGACUCUGU	435	acAGAGucuAGAcucGuG GdTsdT	599	CcACGAGUCuAGACUCUGU dTsdT
109	AAUCGCCGCGUCGCAGA AG	272	CUUCUGCGACGCGGCGAUU	436	aaucGccGcGucGcAGAAG dTsdT	600	CUUCUGCGACGCGGCGAUU dTsdT
110	GGUAUGUUGCCCGUUU GUC	273	GACAAACGGGCAACAUACC	437	gguaGuuGcccGuuuGuc dTsdT	601	GAcAAACGGGcAAcAuACCd TsdT
111	GCCGAUCCAUAUGCGG AA	274	UUCCGCAGUAUGGAUCGGC	438	gccGAuccAuAcuGcGGAA dTsdT	602	UUCCGcAGuAUGGAUCGGC dTsdT
112	GCCCUAUCUUAUCAACA CU	275	AGUGUUGAUAAAGAUAGGG C	439	gccccAucuuAucAAcAcud TsdT	603	AGUGUUGAuAAGAuAGGGC dTsdT
113	AGUUUACUAGUGCCAU UUG	276	CAAUUGGCACUAGUAAACU	440	aguuuAcuAGuGccAuuuG dTsdT	604	cAAUUGGcACuAGuAAACUd TsdT
114	UGUCAACGACCGACCUU GA	277	UCAAGGUCGGUCGUUGACA	441	ugucAAcGAccGAccuuGA dTsdT	605	UcAAGGUCGGUCGUUGAcA dTsdT

ФИГ. 4 (продолжение)

115	ACUUCUCUCAAUUUUCU AG	278	CUAGAAAAUUGAGAGAAGU	442	acuucucucAAuuuuucuAG dTsdT	606	CuAGAAAAUUGAGAGAAGU dTsdT
116	GCGCGGGACGUCCUUU GUC	279	GACAAAGGACGUCCCGCGC	443	gcGcGGGAcGuccuuuGuc dTsdT	607	GAcAAAGGACGUCCCGCGCd TsdT
117	UCUAGACUCGUGGUGG ACU	280	AGUCCACCACGAGUCUAGA	444	ucuAGAcucGuGGuGGAc udTsdT	608	AGUCcAccACGAGUCuAGAd TsdT
118	GAUCCAUACUGCGGAAC UC	281	GAGUUCCGCAGUAUGGAUC	445	gauccAuAcuGcGGAucuc dTsdT	609	GAGUUCCGcAGuAUGGAUC dTsdT
119	CUCUGCCGAUCCAUACU GC	282	GCAGUAUGGAUCGGCAGAG	446	cucuGccGAuccAuAcuGcd TsdT	610	GcAGuAUGGAUCGGcAGAG dTsdT
120	UCUGCCGAUCCAUACUG CG	283	CGCAGUAUGGAUCGGCAGA	447	ucuGccGAuccAuAcuGcG dTsdT	611	CGcAGuAUGGAUCGGcAGA dTsdT
121	CCUCUGCCGAUCCAUAC UG	284	CAGUAUGGAUCGGCAGAGG	448	ccucuGccGAuccAuAcuGd TsdT	612	cAGuAUGGAUCGGcAGAGG dTsdT
122	GCACCUCUCUUUACGCG GU	285	ACCGCGUAAAGAGAGGUGC	449	gcAccucucuuuAcGcGGud TsdT	613	ACCGCGuAAAGAGAGGUGC dTsdT
123	AAGAACUCCUCGCCUC GC	286	GCGAGGCGAGGGAGUUCU U	450	aaGAAcuccucGccucGcd TsdT	614	GCGAGGCGAGGGAGUUCU UdTsdT
124	GAACUCCUCGCCUCGC AG	287	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC	451	gaAcuccucGccucGcAGd TsdT	615	CUGCGAGGCGAGGGAGUUC dTsdT
125	UCUCUCAAUUUUCUAG GGC	288	GCCCUAGAAAAUUGAGAGA	452	ucucucAAuuuuucuAGGGc dTsdT	616	GCCCuAGAAAAUUGAGAGA dTsdT
126	GGGCGCACCUCUCUUUA CG	289	CGUAAAGAGAGGUGCGCCC	453	ggGcGcAccucucuuuAcGd TsdT	617	CGuAAAGAGAGGUGCGCCC dTsdT
127	CCGAUCCAUACUGCGGA AC	290	GUUCCGCAGUAUGGAUCGG	454	ccGAuccAuAcuGcGGAac dTsdT	618	GUUCCGcAGuAUGGAUCGG dTsdT
128	AACUCCUCGCCUCGCA GA	291	UCUGCGAGGCGAGGGAGU U	455	aacuccucGccucGcAGAd TsdT	619	UCUGCGAGGCGAGGGAGU UdTsdT
129	CUCCUCUGCCGAUCCAU AC	292	GUAUGGAUCGGCAGAGGA G	456	cuccucuGccGAuccAuAc dTsdT	620	GuAUGGAUCGGcAGAGGAG dTsdT
130	GGAGUGUGGAUUCGCA	293	GAGUGCGAAUCCACACUCC	457	ggAGuGuGGAuucGcAcuc	621	GAGUGCGAAUCcAcACUCCd

ФИГ. 4 (продолжение)

	CUC				dTsdT		TsdT
131	CGGGCGCACCUCUCUUU AC	294	GUAAAGAGAGGUGCGCCCG	458	cgGGcGcGcAccucucuuuAc dTsdT	622	GuAAAGAGAGGUGCGCCCG dTsdT
132	GUCUCAAUCCGCCGCGUC GC	295	GCGACGCGGCGGAUUGAGAC	459	gucucAAucGccGcGucGcd dTsdT	623	GCGACGCGGCGGAUUGAGAC dTsdT
133	AUCCAUACUGCGGAACU CC	296	GGAGUUCCGCAGUAUGGA U	460	auccAuAcuGcGGAACucc dTsdT	624	GGAGUUCCGCAGuAUGGAU dTsdT
134	CGCACCUCUCUUUACGC GG	297	CCGCGUAAAGAGAGGUGCG	461	cgcAccucucuuuAcGcGGd dTsdT	625	CCGCGuAAAGAGAGGUGCG dTsdT
135	CAACGACCGACCUUGAG GC	298	GCCUCAAGGUCGGUCGUUG	462	caAcGAcGAccuuGAGGc dTsdT	626	GCCUcAAGGUCGGUCGUUG dTsdT
136	CCAUACUGCGGAACUCC UA	299	UAGGAGUUCCGCAGUAUG G	463	ccAuAcuGcGGAACuccuA dTsdT	627	uAGGAGUUCCGCAGuAUGG dTsdT
137	UGAAUCCCGCGGACGAC CC	300	GGGUCGUCCGCGGGAUUCA	464	ugAAucccGcGGAcGAc dTsdT	628	GGGUCGUCCGCGGGAUUCa dTsdT
138	AGAACUCCUCGCCUCG CA	301	UGCGAGGCGAGGGAGUUC U	465	agAAcucccucGccucGcAd dTsdT	629	UGCGAGGCGAGGGAGUUC UdTsdT
139	GGCGCACCUCUCUUUAC GC	302	GCGUAAAGAGAGGUGCGCC	466	ggcGcAccucucuuuAcGcd dTsdT	630	GCGuAAAGAGAGGUGCGCC dTsdT
140	GCGCACCUCUCUUUACG CG	303	CGCGUAAAGAGAGGUGCGC	467	gcGcAccucucuuuAcGcGd dTsdT	631	CGCGuAAAGAGAGGUGCGC dTsdT
141	GCUGAAUCCCGCGGACG AC	304	GUCGUCCGCGGGAUUCAGC	468	gcuGAAucccGcGGAcGAc dTsdT	632	GUCGUCCGCGGGAUUCAGC dTsdT
142	CACUUCGCUUACCCUCU GC	305	GCAGAGGUGAAGCGAAGUG	469	cacuucGcuucAccucucGcd dTsdT	633	GcAGAGGUGAAGCGAAGUG dTsdT
143	CUCAAUCGCCGCGUCGC AG	306	CUGCGACGCGGCGAUUGAG	470	cucAAucGccGcGucGcAG dTsdT	634	CUGCGACGCGGCGAUUGAG dTsdT
144	UCCCGUCGGCGCUGAAU CC	307	GGAUUCAGCGCCGACGGGA	471	ucccGucGGcGcuGAAucc dTsdT	635	GGAUUCAGCGCCGACGGGA dTsdT
145	CUGAAUCCCGCGGACGA CC	308	GGUCGUCCGCGGGAUUCAG	472	cuGAAucccGcGGAcGAcc dTsdT	636	GGUCGUCCGCGGGAUUCAG dTsdT

