

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042669**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

2023.03.09

(21) Номер заявки

201490993

(22) Дата подачи заявки

2012.11.16

(51) Int. Cl. **C12N 15/11** (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СРЕДСТВА РНКи(31) **61/561,710**(32) **2011.11.18**(33) **US**(43) **2014.09.30**(86) **PCT/US2012/065601**(87) **WO 2013/074974 2013.05.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Раджив Каллантхоттатхил Г.,
Циммерманн Трэйси, Манохаран
Мутхиах, Майер Мартин, Кучиманчи
Сатиянараяна, Хариссе Клаус (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A2-2010148013**
WO-A1-2009002944
WO-A2-2009134487
WO-A2-2009073809
WO-A2-2004015107
WO-A2-2005121370

G.F. DELEAVEY ET AL.: "Synergistic effects between analogs of DNA and RNA improve the potency of siRNA-mediated gene silencing", *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, vol. 38, № 13, 1 July 2010 (2010-07-01), p. 4547-4557, XP055057675, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkq181, fig. 1, 2
MICHAEL A. COLLINGWOOD ET AL.: "Chemical Modification Patterns Compatible with High Potency Dicer-Substrate Small Interfering RNAs", *OLIGONUCLEOTIDES*, **MARY ANN LIEBERT**, NEW YORK, NY, US, vol. 18, № 2, 1 June 2008 (2008-06-01), p. 187-200, XP002623649, ISSN: 1545-4576, DOI: 10.1089/OLI.2008.0123, table 1

PRAKASH T.P. ET AL.: "Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells", *JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY*, **AMERICAN CHEMICAL SOCIETY**, US, vol. 48, № 13, 27 May 2005 (2005-05-27), p. 4247-4253, XP002404764, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM0500440, fig. 3-9
J.B. BRAMSEN ET AL.: "A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity", *NUCLEIC ACIDS RESEARCH*, vol. 37, № 9, 1 May 2009 (2009-05-01), p. 2867-2881, XP055000747, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkp106, tables 1,3

EP-A1-2305805
WO-A1-2012037254

(57) Один аспект изобретения относится к дуплексному средству двухцепочечной РНКи (дцРНК), способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Дуплекс дцРНК содержит один или несколько мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в одной или обеих цепях, в частности, в сайте расщепления цепи или вблизи него. Другие аспекты изобретения относятся к фармацевтическим композициям, содержащим такие средства дцРНК, подходящие для терапевтического применения, и способам ингибирования экспрессии гена-мишени путем введения таких средств дцРНК, например, для лечения различных болезненных состояний.

B1**042669****042669 B1**

Родственная заявка

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., которая включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к дуплексным средствам РНКи, имеющим определенные мотивы, которые эффективны для ингибирования экспрессии гена-мишени, а также к композициям РНКи, подходящим для терапевтического использования. Кроме того, изобретение относится к способам ингибирования экспрессии гена-мишени путем введения таких дуплексных средств РНКи, например, для лечения различных заболеваний.

Уровень техники

РНК-интерференция или "РНКи" является термином, изначально введенным Fire и его сотрудниками для описания наблюдения, при котором двухцепочечная РНКи (дцРНК) может блокировать экспрессию гена (Fire et al. (1998), *Nature*, 391, 806-811; Elbashir et al. (2001), *Genes Dev.*, 15, 188-200). Короткая дцРНК направляет ген-специфический пост-транскрипционный сайленсинг у многих организмов, включая позвоночных, и является новым инструментом для исследования функции генов. РНКи опосредуется РНК-индуцированным сайленсинговым комплексом (RISC), специфической для последовательности многокомпонентной нуклеазой, которая разрушает матричные РНК, гомологичные последовательности, запускающей сайленсинг. Известно, что RISC содержит короткие РНК (приблизительно из 22 нуклеотидов), полученные из двухцепочечной РНК, запускающей сайленсинг, но белковые компоненты такой активности остаются неизвестными.

Молекулы двухцепочечных РНК (дцРНК) с эффективными ген-сайленсинговыми свойствами необходимы для разработки лекарственных средств на основе РНК-интерференции (РНКи). Начальной стадией РНКи является активация РНК-индуцированного сайленсингового комплекса (RISC), для которой требуется разрушение смысловой цепи дцРНК-дуплекса. Известно, что смысловая цепь действует как первый субстрат RISC, который расщепляется аргонаутом 2 в середине дуплексного участка. Сразу же после того, как расщепленные 5'-концевые и 3'-концевые фрагменты смысловой цепи удалятся из эндонуклеазы Ago2, RISC становится активированной антисмысловой цепью (Rand et al. (2005), *Cell*, 123, 621).