ФИГ. 4 (продолжение)

146	AGAGUCUAGACUCGUG GUG	309	CACCACGAGUCUAGACUCU	473	agAGucUAGAcucGuGGu GdTsdT	637	cACcACGAGUCuAGACUCUd TsdT
147	UCCAUACUGCGGAACUC CU	310	AGGAGUUCCGCAGUAUGGA	474	uccAuAcuGcGGAAcuccu dTsdT	638	AGGAGUUCCGcAGuAUGGA dTsdT
148	GCGCUGAAUCCCGCGGA CG	311	CGUCCGCGGGAUUCAGCGC	475	gcGcuGAAucccGcGGAcG dTsdT	639	CGUCCGCGGGAUucAGCGC dTsdT
149	AGUGUGGAUUCGCACU CCU	312	AGGAGUGCGAAUCCACACU	476	aguGuGGAuucGcAcuccu dTsdT	640	AGGAGUGCGAAUCcAcACU dTsdT
150	CCCUGCUCGUGUACAG GC	313	GCCUGUAACACGAGCAGGG	477	cccuGcucGuGuuAcAGGc dTsdT	641	GCCUGuAAcACGAGcAGGGd TsdT
151	GAAUCCCGCGGACGACC CG	314	CGGGUCGUCCGCGGGAUUC	478	gaAucccGcGGAcGAcccG dTsdT	642	CGGGUCGUCCGCGGGAUUC dTsdT
152	AAGCUGUGCCUUGGGU GGC	315	GCCACCCAAGGCACAGCUU	479	aaGcuGuGccuuGGGuGG cdTsdT	643	GCCACCCaAGGcAcAGCUUd TsdT
153	GCCCUGCUCGUGUACA GG	316	CCUGUAACACGAGCAGGGC	480	gccccGcucGuGuuAcAGG dTsdT	644	CCUGuAAcACGAGcAGGGCd TsdT
154	GUCCCGUCGGCGUGAA UC	317	GAUUCAGCGCCGACGGGAC	481	gucccGucGGcGcuGAAuc dTsdT	645	GAUucAGCGCCGACGGGAC dTsdT
155	AUCUUAUCAACACUCC GG	318	CCGGAAGUGUUGAUUAAGA U	482	aucuuAucAAcAcuuccGG dTsdT	646	CCGGAAGUGUUGAuAAGAU dTsdT
156	CUUAUCAACACUCCGG AA	319	UUCCGGAAGUGUUGAUAA G	483	cuuAucAAcAcuuccGGAA dTsdT	647	UUCCGGAAGUGUUGAuAAG dTsdT
156	CUUAUCAACACUCCGG AA	320	TUCCGGAAGUGUUGAUUAAG	484	CfuUfaUfcAfaCfaCfuUfcC fgGfaAf(invdt)	648	pdTUfcCfgGfaAfgUfgUfuGfa UfaAfgdTsdT

ФИГ. 4 (продолжение)

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

Положение 17мера в уч.№ AM282986.1	Немодифицированная дсРНК из Таблицы 1		Модифицированная дсРНК из Таблицы 2		Последовательность 17мера сайта-мишени (5'- 3')	Перекрывание генотипа [%]			
	Пара SEQ ID No.	Пара SEQ ID No.	Пара SEQ ID No.	Пара SEQ ID No.		A (n=332)	B (n=615)	C (n=1332)	D (n=475)
456	1/157	17/177	321/485	341/505	AAGGUAUGUUGCCCGUU	91.3	94.3	94.9	78.3
383	3/159	3/160	323/487	324/488	CUGCGGCGUUUUAUCAU	96.7	95.9	95.9	94.3
1828	4/161	6/163	325/489	327/491	CCUCUGCCUAAUCAUCU	95.5	81.8	96.8	92.8
1782	7/164	2/158	328/492	322/486	UGUAGGCAUAAAUUGGU	97.9	96.1	95.9	97.5
381	8/165	8/166	329/493	330/494	GUCUGCGGCGUUUUAUC	96.4	84.9	94.0	93.9
679	9/167	9/168	331/495	332/496	ACUAGUGCCAUUUGUUC	96.4	90.4	94.9	94.7
687	11/170	13/173	334/498	337/501	CAUUUGUUCAGUGGUUC	96.7	90.4	96.1	97.7
1177	12/171	12/172	335/499	336/500	CAAGUGUUUGCUGACGC	91.3	95.9	91.8	77.5
677	14/174	5/162	338/502	326/490	UUACUAGUGCCAUUUGU	95.5	88.9	94.2	94.7
668	16/176	18/178	340/504	342/506	UGGCUCAGUUUACUAGU	97.0	94.6	91.0	94.7
1778	19/179	23/183	343/507	347/511	AGGCUGUAGGCAUAAAU	97.9	95.8	96.2	97.5
674	20/180	28/189	344/508	353/517	AGUUUACUAGUGCCAUU	95.2	88.3	93.8	93.9
458	21/181	30/191	345/509	355/519	GGUAUGUUGCCCGUUUG	94.6	96.1	98.1	80.2
382	24/184	37/199	348/512	363/527	UCUGCGGCGUUUUAUCA	96.7	95.6	95.3	95.8
1818	25/185	10/169	349/513	333/497	AACUUUUUCACCUCUGC	96.1	92.0	96.5	84.8
1576	26/186	26/187	350/514	351/515	CGUGUGCACUUCGCUUC	97.6	98.4	98.3	95.6
258	29/190	42/204	354/518	368/532	GGUGGACUUCUCUCAAU	91.9	83.6	97.3	90.5
189	31/192	91/254	356/520	418/582	UGCUCGUGUUACAGGCG	93.7	93.0	93.8	76.0
461	32/193	22/182	357/521	346/510	AUGUUGCCCGUUUGUCC	95.5	96.1	98.4	79.8
455	33/194	27/188	358/522	352/516	CAAGGUAUGUUGCCCGU	91.0	95.4	93.5	93.3
2317	34/195	34/196	359/523	360/524	CUUAUCAACACUCCGG	89.8	89.8	94.8	77.7
1827	35/197	15/175	361/525	339/503	ACCUCUGCCUAAUCAUC	95.8	82.1	96.5	92.8
1655	36/198		362/526		UAAGAGGACUCUUGGAC	92.2	88.1	90.2	91.4
1438	38/200		364/528		GCGCUGAAUCCCGCGGA	95.5	94.1	92.0	79.6

ФИГ. 5

2419	39/201	365/529	GCGUCGCAGAAGAUCUC	94.6	89.6	92.3	83.2
1680	40/202	366/530	AUGUCAACGACCGACCU	96.7	83.9	93.6	93.5
671	41/203	367/531	CUCAGUUUACUAGUGCC	96.7	94.8	92.6	94.7
2414	43/205	369/533	UCGCCGCGUCGCAGAAG	88.6	84.1	95.1	92.4
686	44/206	370/534	CCAUUUGUUCAGUGGUU	96.7	90.4	96.0	97.5
1263	45/207	371/535	GAUCCAUACUGCGGAAC	97.3	89.9	93.8	95.6
1826	46/208	372/536	CACCUCUGCCUAAUCAU	96.1	81.8	96.5	91.6
260	47/209	373/537	UGGACUUCUCUCAUUU	91.6	83.4	97.3	90.7
2821	48/210	374/538	GGUCACCAUAUUCUUGG	86.7	95.4	96.5	85.3
2417	49/211	375/539	CCGCGUCGCAGAAGAUC	94.9	94.8	95.0	92.2
2411	50/212	376/540	CAAUCGCCGCGUCGCAG	87.7	84.6	94.3	90.9
375	51/213	377/541	GGAUGUGUCUGCGGCGU	95.2	85.7	94.5	93.7
1859	52/214	378/542	ACUGUUCAAGCCUCCAA	68.4	91.9	97.0	96.4
676	53/215	379/543	UUUACUAGUGCCAUUUG	95.5	88.9	94.1	94.7
680	54/216	380/544	CUAGUGCCAUUUGUUCA	96.1	90.2	94.9	94.7
2418	55/217	381/545	CGCGUCGCAGAAGAUCU	95.2	94.8	95.0	92.4
2315	56/218	382/546	AUCUUAUCAACACUUCC	90.1	89.8	94.8	78.3
303	57/219	383/547	GCCAAAAUUCGCAGUCC	98.5	97.2	85.7	94.7
1825	58/220	384/548	UCACCUCUGCCUAAUCA	96.7	82.0	96.6	92.0
672	59/221	385/549	UCAGUUUACUAGUGCCA	94.9	88.5	93.8	94.1
463	60/222	386/550	GUUGCCCGUUUGUCCUC	94.9	95.1	98.4	78.9
682	61/223	387/551	AGUGCCAUUUGUUCAGU	96.1	89.9	94.8	94.5
1779	62/224	388/552	GGCUGUAGGCAUAAAUU	97.9	96.3	96.3	97.7
378	63/225	63/226 389/553 390/554	UGUGUCUGCGGCGUUUU	96.7	84.9	93.5	94.3
1584	64/227	391/555	CUUCGCUUCACCUCUGC	97.6	98.4	97.9	95.4
1577	65/228	392/556	GUGUGCACUUCGCUUCA	97.6	98.2	98.5	95.4
257	66/229	393/557	UGGUGGACUUCUCUCAA	91.9	83.6	97.1	90.5
379	67/230	394/558	GUGUCUGCGGCGUUUUA	96.1	84.9	93.6	94.1
457	68/231	395/559	AGGUAUGUUGCCCGUUU	91.3	94.8	96.7	79.2

ФИГ. 5 (продолжение)

1684	69/232	396/560	CAACGACCGACCUUGAG	96.4	85.4	94.1	93.3
1654	70/233	397/561	AUAAGAGGACUCUUGGA	92.2	87.8	90.2	91.2
1683	71/234	398/562	UCAACGACCGACCUUGA	96.7	85.7	94.2	93.1
2829	72/235	399/563	UAUUCUUGGGAACAAGA	87.0	96.7	97.1	85.1
190	73/236	400/564	GCUCGUGUUACAGGCGG	94.9	93.3	94.0	76.0
2412	74/237	401/565	AAUCGCCGCGUCGCAGA	88.0	85.7	95.1	92.8
1860	75/238	402/566	CUGUUCAAGCCUCCAAG	68.4	91.7	97.0	96.4
2416	76/239	403/567	GCCGCGUCGCAGAAGAU	88.3	83.6	93.8	90.7
688	77/240	404/568	AUUUGUUCAGUGGUUCG	96.7	90.6	96.1	97.7
1440	78/241	405/569	GCUGAAUCCCGCGGACG	95.8	95.3	92.8	79.8
2820	79/242	406/570	GGGUCACCAUAUUCUUG	86.4	95.3	96.8	85.3
1255	80/243	407/571	CCUCUGCCGAUCCAAC	97.6	90.2	94.9	88.8
1681	81/244	408/572	UGUCAACGACCGACCUU	96.7	85.7	94.3	93.7
1829	82/245	409/573	CUCUGCCUAAUCAUCUC	95.8	82.8	97.0	89.3
1575	83/246	410/574	CCGUGUGCACUUCGCUU	97.6	98.5	98.3	95.8
1260	84/247	411/575	GCCGAUCCAUAUCGCGG	97.0	88.6	92.9	95.2
243	85/248	412/576	AGAGUCUAGACUCGUGG	93.7	96.9	95.7	96.0
1861	86/249	413/577	UGUUCAAGCCUCCAAGC	68.4	91.7	96.9	96.4
1777	87/250	414/578	GAGGCUGUAGGCAUAAA	97.9	95.8	96.3	97.7
1776	88/251	415/579	GGAGGCUGUAGGCAUAA	96.7	95.4	96.2	97.7
259	89/252	416/580	GUGGACUUCUCUCAAUU	91.9	83.7	97.5	90.7
1817	90/253	417/581	CAACUUUUUCACCUCUG	95.8	91.7	96.2	84.4
681	92/255	419/583	UAGUGCCAUUUGUUCAG	96.1	89.9	94.9	94.7
1259	93/256	420/584	UGCCGAUCCAUAUCGCG	96.7	88.5	92.8	94.9
1578	94/257	421/585	UGUGCACUUCGCUUCAC	97.6	98.0	98.6	95.8
191	95/258	422/586	CUCGUGUUACAGGCGGG	94.9	92.7	92.5	96.0
2313	96/259	423/587	CUAUCUUUAUCAACACUU	90.1	89.4	95.3	78.3
2409	97/260	424/588	CUCAAUCGCCGCGUCGC	88.6	85.2	96.7	93.1
1548	98/261	425/589	CCCUCUGUGCCUUCUC	97.9	96.7	95.7	98.1

ФИГ. 5 (продолжение)

2314	99/262	426/590	UAUCUUAUCAACACUUC	90.1	89.8	94.9	78.3
462	100/263	427/591	UGUUGCCCGUUUGUCCU	95.2	95.3	98.4	79.2
460	101/264	428/592	UAUGUUGCCCGUUUGUC	95.5	96.1	98.3	79.6
1585	102/265	429/593	UUCGCUUCACCUUGCA	97.3	98.4	97.8	94.7
1579	103/266	430/594	GUGCACUUCGCUUCACC	97.9	98.4	98.6	95.8
304	104/267	431/595	CCAAAAUUCGCAGUCCC	98.5	97.4	85.9	95.2
188	105/268	432/596	CUGCUCGUGUUACAGGC	93.7	93.0	93.8	75.8
2267	106/269	433/597	GGAGUGUGGAUUCGCAC	93.7	96.4	94.4	97.3
1686	107/270	434/598	ACGACCGACCUUGAGGC	96.4	85.9	93.8	93.1
242	108/271	435/599	CAGAGUCUAGACUCGUG	93.1	96.7	94.9	92.6
2413	109/272	436/600	AUCGCCGCGUCGCAGAA	88.6	84.1	95.0	92.8
459	110/273	437/601	GUAUGUUGCCCGUUUGU	95.2	95.9	98.3	79.6
1261	111/274	438/602	CCGAUCCAUAUCGCGGA	97.3	89.8	94.1	96.0
2311	112/275	439/603	CCCUAUCUUAUCAACAC	93.7	88.9	95.3	78.3
675	113/276	440/604	GUUUACUAGUGCCAUUU	95.2	88.6	93.8	93.9
1682	114/277	441/605	GUCAACGACCGACCUUG	97.0	85.7	94.4	93.1
264	115/278	442/606	CUUCUCUCAAUUUUCUA	90.7	82.0	96.4	88.2
1408	116/279	443/607	CGCGGGACGUCCUUUGU	95.5	96.9	95.9	94.5
248	117/280	444/608	CUAGACUCGUGGUGGAC	95.5	97.2	96.5	97.1
1264	118/281	445/609	AUCCAUAUCGCGGAACU	97.9	89.4	94.1	95.6
1257	119/282	446/610	UCUGCCGAUCCAUAUCUG	96.7	88.5	91.1	86.9
1258	120/283	447/611	CUGCCGAUCCAUAUCGC	96.7	92.5	92.2	88.4
1256	121/284	448/612	CUCUGCCGAUCCAUAUCU	96.7	88.1	90.7	86.5
1527	122/285	449/613	CACCUCUCUUUACGCGG	95.8	94.6	95.9	98.3
2381	123/286	450/614	AGAACUCCCUCGCCUCG	91.6	95.8	97.3	89.9
2383	124/287	451/615	AACUCCCUCGCCUCGCA	97.3	95.8	97.3	90.5
267	125/288	452/616	CUCUCAAUUUUCUAGGG	90.1	82.3	96.4	87.6
1523	126/289	453/617	GGCGCACCUCUCUUUAC	95.5	95.1	95.6	97.9
1262	127/290	454/618	CGAUCCAUAUCGCGGAA	97.6	89.9	94.0	95.8

ФИГ. 5 (продолжение)