Полагают, что при ингибировании расщепления смысловой цепи эндонуклеотического расщепление мРНК-мишени ослабляется (Leuschner et al. (2006), *EMBO Rep.*, 7, 314; Rand et al. (2005), *Cell*, 123, 621; Schwarz et al. (2004), *Curr. Biol.*, 14, 787). Leuschner et al. показали, что введение 2'-O-Me-рибозы в сайт расщепления Ago2 в смысловой цепи ингибирует РНКи в клетках HeLa (Leuschner et al. (2006), *EMBO Rep.*, 7, 314). Подобный эффект наблюдают с фосфоротиоатными модификациями, что указывает на то, что для эффективной РНКи у млекопитающих также требуется расщепление смысловой цепи.

Morrissey et al. в сайте расщепления Ago2 среди других сайтов и модификаций также использовали миРНК-дуплекс, содержащий остатки, модифицированные 2'-F, и получили совместимый сайленсинг, сравнимый с немодифицированными миРНК (Morrissey et al. (2005), *Hepatology*, 41, 1349). Однако модификация по Morrissey не является мотив-специфической, например, одна модификация индуцирует модификации 2'-F на всех пиримидинах как на смысловой, так и на антисмысловой цепях до тех пор, пока пиримидиновый остаток присутствует, без какой-либо селективности; и следовательно, на основании таких указаний является неопределенным, может ли модификация специфического мотива в сайте расщепления смысловой цепи оказывать фактическое действие на активность сайленсинга генов. Muhonen et al. использовали миРНК-дуплекс, содержащий два модифицированных 2'-F остатка в сайте расщепления Ago2 на смысловой или антисмысловой цепи и нашли это допустимым (Muhonen et al. (2007), *Chemistry & Biodiversity*, 4, 858-873). Однако модификация по Muhonen также является специфической для последовательности, например, для каждой определенной цепи Muhonen модифицирует только или все пиримидины или все пурины без какой-либо селективности.

Choung et al. использовали миРНК-дуплекс, содержащий альтернативные модификации, за счет 2'-ОМе или различных комбинаций 2'-F, 2'-ОМе и фосфоротиоатных модификаций для стабилизации миРНК в сыворотке к Surl0058 (Choung et al. (2006), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 919-927). Choung предполагал, что остатки в сайте расщепления антисмысловой цепи не должны модифицироваться 2'-Оме, для того чтобы повысить устойчивость миРНК.

Таким образом, существует потребность в иРНК-дуплексных средствах для улучшения эффективности сайленсинга генов миРНК-средств генной терапии. Настоящее изобретение направлено на решение такой потребности.

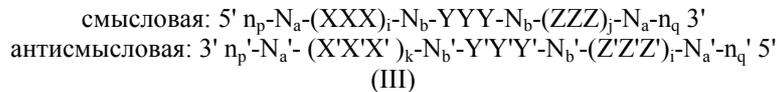
Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к эффективным нуклеотидам или химическим мотивам для средств дцРНК, необязательно конъюгированных по меньшей мере с одним лигандом, которые являются эффективными для ингибирования экспрессии гена-мишени, а также к композициям РНКи, подходящим для терапевтического применения.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что введение одного или нескольких мотивов из

трех идентичных модификаций в три последовательных нуклеотида в сайте расщепления средства дцРНК или возле него, где средство дцРНК состоит из модифицированных смысловой и антисмысловой цепей, усиливает активность генного сайленсинга дцРНК-средством.

В одном из аспектов изобретение относится к двухцепочечному средству РНКи (дцРНК), способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь имеет от 14 до 30 нуклеотидов. ДцРНК-дуплекс представлен формулой (III)



В формуле (III)

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

каждый p и q независимо равен 0-6;

n представляет собой нуклеотид;

каждый N_a и N'_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и N'_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации;

каждый p и q независимо представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность, содержащую 0-6 нуклеотидов; и

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

где модификации в N_b отличаются от модификаций в Y и модификации в N'_b отличаются от модификаций в Y' .

По меньшей мере один из нуклеотидов Y образует пару оснований со своими комплементарными нуклеотидами Y' , где модификация в нуклеотиде Y отличается от модификации в нуклеотиде Y' .

Каждый p и q независимо представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность, содержащую 0-6 нуклеотидов;

каждый n и n' представляет собой выступающий нуклеотид; и

каждый p и q независимо равен 0-6.

В другом аспекте изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере два мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления в цепи или вблизи него и по меньшей мере один из мотивов находится в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления по меньшей мере одним нуклеотидом. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления в цепи или вблизи него и по меньшей мере один из мотивов встречается в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления или вблизи него по меньшей мере одним нуклеотидом. Модификация в мотиве, находящемся в сайте расщепления или вблизи него в смысловой цепи, отличается от модификации в мотиве, находящемся в сайте расщепления или вблизи него в антисмысловой цепи.

В другом аспекте изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь имеет от 14 до 30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-F на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов встречается в сайте расщепления или вблизи него в цепи. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или вблизи него.

В другом аспекте изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет от 14 до 30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-F на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В другом аспекте изобретение относится к способу доставки дцРНК к специфической мишени у индивида путем подкожного или внутривенного введения.

Подробное описание

Благодаря введению одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех по-

следовательных нуклеотидах в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь средства дцРНК, в частности в сайт расщепления или вблизи него можно получить отличный результат. Смысловая цепь и антисмысловая цепь средства дцРНК по-другому может быть модифицирована полностью.

Введение таких мотивов прерывает набор модификаций, если он имеется, смысловой цепи и/или антисмысловой цепи. Средство дцРНК необязательно конъюгирует с лигандом производным GalNAc, например, на смысловой цепи. Полученные средства дцРНК проявляют превосходную активность в отношении генного сайленсинга.

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что присутствие одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или вблизи него по меньшей мере одной цепи средства дцРНК превосходно усиливает активность в отношении генного сайленсинга дцРНК-средства.

Соответственно изобретение относится к двухцепочечному средству РНКи (дцРНК), способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Длина каждой цепи средства дцРНК может изменяться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, длина каждой цепи может быть 14-30, 17-30, 25-30, 27-30, 17-23, 17-21, 17-19, 19-25, 19-23, 19-21, 21-25 или 21-23 нуклеотида.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь, как правило, образуют дцРНК-дуплекс. Длина дуплексного участка средства дцРНК может составлять 12-30 пар нуклеотидов. Например, длина дуплексного участка может составлять 14-30, 17-30, 25-30, 27-30, 17-23, 17-21, 17-19, 19-25, 19-23, 19-21, 21-25 или 21-23 пары нуклеотидов. В другом примере дуплексный участок выбран из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению может содержать один или несколько выступающих участков и/или кэппирующих групп средства дцРНК на 3'-конце или 5'-конце или на обоих концах цепи. Длина выступающего участка может быть 1-6 нуклеотидов, например 2-6, 1-5, 2-5, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3 или 1-2 нуклеотида. Выступы могут быть результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом того, что две цепи одинаковой длины располагаются неравномерно. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с мРНК-мишенью, или он может быть комплементарен последовательностям гена, являющихся мишенями, или может представлять собой другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут соединяться, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или другими не являющимися основаниями линкерами.

В одном из вариантов осуществления каждый нуклеотид в выступающем участке средства дцРНК по изобретению может независимо представлять собой модифицированные или немодифицированные нуклеотиды, включая, но ими не ограничиваясь, модифицированные до 2'-сахара, например, 2'-F-, 2'-O-метилтимидина (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуреида (Teo), 2'-O-метоксиэтиладенозина (Aeo), 2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидина (m5Ceo) и любую их комбинацию. Например, TT может представлять собой выступающую последовательность на любом конце любой цепи. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с мРНК-мишенью, или он может быть комплементарен последовательностям гена, являющихся мишенями, или может представлять собой другую последовательность.

Выступы 5' или 3' в смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях средства дцРНК по изобретению могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающий участок содержит два нуклеотида с фосфоротиоатом между двумя нуклеотидами, где два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. В одном из вариантов осуществления выступ присутствует на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. В одном из вариантов осуществления такой 3'-выступ присутствует в антисмысловой цепи. В одном из вариантов осуществления такой 3'-выступ присутствует в смысловой цепи.