2384	128/291	455/619	ACUCCCUCGCCUCGCAG	97.6	95.8	96.9	90.1
1254	129/292	456/620	UCCUCUGCCGAUCCAUA	97.6	89.6	94.7	89.1
2268	130/293	457/621	GAGUGUGGAUUCGCACU	93.7	93.8	93.5	97.3
1522	131/294	458/622	GGGCGCACCUCUCUUUA	95.5	95.1	95.6	97.9
2408	132/295	459/623	UCUCAAUCCGCCGCGUCG	88.6	84.4	96.4	93.1
1265	133/296	460/624	UCCAUAUCUGCGGAACUC	97.6	88.5	91.2	95.2
1526	134/297	461/625	GCACCUCUCUUUACGCG	95.5	94.8	95.8	98.3
1685	135/298	462/626	AACGACCGACCUUGAGG	96.4	85.2	94.1	93.3
1267	136/299	463/627	CAUACUGCGGAACUCCU	97.6	88.1	90.1	95.2
1443	137/300	464/628	GAAUCCCGCGGACGACC	95.5	95.4	92.3	79.2
2382	138/301	465/629	GAACUCCUCGCCUCGC	97.3	96.1	97.9	91.6
1524	139/302	466/630	GCGCACCUCUCUUUACG	95.2	95.0	95.6	97.9
1525	140/303	467/631	CGCACCUCUCUUUACGC	95.2	94.8	95.8	98.3
1441	141/304	468/632	CUGAAUCCCGCGGACGA	95.8	95.3	94.1	79.6
1583	142/305	469/633	ACUUCGCUUACCCUCUG	97.6	98.4	98.2	96.6
2410	143/306	470/634	UCAAUCCGCCGCGUCGCA	88.0	84.6	94.8	92.0
1431	144/307	471/635	CCCGUCGGCGCUGAAUC	87.7	93.5	87.7	94.7
1442	145/308	472/636	UGAAUCCCGCGGACGAC	95.8	95.4	92.3	78.9
244	146/309	473/637	GAGUCUAGACUCGUGGU	93.7	96.7	96.0	95.8
1266	147/310	474/638	CCAUAUCGCGGAACUCC	97.6	88.3	89.9	95.2
1439	148/311	475/639	CGCUGAAUCCCGCGGAC	95.8	94.8	92.1	79.8
2270	149/312	476/640	GUGUGGAUUCGCACUCC	96.1	94.6	94.6	97.7
187	150/313	477/641	CCUGCUCGUGUACAGG	93.7	93.2	94.1	76.0
1444	151/314	478/642	AAUCCCGCGGACGACCC	95.5	95.4	92.4	79.2
1875	152/315	479/643	AGCUGUGCCUUGGGUGG	73.8	96.1	96.4	96.2
186	153/316	480/644	CCCUGCUCGUGUACAG	93.7	93.0	93.9	76.0
1430	154/317	481/645	UCCCGUCGGCGCUGAAU	87.3	93.5	87.6	94.7
2316	155/318	482/646	UCUUAUCAACACUCCG	89.8	89.8	94.8	77.7
2318	156/319 156/320	483/647 484/648	UUAUCAACACUCCGGA	89.8	89.9	94.7	77.7

ФИГ. 5 (продолжение)

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

Генотип А

FJ692613	FJ692587	AF090838	FJ692590	DQ020003	AF090839	GQ477476	GQ477473
FJ692584	EU859907	AJ131570	EU859910	FJ349223	FJ023662	AY862867	EU859928
AY233287	AY233279	FJ692609	AF297624	AB270536	GQ331048	AM295795	FJ692555
EU859904	FJ692610	FJ692563	GQ477496	EU859934	FJ692582	AB453982	EU594391
FJ692579	EU859927	EU859942	EU859930	GQ477492	AY233281	EU594394	FJ692588
AY738141	GQ477481	AY934765	AM184126	AF143305	EU859902	EU859951	AY934773
GQ477482	AY738142	AY161141	GQ331046	DQ788725	FM199974	FJ692570	FJ692575
FJ692559	AB453988	AY373428	EU859950	EU859914	EU859922	GQ331047	AY233276
EU859924	AM410963	GQ477498	FJ692571	EU859948	GQ477479	AF143301	EU859954
GQ414522	DQ298164	GQ477465	EU594395	FJ692569	GQ477484	FJ692607	EU859908
FJ904434	AJ131573	AF418674	AB453983	FJ692594	EF208113	AF143303	EU859898
FJ692565	AB241115	AM184125	GQ477477	DQ315784	EU859947	EU859931	FJ692556
EU859944	EF208115	EU185786	AB222707	EU054331	FJ692566	AF297625	GQ477470
EU859918	EU859941	FJ692572	AF043580	GQ477501	DQ298162	GQ477497	AY233288
DQ788729	FJ692560	EU859953	DQ315786	AB126580	GQ477460	AY903452	AY934770
FJ692598	AY934766	AY934774	FJ692596	FJ692603	U87746	EU859911	AY233275
AY934763	AB246317	AY077735	EU859916	EU859909	AB194952	FJ692591	FJ692576
DQ298161	GQ477466	AB453980	DQ788727	FJ692574	AF090841	FJ692606	AF043560
AB194951	FJ904411	AM295797	FJ692601	EU859955	AF143299	GQ477504	EU594392
EU859938	EU185788	FM199979	GQ477503	AY233277	AY233284	AF143300	AB453987
GQ477463	AY233282	GQ477489	AF143307	AY934772	GQ477480	FJ692583	EU859900
AF090842	FJ692581	GQ477474	EU859936	FJ692589	AY738143	AY233280	AY233283
EU859944	EU859901	AM282986	AF297622	EU594390	AM494718	GQ477464	FJ692580
EU859925	FM199977	AF143302	GQ477490	FJ692554	EU859926	GQ477499	AY738139
FJ692558	AM295799	FJ692593	AY902775	EU859929	AY128092	AY373429	EU185789
AY738140	GQ477487	AY233290	EU594393	GQ477472	FJ692611	AY934764	AB222708
GQ477483	EU859921	AY934768	EU859956	AB453986	AY233278	FJ692562	GQ477485
FJ692578	GQ477467	EU859913	AY233274	GQ477500	EU859906	EU859943	GQ477478
EU859905	GQ161813	FJ692604	FJ692577	FJ692602	AY233285	EU410082	EU859923
FJ692585	EF208114	FJ349224	AY934771	FJ692595	FJ692586	FJ692608	EU859903
AY233286	AY934767	EU859933	AY233289	EU859949	EU185787	AF143306	FJ349222
FJ692612	EU859940	GQ477468	GQ477471	FJ692568	AF418675	FJ692600	AB330371
GQ477462	FJ692561	GQ477495	EU859899	EU859915	GQ477494	GQ477502	AB330372
EU859925	AB241114	AM295800	FJ692557	DQ315785	GQ477469	DQ788726	AB330373
EU086721	DQ298165	GQ477475	FM199981	GQ184323	EU859932	EU859917	AJ627226
AB194950	AY034878	GQ477488	AB453985	AF143304	FJ692605	FJ692597	AJ627227
EU859939	EU859920	AM295796	EU366129	GQ477493	EU859912	EU747320	AJ627228
AF143308	GQ477486	AB453981	AF297623	AF297621	AY934769	FM199980	AP007263
FJ692599	FM199976	FJ692573	GQ477491	EU859935	FJ692592	AB453984	EU304331
DQ788728	AM295798	EU859952	EU859937	DQ020002	GQ184324	AB453979	EU414132
EU859919	FJ692567	EU414134	DQ298163	AF090840	EU859945	S50225	V00866
FJ692564	AB453989	FM199978	EU859946	GQ477461	AF143298		

Генотип В

EU306702	GU332692	AB073842	AY800389	AY206377	AB106884	AB073843	FJ386688
GU332701	AB073822	AB493832	DQ463798	FJ386636	EU939630	EU939633	AJ131574
EF473975	AY596102	GQ924634	EU939670	D23678	FJ386656	DQ463787	AB073840
FJ787444	DQ904357	AY167098	AY596103	DQ993680	AB116083	FJ386655	AB219429
D23679	EU882001	AB116082	AB073823	EF473974	GQ377641	AY293309	DQ361535
DQ993681	GQ924608	AB205122	GQ377596	AY781187	AF121243	U87747	AB493830
AY033072	GQ924654	EU306670	GQ377537	AY163870	GQ924635	EU564822	DQ993710
GQ924628	EU939671	EU939631	EU919175	EU306703	FJ386676	EU522074	AB365445