Средство дцРНК по изобретению содержит только один выступ, который может усиливать интерферирующую активность дцРНК, не влияя на его общую стабильность. Например, однонитевой выступ располагается на 3'-конце смысловой цепи или, с другой стороны, на 3'-конце антисмысловой цепи. Также дцРНК может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (или на 3'-конце смысловой цепи) или наоборот. Как правило, антисмысловая цепь дцРНК имеет нуклеотидный выступ на 3'-конце и 5'-конец является тупым. Без связи с какой-либо теорией асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и 3'-концевой выступ антисмысловой цепи благоприятствуют загрузке рибонуклеопротеиновой цепи в процесс RISC.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению также может иметь два тупых конца по обоим концам дцРНК-дуплекса.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению представляет собой двухконцевой bluntmer длиной 19 нк (nt), где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном из вариантов осуществления средства дцРНК по изобретению представляет собой двухконцевой bluntmer длиной 20 нк, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F

модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-О-метил на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению представляет собой двух-концевой bluntmer длиной 21 нк, при этом смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-О-метил на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит смысловую цепь длиной 21 нуклеотид (нк) и антисмысловую длиной 23 нуклеотида (нк), при этом смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-О-метил на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, при этом один конец дцРНК затуплен, в то время как другой конец включает выступ в 2 нк. Предпочтительно выступ в 2 нк находится на 3'-конце антисмысловой цепи. Необязательно дцРНК также содержит лиганд (предпочтительно, GalNAc₃).

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, при этом длина смысловой цепи составляет 25-30 нуклеотидных остатков, при этом, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 указанной первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловой цепи составляет 36-66 нуклеотидных остатков, и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, парных положениям 1-23 смысловой цепи, с образованием дуплекса; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спаривается со смысловой цепью и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, посредством чего образуется 3'-однонитевой выступ из 1-6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, посредством чего образуется однонитевой 5'-выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи являются основаниями, спаренными с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выравнены для максимальной комплементарности, посредством чего образуется по существу дуплексный участок между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является достаточно комплементарной РНК-мишени вдоль по меньшей мере 19 рибонуклеотидов длины антисмысловой цепи для уменьшения экспрессии гена-мишени, когда указанную двухцепочечную нуклеиновую кислоту вводят в клетку млекопитающего; и при этом смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или вблизи него. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-О-метил на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или вблизи него.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, где указанное средство дцРНК содержит первую цепь длиной по меньшей мере 25 и максимально 29 нуклеотидов и вторую цепь длиной максимально 30 нуклеотидов по меньшей мере с одним мотивом из трех модификаций 2'-О-метил на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца; при этом указанный 3'-конец указанной первой цепи и указанный 5'-конец указанной второй цепи образуют тупой конец и указанная вторая цепь по своему 3'-концу на 1-4 нуклеотида длиннее, чем первая цепь, при этом дуплексный участок, который имеет по меньшей мере длину 25 нуклеотидов, и указанная вторая цепь достаточно комплементарна к мРНК-мишени вдоль по меньшей мере 19 нк длины указанной второй цепи для уменьшения экспрессии гена-мишени, когда указанное средство дцРНК вводят в клетку млекопитающего; и при этом дайсерное расщепление указанной дцРНК преимущественно приводит к миРНК, содержащей указанный 3'-конец указанной второй цепи, посредством чего уменьшается экспрессия гена-мишени у млекопитающего. Необязательно указанное средство дцРНК также содержит лиганд.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь средства дцРНК также может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления или вблизи него в смысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь средства дцРНК также может содержать по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления или вблизи него в антисмысловой цепи.

В случае средства дцРНК, имеющего дуплексный участок длиной 17-23 нк, сайт расщепления антисмысловой цепи, как правило, находится возле положений 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех идентичных модификаций могут находиться в положениях 9, 10, 11; положениях 10, 11, 12; положениях 11, 12, 13; положениях 12, 13, 14 или положениях 13, 14, 15 антисмысловой цепи, причем исчисление начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца антисмысловой цепи или исчисление начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления

в антисмысловой цепи также может изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка дцРНК от 5'-конца.