ФИГ. 6

EU919174	DQ463799	AB106885	GU332693	GU332700	AB493833	AB205120	EU882003
FJ562311	GQ377556	GQ924648	AY033073	FJ562222	FJ562262	FJ386675	FJ386582
FJ386615	GQ377568	EU305543	EU564823	GQ377549	FJ562312	AB073847	M54923
EU939673	DQ993683	AB219428	GQ377588	GU332702	GU332691	AB287317	EU660233
GQ924656	FJ386669	AB073841	AY217370	EU306701	EU939672	EU305545	AF121247
GU332690	GU332703	FJ032344	GQ924617	FJ386634	FJ386648	AP011087	GQ377573
EF103278	GQ377622	GQ924637	FJ386608	FJ386668	EU882002	FJ032342	EU522073
GQ377602	EU306700	AB205121	FJ386654	AY206375	DQ993711	GQ377639	FJ562246
EU919176	EU796068	AY330917	EU939632	DQ993682	FJ386583	GQ924611	EU564825
AB300364	EF473977	GQ377643	DQ448628	GQ377569	GQ924631	AY800391	X97851
GQ377595	FJ562260	EU522075	EF473976	AB073821	DQ993698	EU939634	DQ993684
AY220698	AB493831	FJ562240	FJ032358	GQ377594	AY217356	EU939668	AY206373
GQ377625	GU332697	GQ924610	AY217357	EU306695	EU306706	AB471854	AB493829
AF479684	EU919171	EU939669	DQ975271	EU939629	EU579441	AY217368	AB219430
GU332704	GQ377592	EU939635	DQ993699	EU939675	DQ993685	AY596105	EF473972
EU306707	AB073827	AY800390	GQ924630	EU881998	EU919173	GQ924653	DQ993686
AY781183	EU564824	AY163869	AB073826	FJ386584	EU306696	FJ386610	AF121245
EU882004	GQ377644	GQ377638	GU332696	FJ349296	GU332695	EU939676	AB073839
FJ349236	EU522072	EU305544	DQ377158	AY596106	FJ562316	EU306705	EU660231
EU939674	X97850	AB287316	GQ377604	EF473971	AB287329	GU332706	EU139543
EU939628	EU660232	AB073846	EU919170	AB100695	GQ377590	FJ562224	EU158262
GQ924651	AF121246	AP011086	GQ205440	GU332705	AB073825	AB205119	AB246335
EU330998	AB493835	GU332707	GQ377606	AB287314	EU660230	AY217364	AB073829
EU306677	AF282918	EU939677	GU332694	DQ993708	AY206380	AY596109	GQ377561
EU939636	AY206390	AY596104	AY217355	AY800392	FJ386660	EU881997	AB033555
DQ993709	EU487256	AY217369	AB241116	EU939637	EU306709	GQ924603	FJ386681
AY217374	AB241117	AB471855	GQ924632	EU158263	DQ995803	DQ463792	AY217358
EU796071	DQ993687	AB073824	EU487257	EU330999	FJ562289	FJ562254	DQ993696
AP011085	AB073858	AB287328	AY206391	FJ562219	D00329	GU332699	FJ518812
AB287315	EF473973	EU306697	AP011084	EU564826	AB073855	EU439022	AY167093
EU305547	EU306704	FJ562259	GQ377550	AB073838	AP011095	DQ980548	AP011089
AB073845	GQ377626	EU919172	AB073844	AF121244	DQ448620	AB287325	AB073849
AB287319	EU330994	AY217365	EU330995	DQ993697	GQ924641	FM209516	AB368295
FJ562234	EU570070	AB073854	AF121248	AY217359	EU939664	EU306698	GQ377629
EU939666	AB300371	DQ448621	AB073834	AB033554	EU939638	AB287327	AB493827
FJ386600	EU439023	AY220703	DQ993704	FJ386680	AY167102	EU439020	DQ995801
DQ993705	AB073828	AP011094	AY167101	GQ377582	DQ993707	AF100308	DQ448622
AY167100	AB287324	EU306708	GU357842	AB073837	AB010289	AY217366	FJ032352
AB073835	EU330989	DQ995802	EU939667	EU306679	FJ562236	AY766463	AB073857
AF121249	GU332698	AB300370	AP011088	EU919161	X98073	EU939678	GQ924621
AB231909	EU939627	EU919162	AB287318	EU306684	FJ386683	FJ386642	DQ993695
AB246339	DQ463793	EU570071	AB073848	EU330996	DQ993694	DQ463790	FJ518811
FJ386682	EU939639	DQ448623	EU306699	EF494381	EU939663	AB073850	AY217361
AF282917	EU939665	GQ377542	FJ562257	FJ386684	AY596110	D23677	DQ463797
X98072	EU330997	AB073856	GQ377558	DQ448619	AB195935	GQ924626	GQ924606
GQ377634	GQ377614	DQ463791	FJ032349	DQ463800	DQ993700	AB116090	AB212626
FJ562296	EU306678	EU939679	AB246340	AB073830	FJ787476	EU570069	AY596111
FJ562237	AB073836	AY217367	EU306710	EU570075	AB115551	AF121250	AB195934
EU305548	AY206383	AF100309	X98074	EU306683	AB117759	AB287320	FJ787477

ФИГ. 6 (продолжение)

AB195933	AB302095	AY518556	D00330	GQ377612	AB010292	GQ377564	DQ993701
DQ993706	FJ032353	AB287326	FJ562231	FJ562303	AP011090	EU660224	GQ924647
GQ924640	AP011096	EU439021	GU168597	GQ924646	DQ448625	EU331000	FJ386658
EU939662	AB246341	GQ377565	AY217363	GQ924624	GQ924644	EU330993	EU589335
GQ377613	EF494380	AB287321	EU547563	AB010290	DQ993702	GQ924638	GQ377547
EU306682	GU168596	AF121251	DQ463795	DQ995804	EU350409	FM209513	AB073853
EU330990	D00331	EF134945	FJ562253	AB073852	AB212625	EU439019	EU796067
AB073831	X98075	GQ924627	EU522066	DQ448627	AY596112	AB219427	AP011093
DQ463801	DQ463796	DQ448624	GQ377566	FJ032357	GQ377587	GU168595	AY220704
GQ377525	GQ924607	FJ032354	AB287322	EU796066	AB073832	X98076	DQ448626
AY167097	AY217360	AP011091	EF134946	AP011092	DQ463802	FJ562321	AB010291
FJ562322	EU331001	AB073851	EU595030	DQ463789	GQ377610	EU306712	FJ386666
EU306711	GQ377539	GQ377519	AY206387	EU939661	EU306681	AB246342	AB486012
GQ924625	GQ924659	AB219426	DQ463788	AB493834	FJ023634	D50521	AB302943
EU595031	DQ463794	FM209512	GQ924645	AB493836	FJ023635	D50522	AB302944
AY167089	EU939681	GQ924639	AB014366	AF461360	FJ023636	FJ023631	AB302945
EU439024	AY217362	EU330992	AB031267	AJ627225	FJ023637	FJ023632	AB362933
EU660227	X98077	EU306680	AB302942	AY167094	FJ023638	FJ023633	AB493828
AY220697	AJ131133	AB073833	EU522067	AB246343	AF233236	GQ377567	GU168594
AB287323	EF494382	DQ993703	GQ475340	EU439018	EU939660	FJ787475	