Смысловая цепь средства дцРНК содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи; и антисмысловая цепь может иметь по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи или вблизи него. Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дцРНК-дуплекс, смысловую цепь и антисмысловую цепь можно выровнять так, что один мотив из трех последовательных нуклеотидов в смысловой цепи и один мотив из трех последовательных нуклеотидов в антисмысловой цепи имеют по меньшей мере однонуклеотидное перекрытие, т.е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой цепи образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой цепи. С другой стороны, могут перекрываться по меньшей мере два нуклеотида из мотивов из обеих цепей или могут перекрываться все три нуклеотида.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь средства дцРНК содержит более одного мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив должен находиться в сайте расщепления цепи или вблизи него, и другие мотивы могут представлять собой "wing-фланговые" модификации. Термин "фланговая модификация" в описании относится к мотиву, находящемуся в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления или вблизи него той же цепи. Фланговая модификация расположена либо рядом с первым мотивом, либо отделена от него по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. Если мотивы расположены непосредственно рядом друг с другом, то химические группы мотивов являются различными для каждого, и если мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, то химические группы мотивов могут быть одинаковыми или различаться. Могут присутствовать две или больше фланговых модификаций. Например, если присутствуют две фланговые модификации, то обе фланговые модификации могут встречаться на одном конце дуплексного участка относительно первого мотива, который находится в сайте расщепления или вблизи него, или каждая из фланговых модификаций может встречаться с любой стороны первого мотива.

Аналогично смысловой цепи антисмысловая цепь средства дцРНК содержит по меньшей мере два мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов расположен в сайте расщепления цепи или вблизи него. Такая антисмысловая цепь также может содержать одну или несколько фланговых модификаций при выравнивании аналогично фланговым модификациям, которые присутствуют в смысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления фланговая модификация в смысловой цепи антисмысловой цепи или обеих цепях средства дцРНК, как правило, не содержит один первый или два концевых нуклеотида в 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

В другом варианте осуществления фланговая модификация в смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях, как правило, не содержит один первый или два спаренных нуклеотида в дуплексном участке в 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

Если смысловая цепь и антисмысловая цепь средства дцРНК содержат каждая по меньшей мере одну фланговую модификацию, фланговые модификации могут выпадать на один и тот же конец дуплексного участка и перекрывать один, два или три нуклеотида.

Если смысловая цепь и антисмысловая цепь средства дцРНК содержат каждая по меньшей мере две фланговые модификации, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, что две фланговые модификации, каждая с одной цепи, выпадают на один конец дуплексного участка, перекрываясь одним, двумя или тремя нуклеотидами; две модификации, каждая с одной цепи, выпадают на другой конец дуплексного участка, перекрываясь одним, двумя или тремя нуклеотидами.

В одном из вариантов осуществления может быть модифицирован каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи средства дцРНК, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одной и той же или разными модификациями, которые могут включать одно или несколько изменений одного или двух несвязывающих фосфатных атомов кислорода и/или одного или нескольких связывающих фосфатных атомов кислорода; изменение составной части сахара рибозы, например, 2'-гидроксила в сахаре рибозе; массовую замену фосфатной части "де-фосфо"-линкерами; модификацию или замену природного основания и замену или модификацию рибозофосфатной основной цепи.

Так как нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры, состоящие из звеньев, то большое число модификаций происходит в положении, которое в нуклеиновой кислоте повторяется, например модификация основания, или фосфатной части, или несвязывающего О фосфатной части. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех зависимых положениях нуклеиновой кислоты, но во многих случаях это происходить не будет. Как пример, модификация может иметь место только в 3'- или 5'-концевом положении, может происходить только в концевом участке, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи. Модификация может иметь место в двухнитевом участке, одноститевом участке или в обоих участках. Модификация может иметь место только в двухнитевом участке РНК или может иметь место только в одноститевом участке РНК. Напри-

мер, фосфоротиоатная модификация в положении несвязывающего О может иметь место только в одном или обоих концах, может иметь место только в концевом участке, например в положении в терминальном нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах цепи, или может иметь место в двухнитевом и одонитевом участках, в частности, на концах. 5'-Конец может быть фосфорилирован.