Генотип С

FJ562331	EU439009	EU916218	FJ386580	FJ386617	FJ386677	GQ475351	AB250109
AY781186	D23684	EU570067	EU939547	EU439015	AB195947	AF537372	AB111117
FJ562282	FJ023664	AB300366	AY373432	FJ032347	EU939586	GQ377640	GQ924614
GQ377620	AF411411	GQ475311	FJ787464	EU305540	GQ227696	AY330914	DQ089764
GQ475331	EU939567	GQ377600	FJ787438	EU916224	FJ787458	EU919168	EU872003
FJ562223	FJ386637	EU306722	DQ089778	DQ377160	AB241110	FJ562243	AB026815
EU916238	AY206376	GQ377536	AF461043	EU560440	GQ377576	EU564820	FJ787478
GQ377516	EU939651	AB471853	DQ089785	EU589339	AB367417	EU916204	AF068756
FJ882612	DQ089758	GQ377597	EU871982	AF533983	EU589345	FJ386657	FJ787485
EF137802	EU306691	AB198077	AB112063	EU939611	AF223956	DQ089799	AY217373
EU678475	FJ787439	EU916219	EU939566	FJ562283	AY217372	FJ562242	DQ975274
AB367394	FJ787465	EU306690	FJ882613	GQ377621	DQ089765	EU919169	AB241111
EU871983	AB485810	EU306723	GQ377517	FJ787484	GQ924615	EU306671	AY167099
DQ089784	EU882000	FJ562310	EU439008	FJ787479	AB111116	AB205123	FJ787459
GQ924655	AB198076	EU939650	EF137803	AB026814	GQ924649	GQ475350	EU939610
GQ924609	AB471852	DQ089759	FJ562330	FJ023659	DQ089798	GQ377577	EU916225
DQ089779	GQ377601	GQ924629	DQ536412	EU872002	AF223957	AB367416	EU589338
FJ386616	GQ475310	AF411410	EU916239	AB112348	EU589344	GQ227697	EU560441
EU939546	AB300367	FJ787445	GQ475330	AB367395	EU916205	EU939587	EU410079
FJ386581	NC_003977	FJ023665	AB064314	EU678474	EU564821	AB195946	DQ377161
FJ032346	EU939559	EU306672	AB241112	DQ377162	EU522068	EU939565	GQ475333
EU305541	FJ787487	AY330916	EU939579	FJ562261	GQ475313	FJ023666	FJ562280
GQ377557	EU872001	GQ377642	GQ227694	EU916226	EU306693	FJ787446	AY781184
DQ089766	GQ259588	GQ475353	EU939584	FJ787466	AB471851	AB247916	FJ562333
AB111115	FJ032339	AF223954	AB195945	EU939545	GQ377534	AY206389	D16665
GQ924616	AB367415	AB116080	EU305542	FJ386649	AB367409	AB048704	FJ032359
FJ386609	GQ377574	FJ386629	GQ377554	EU871980	EU660228	EU939653	AB367429
AB195939	GQ377528	EU939613	AB367435	DQ089787	DQ993181	AY206374	GQ377548
AB367396	EU916206	GQ924636	FJ032345	EU306720	EU939598	FJ386635	EU554538
AY217371	FJ562241	AY161139	EU594383	FJ562313	EU939539	FJ562221	FJ882610
GQ377514	AY161138	GQ475352	GQ377575	AB367428	DQ536410	FJ787447	EU306692
DQ377163	AB195944	EU306673	EU939558	EU796069	FJ562332	FJ023667	AB300365

ФИГ. 6 (продолжение)

DQ361534	EU939585	EU498227	AB367397	AB112408	AY781185	AF411412	GQ475312
EU916227	GQ227695	EU916207	AB195938	GQ377515	EU939652	GU385774	EU522069
AB300359	EU939578	EU589346	EU872000	EU554539	AB048705	GQ377535	GQ377603
GQ377555	EU939612	AB116081	FJ787486	FJ882611	AY206388	AB471850	FJ386614
EU439016	FJ386689	AF223955	AB111114	GQ377623	EU939564	AY220699	DQ089786
DQ478885	FJ386674	AB367414	DQ089767	FJ562281	EU787444	EU660229	EU871981
AB367434	FJ386628	FJ032338	AY152726	GQ475332	EU939538	AB367408	FJ787467
AB241113	AF537371	GQ377529	DQ478899	FJ562220	EU939599	EU306721	EU939544
AY206392	EU439010	GQ475328	FJ787480	AB246337	D23681	FJ787461	DQ089780
EU939648	AB367432	AB111112	AB367412	AF473543	FJ386632	AY596107	AY040627
EU939614	FJ562328	DQ089761	EF688062	AB116087	EU939608	FJ386578	EU871987
FJ386672	DQ377165	FJ386652	GQ475308	EU562219	EU939654	EU939542	FJ562314
EU414133	EU594384	FJ386599	GQ377619	FJ562308	GQ475334	FJ386585	DQ377159
AF411408	EU410080	AY217376	GQ475354	EU939562	FJ562287	AB037927	EU306727
EU939583	EU916221	EU678470	EU306675	AB176643	FJ562226	AB112066	EU306694
AB195942	FJ562266	AB111946	EU306688	AB241109	FJ562334	FJ386612	EU916241
GQ227693	EF494377	EU872006	EU589340	FJ023661	AB113878	DQ683578	GQ205441
GQ377553	AB493837	AB485808	EU560439	FJ787441	FJ882617	EU881999	AB300363
GQ475348	GQ377618	FJ386598	EU717218	FJ032343	AY206393	FJ386613	FJ882616
GQ377605	GQ475355	FJ787481	DQ377164	EU796072	GQ377593	EU871986	FJ562227
GQ475314	GQ475309	AB485809	FJ562329	EU439011	DQ980547	DQ089781	GQ377624
GQ377533	EU562218	AB026811	GQ475329	AF411409	EU554542	GQ924650	FJ562286
AP011108	EU560438	EU872007	EF494376	GQ227692	EU306726	FJ787460	GQ475335
AB112472	EU589341	DQ089760	FJ562267	AB195943	FJ562315	EU882005	FJ562335
EU306689	AB367413	AB111113	EU916220	EU939582	GQ475315	EU939543	AB074756
FJ562247	GQ377572	FJ386653	AB288026	FJ386673	GQ475349	FJ386579	AF462041
EU306674	EU678471	EU594385	GQ377552	EU939615	AB300362	AB113879	Y18858
EF536065	AY217377	EU410081	AB367433	EU939649	EU916240	AF384371	EU939655
EU939609	AB300361	DQ089782	AP011099	GQ377571	EF536066	EU872004	EU916223
AB202072	FJ562258	EU871978	D23683	AB471848	GQ475356	AB367393	EU594386
FJ386633	EU306725	AY707087	FJ023663	U87742	AB205125	EU678472	EU306719
AB176642	GQ377531	FJ562336	AY123424	FJ032360	EU522071	AB367430	GQ924633
EU939563	EU554541	AB074755	FJ787443	AB367410	FJ386650	FJ032340	FJ386670
D23680	FJ386587	FJ562278	EU939560	AB116078	DQ089763	EU439012	EU939616
FJ787440	EU939540	FJ562285	EU939656	EU589342	GQ924613	GQ377551	DQ975272
FJ023660	FJ787463	GQ475336	EU579442	FJ562244	EU871999	FJ562299	AB195940
GQ475316	EU882006	AF384372	AB202071	FJ562218	FJ787482	FJ562238	EU939581
GQ377607	EU871985	FJ882615	FJ386630	AB222714	AB026812	FJ562264	FJ386631
EU579443	AB205118	FJ787462	AB195941	EU306718	AY217375	AB116084	EU939591
EU939657	FJ562225	AB112471	DQ975273	EU594387	EU678473	EU522070	AB195950
FJ787442	FJ562279	GQ377530	EU939617	EU796070	AB367392	AB205124	EU939606
D23682	EU871979	EU554540	FJ386671	FJ032341	FJ386651	GQ475357	Y18857
EU939561	DQ089783	GQ377591	EU916222	AB367431	EU871998	AB222715	AB111120
FJ882614	EU871984	AB300360	AY057947	EU872005	GQ924612	FJ562245	GQ924623
AP011098	FJ386611	GQ475317	FJ562265	D28880	EU670263	AB471849	AF223961
FJ562337	AB112065	FJ562317	FJ562239	AB026813	DQ089762	GQ377570	FJ562228
GQ475337	EU939541	EU306724	FJ562298	FJ787483	AB116079	AB367411	FJ562274
FJ562284	FJ386586	EU939580	AB182589	AB115417	EU589343	FJ032361	EU916233
GQ377541	DQ089773	AP011106	EU155828	DQ922651	GQ872210	GQ377580	AB367401
DQ246215	AB368297	AB198081	AY641558	FJ562268	DQ089792	AB116089	AB198080
FJ032350	EU871974	FJ386620	DQ315783	EU717217	FJ904423	EU562217	GQ377560
AB299858	FJ386640	EU547558	GQ184325	EU306715	EU872008	FJ562306	DQ980549
AY220702	EU939626	EU939646	FJ562295	AB246345	FJ787473	FJ562248	AP011107
AB113876	GQ475346	FM209514	GQ377637	FJ562326	AB195930	EU306686	AY123041
AB367420	EU916213	EU939570	EF494379	AB074047	FJ386597	GQ475306	FJ562255
FJ386576	EU306729	FJ023673	AB493839	GU357843	AY217378	GQ377617	EU916212
EU872014	AB049609	FJ787453	GQ475326	GQ924643	EU939550	EU919163	AF286594
EU871989	AB367400	AJ309369	AJ344115	EU871995	GQ377521	DQ089804	GQ475347
EU306728	EU872015	FJ562275	AB246338	DQ890381	FJ349225	DQ922650	AY641559

ФИГ. 6 (продолжение)

EU871975	GQ377540	FJ562229	FJ562307	GQ377581	AB195931	GQ475327	DQ315782
AB368296	FJ882618	FJ386661	AB231908	GQ377520	FJ386601	AB493838	FJ518813
EU881996	AB367421	Y18856	EU562216	FJ032331	GQ872211	EF494378	EU939571
DQ089772	AB113877	AY206381	AB116088	FJ787472	DQ089793	FJ562294	FM209515
EU871988	FJ032351	EU939607	AB493844	EU872009	EU871994	GQ377636	EU155829
FJ386641	AF223960	GQ924622	GQ377616	DQ986375	GQ924642	FJ562327	AY167092
AB037928	FJ562288	AB111121	GQ475307	AB365451	EU871969	AB246344	FJ787452
FJ386577	EU916232	AB195951	EU306687	EU939551	FJ562235	EU306714	FJ023672
AY596108	AY247032	EU939590	FJ562249	FJ386596	FJ562269	EU717216	EU939647
EU547559	FJ562304	FJ787471	GQ475324	FJ518810	DQ478900	EU881995	GQ377543
FJ386621	EU562215	DQ986376	GQ377635	EU939572	AP011104	DQ089771	DQ993688
FJ032332	D50489	AB365452	FJ562297	FJ562318	AB367402	AF498266	AB195952
GQ377523	DQ089790	DQ315781	EU939618	FJ562256	FJ787490	GQ475338	EU939593
AB206817	EU871997	AB042284	EU939644	EU916211	EU872016	EU916231	AB111122
AB300373	FJ386602	FJ562324	FJ386622	GQ475318	FJ386574	AY247031	AF458664
GQ377615	EU939552	EU594388	AB033557	GQ377609	AF182802	FJ562276	FJ386662
AB493847	FJ386595	EU306717	AY167091	GQ475344	FJ386589	AB367422	AY206382
EU570072	AB115418	EU717215	FJ023671	GQ377563	EU939624	AY220700	Y18855
AB116076	AB195932	AY057948	FJ787451	AB198083	EU871976	AP011097	EU939658
EU939604	EU306716	EU871996	AB206816	AB195953	GQ377628	AM180624	GQ475319
FJ787450	AB246346	DQ089791	GQ377522	DQ993689	FJ562339	FJ386575	EU916210
FJ023670	FJ562325	FJ386603	GQ377583	GQ372968	FJ386643	AP011105	EU717212
AY167090	AB042285	EU570073	GQ924620	AY220701	EU939625	DQ478901	EU589337
EU939573	GQ475325	EU306685	AB111123	AB113875	DQ089770	AB198082	FJ562323
FJ386623	GQ184326	GQ475305	AF458665	AB367423	EU871977	GQ377562	AB042283
EU939645	FJ386594	AB300372	EU939605	FJ562277	EU872017	AB367403	GQ475323
EU939619	EU939553	FJ562305	EU939659	AY247030	AY077736	FJ562319	GQ377632
AB033556	FJ787470	AB116077	FJ386663	EU916230	FJ386588	GQ377608	FJ562290
EU717214	AJ748098	FJ032333	EU939592	GQ475339	AF182803	GQ475345	FJ386679
FJ386625	AB367419	AB111119	EU439007	DQ089756	AP011103	EU939549	EU939554
EU939643	GQ377524	EU871990	AB367425	EU939603	GQ377599	AF182805	AB426467
AB033550	GQ377578	DQ089797	GQ377518	AY206385	AB198079	EU547561	DQ089796
FJ787456	GQ377585	FJ386605	GQ377544	FJ386639	AB198084	FJ386645	EU871991
AY167096	DQ980551	FJ386659	AB195955	FJ386665	GQ377538	FJ386619	AB111118
EU939575	AB493840	EU939555	EU939594	AY206378	AB367405	EU939623	FJ386604
DQ993693	EU919166	FJ386592	FJ349241	AB300368	AY641561	AY306136	EU919167
EU939588	AB298721	FJ562271	EU939569	GQ475343	DQ089800	DQ089776	AB493841
AB195949	AB049610	EU916236	AJ309370	EU916216	FJ787436	EU871971	EU570074
FJ032335	AF223958	FJ032355	AB111125	FJ562251	EU872011	FJ386593	AF223959
FJ562302	AF182804	FJ787468	FJ787489	EU939597	AB493843	AB014385	FJ023643
AB298720	EU939548	EU871973	EU939557	EU939536	GQ377611	AB014389	FJ023644
AB367418	AB198078	GQ924658	AB195937	AB367406	EU919165	AB014391	FJ023645
FJ032334	GQ377598	GQ924604	AB367398	AY641562	GQ377527	AB014392	FJ023646
GQ377584	AP011102	DQ089774	D12980	DQ089803	GQ377586	AB014393	FJ023647
DQ980550	DQ089801	DQ089789	GQ377526	AP011100	FJ032336	AB014394	FJ023648
GQ377579	EU660225	EU939621	FJ032337	EU916215	FJ787488	AB014396	FJ023649
FJ787457	AY641560	AB106895	FJ562301	FJ562252	AB367399	AB014399	FJ023650
AB195948	AB367404	FJ386647	EU919164	AY066028	AB195936	AB031262	FJ023653
EU939589	EU570068	EU916214	AF536524	FJ562340	EU939556	AB031265	FJ023654
DQ993692	FJ562250	GQ475341	AB493842	DQ089788	FJ386591	AB076678	FJ023656
EU939574	EU916217	DQ089802	EU916208	DQ089775	FJ386606	AB076679	FJ023657
EU939642	GQ475342	EU660226	AB033552	EU871972	GU357845	AB105172	FJ023658
FJ386685	AB300369	EU439025	EU939641	FJ386646	GQ924619	AB105173	FJ023668
FJ386624	DQ089757	AY641563	FJ386686	EU547562	DQ089769	AB105174	FJ023674
FJ386678	AB111124	AB367407	FJ386627	EU939620	EU871993	AB116085	FJ023675
AB033551	AY206379	AP011101	DQ993691	FJ787469	DQ089794	AB362931	FJ023676
AB042282	FJ386664	FJ787448	EU939577	EU872012	AB014360	AB362932	L08805
EU589336	FJ386638	EU939537	FJ787454	GQ475320	AB014362	AB367800	L13994
M38636	AY206384	EU939596	FJ562233	FJ562293	AB014363	AB367803	M38454

ФИГ. 6 (продолжение)

EU717213	EU939602	AB195957	EU916228	GQ377631	AB014364	AB367804	S75184
FJ562230	EU939568	FJ386667	FJ562292	EU916229	AB014365	AF461357	V00867
GQ377633	EU939595	EU939601	GQ377630	FJ562232	AB014367	AF461358	X01587
FJ562291	AB195954	AF363962	GQ475321	EU717211	AB014369	AF461359	X02763
GQ475322	AJ309371	EU916234	AB205152	EU306713	AB014370	AF461361	X04615
AB050018	AB367424	FJ562273	EU554537	FJ562320	AB014371	AF461363	X14193
GQ377559	EU439006	EU554536	FJ032356	EU939576	AB014372	AJ012207	X52939
FJ032348	EU554535	GQ377546	AF241410	AF330110	AB014374	D00630	X70185
EU939622	GQ377545	AB367427	AB367426	DQ993690	AB014376	D16666	X75656
FJ386618	AB117758	AF241411	AF363963	FJ787455	AB014377	D16667	X75665
EU547560	DQ922649	EU439005	FJ562272	AY167095	AB014378	D50517	Z35717
FJ386644	EU916237	FJ386607	EU916235	AB033553	AB014379	D50518	Z72478
EU871970	FJ562270	DQ089795	EU939600	FJ386626	AB014380	D50519	Z72479
DQ089777	AF363961	EU871992	AY206386	FJ386687	AB014381	D50520	FJ023642
EU872010	AY148342	DQ089768	FJ787449	EU939640	AB014382	FJ023639	AB014384
FJ787437	X51970	GQ924618	FJ023669	FJ562300	AB014383	FJ023641	EU916209
AM180623	EU872013	FJ787474	AB195956				

Генотип D

AY721606	AF121240	GU456638	FJ349214	EU594409	EU594389	GU456672	AB330369
FJ904397	GQ377589	AY161162	EU787440	FJ904403	AJ344116	M32138	AB330370
FJ904414	EU919197	AB270543	GQ167302	AY741797	AY721612	FJ904447	AF280817
EU787447	AB222711	AY236163	AB048701	AY721611	DQ315780	FJ904398	AJ627215
FJ349213	EU594400	GU456644	DQ111987	EU414141	AY741794	AY721609	AJ627216
GU456680	GU456663	GQ205382	EU594425	AY902770	AY233293	X59795	AJ627217
X97848	EU921418	EU594427	GQ205380	AB119256	FJ904420	EU787437	AJ627218
AJ131956	DQ315777	DQ486024	GU456646	AB493845	EU414142	FJ904438	AJ627219
FJ349233	L27106	AB188245	FJ349228	X80925	AY902773	AY161157	AJ627220
AB270546	AB270544	AB205127	AB270541	AY862864	GU456649	GU456651	AJ627221
FJ562263	AY236164	EU787442	AF121239	GU456657	AB119255	AB090269	AJ627222
EU414136	FJ904436	FJ349216	AY236161	EU594434	AB493846	EU594432	AJ627223
GU456661	AY161159	AF418687	GU456666	AY161151	GU456675	EU939680	AJ627224
AB210821	AY373430	GU456678	AB033559	AB270550	EU594416	EF103276	DQ336674
EU594402	EU787439	AB048703	EU594405	EU594397	FJ904440	AY796030	DQ336675
FJ904408	FJ349231	EU594398	FJ349208	GQ477455	GQ922000	AM494716	DQ336676
AF121242	EF103285	FJ904431	AY161160	GQ922002	GQ477457	FJ904418	DQ336677
DQ304548	AY661793	GU456658	DQ111986	GU456677	EU594436	FJ904444	DQ336678
AB222713	DQ329357	AB210818	AF418684	FJ904442	GU456655	GU456671	DQ336679
EU594422	FJ349211	AB471856	FJ904412	AF418688	AY161153	GQ477453	DQ336680
AY945307	EU787445	DQ304551	AF418679	FJ349219	AB109476	AY902777	DQ336681
GU456641	FJ904416	AB205126	EU787441	AB205128	AY233295	FJ904424	DQ336682
GQ205387	AF418680	FJ562309	FJ349215	FJ904422	AB270548	FJ386590	DQ336683
FJ904428	GU456682	DQ486025	AF043594	EU594428	EU414138	AB119251	DQ336684
AY161147	FJ904395	AB188244	GQ477459	EU414140	FJ904406	AY090453	DQ336685
DQ486021	EU594382	GQ205383	GQ924652	AY721610	AF418690	FJ904404	DQ336686
Y07587	DQ315776	GU456645	FJ349235	AY233291	AB119253	AF418692	DQ336687
FJ349232	AB270545	EU594426	FJ904432	AY741796	GQ205389	DQ315779	DQ336688
FJ904435	EU921419	AY236162	AB109478	FJ349205	GU357846	GQ184322	DQ336689
X97849	EU594401	AY741798	AB110075	FJ904402	FJ349221	GQ477452	DQ336690
GU456681	EU414135	AB270542	AB222709	GU456637	FJ904426	GQ922005	DQ336692
FJ904415	GU456662	AY161163	BF103281	EU594408	AY161149	GU456670	DQ464164
FJ349212	AB210822	AB267090	FJ349209	AB119254	AY721608	FJ904445	DQ464165
EU787446	AB222710	EU594406	AY161161	GU456648	FJ904399	EU155893	DQ464166
AB116266	AB270539	GU456639	AB033558	AY902772	FJ904446	FJ904419	DQ464167
FJ904396	AF121241	GU456665	GU456667	EU414143	GU456673	DQ991753	DQ464168
AF043593	AB078033	AB471857	EU594404	AB090270	EU594410	AY796031	DQ464169
AY721607	DQ486022	GQ377532	AY236160	FJ904421	AY796032	EF103277	DQ464170
AB188241	AB188243	DQ304550	AB246348	AY741795	AY161155	GU456650	DQ464172

ФИГ. 6 (продолжение)

FJ904429	GQ205379	AB210819	AB270540	AY233292	EU594430	EU594433	DQ464173
AB078031	GU456642	GU456659	FJ349229	AJ132335	GU456653	AB090268	DQ464174
EU594423	GQ205384	FJ904430	EU594424	AB246347	AY902769	EU787436	DQ464175
GQ205386	EU594421	EU594399	GU456647	AJ344117	FJ349220	AY161156	DQ464178
GU456640	FJ904394	GU456684	GQ205381	DQ399006	AY161148	FJ904439	DQ464181
AY341335	AY721605	GU456679	AB493848	GU456668	FJ904427	AB126581	DQ464182
AB222712	GU456683	GQ167301	AF418689	FJ904401	AY902774	AY233296	GQ922004
DQ304549	FJ349210	AB048702	FJ904443	FJ349206	GQ205388	DQ315778	X02496
FJ904409	AF418681	FJ349217	FJ349218	AB109477	AB119252	FJ904405	X65257
AB210820	FJ904417	EU787443	EU594415	X80926	DQ304547	AY090452	X65258
GU456660	EF103279	AF418686	GU456676	AY161152	AF418691	AB270537	X65259
EU414137	AY661792	FJ904410	GQ477454	GU456654	FJ904407	FJ904425	X68292
EU594403	DQ329356	EF103280	EU594396	GQ922001	EU414139	AY902776	X72702
AB270547	AY373431	AB109479	GQ922003	FJ562338	AB270549	GQ205377	X85254
GQ205385	AY161158	AM422939	AY161150	GQ477456	U95551	AB104709	Z35716
GU456643	FJ904437	FJ349234	GU456656	FJ904441	AY233294	AB104710	V01460
GQ205378	FJ349230	FJ904433	EU594435	GU456674	EU594431	AB104711	AB330368
DQ486023	EU787438	GQ477458	AF151735	FJ904400	AY902768	AB104712	EF103275
AB078032	EU594407	GQ377627	X80924	FJ349207	GU456652	AB330366	GU456635
AB188242	AB120308	FJ904413	AB109475	GU456669	AY161154	AB330367	GU456636
AB270538	GU456664	AF418685					

ФИГ. 6 (продолжение)

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

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

ФИГ. 7

337/501	24	9	95.2	324/488	15	2	95.8	5	43	24	99.60	11
337/501	24	9	95.2	333/497	21	7	93.5	6	44	25	99.71	8
337/501	24	9	95.2	336/500	23	8	90.2	7	47	26	99.71	8
341/505	31	11	91.5	322/486	14	1	96.4	5	50	27	99.85	4
341/505	31	11	91.5	324/488	15	2	95.8	5	57	28	99.67	9
351/515	38	15	97.7	337/501	24	9	95.2	6	60	29	99.75	7
351/515	38	15	97.7	342/506	32	12	93.2	8	60	30	99.93	2

ФИГ. 7 (продолжение)

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

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

ФИГ. 8

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202191537

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 31/713 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
A61K 31/713, A61P 31/12, C12N 15/11, 15/113

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	RU 2418068 C2 (СИРНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.) 10.05.2011, формула, страницы 22-23, 26-27, 83-88, 91, 96-98, 130-131, 136-137, 150, 204-205, примеры 1-3, 13, фигура 22	1-23
Y	US 2003/0206887 A1 (MORRISSEY DAVID et al.) 06.11.2003, формула, параграфы [0008], [0011], [0204], [0205], [0240], [0291], [0326], таблицы 2-3, SEQ ID NO:32,34,678,680	1-23
Y	GenBank: V01460.1. Hepatitis B virus (strain ayw) genome, 28.01.2003, регионы 1592-1608 и 1591-1607	1-23
Y	СПРАВОЧНИК ПО ГЕПАТИТУ В ДЛЯ ЛЮДЕЙ, ЖИВУЩИХ С ВИЧ, редактор: БЕНЗАКАР Андреа, июнь 2009, страницы 29-30, 35-39, 53, 58-62	21-22

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

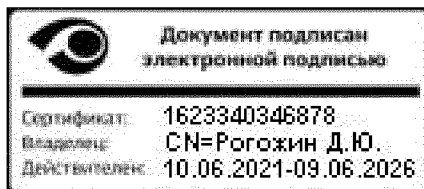
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **14/12/2021**

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



Д.Ю. Рогожин