Возможно, например, для усиления устойчивости введение определенных оснований в выступы или включение модифицированных нуклеотидов или заменителей нуклеотидов в одонитевые выступы, например в 5'- или 3'-выступ или в оба выступа. Например, может быть желательным введение в выступы пуриновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступе могут быть модифицированы, например, модификацией, описанной в настоящем описании. Модификации могут включать, например, использование модификаций в положении 2' сахара рибозы, которые известны в данной области, например использование 2'-дезоксидеокси-2'-фтор(2'-F)- или 2'-О-метилмодифицированных дезоксирибонуклеотидов вместо рибозосахара нуклеотидного основания, и модификации в фосфатной группе, например фосфотиоатные модификации. Выступы могут быть гомологичны с последовательностью-мишенью.

В одном из вариантов осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксидеокси или 2'-фтором. Цепи могут содержать более одной модификации. В одном из вариантов осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.

Как правило, в смысловой цепи и антисмысловой цепи присутствуют по меньшей мере две различные модификации. Такие две модификации могут представлять собой 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации или другие модификации.

В одном из вариантов осуществления каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь содержит два различным образом модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-О-метил- или 2'-фтор-модифицированного.

В одном из вариантов осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилнуклеотидом, 2'-дезоксифторнуклеотидом, 2'-О-N-метилацетамидо(2'-О-NMA)нуклеотидом, 2'-О-диметиламиноэтоксидил(2'-О-DMAEOE)нуклеотидом, 2'-О-аминопропил(2'-О-AP)нуклеотидом или 2'-ага-Ф-нуклеотидом.

В одном из вариантов осуществления N_a и/или N_b содержит чередующиеся модификации. Термины "чередующийся мотив" или "чередующаяся структура", как используется в настоящем описании, относятся к мотиву, имеющему одну или больше модификаций, где каждая модификация находится в чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующимся нуклеотидом может называться каждый второй или один из каждых трех нуклеотидов или подобная структура. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации для нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой "АВАВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...", "АААВВААВААВВ...", "АААВВВВААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т.п.

В одном из вариантов осуществления N_a' и/или N_b' содержит чередующиеся модификации. Термины "чередующийся мотив" или "чередующаяся структура", как используется в настоящем описании, относятся к мотиву, имеющему одну или больше модификаций, где каждая модификация находится в чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующимся нуклеотидом может называться каждый второй или один из каждых трех нуклеотидов или подобная структура. Например, если каждый из А, В и С представляет собой один тип модификации для нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой "АВАВАВАВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...", "АААВВААВААВВ...", "АААВВВВААВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т.п.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одним и тем же или отличаться. Например, если А, В, С и D представляют собой каждый один тип модификации нуклеотида, чередующаяся структура, т.е. модификации в каждом другом нуклеотиде, могут быть одними и теми же, но каждая цепь из смысловой цепи или антисмысловой цепи может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в пределах чередующегося мотива, например "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т.п.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит структуру модификаций чередующегося мотива в смысловой цепи, которая смещена относительно структуры модификации чередующегося мотива в антисмысловой цепи. Смещение может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует иначе модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, если смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью в дцРНК-дуплексе, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с "АВАВАВ" от 5'-3' цепи и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с "ВАВАВА" от 3'-5' цепи в пределах дуплексного участка. Как другой пример чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'-3' цепи и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с "ВВААВВАА" от 3'-5' цепи в пределах дуплексного участка, так что существует полное или частичное смещение структур модификации между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит структуру чередующегося мотива 2'-О-метилмодификации и 2'-F-модификации в смысловой цепи, изначально имеющую смещение относительно структуры чередующегося мотива 2'-О-метилмодификации и 2'-F-модификации в антисмысловой цепи, т.е. 2'-О-метилмодифицированный нуклеотид в смысловой цепи образует пару оснований с 2'-F-модифицированным нуклеотидом антисмысловой цепи и наоборот. Положение 1 смысловой цепи может начинаться с 2'-F-модификации, и положение 1 антисмысловой цепи может начинаться с 2'-О-метилмодификации.

Введение одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь прерывает начальную структуру модификации, присутствующую в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи. Такое нарушение структуры модификации смысловой цепи и/или антисмысловой цепи путем введения одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь неожиданно усиливает активность сайленсинга гена в отношении гена-мишени.

В одном из вариантов осуществления, если мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах вводят в любую из цепей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, является иной модификацией, чем модификация мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N_aY₁Y₂N_b...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах и "N_a" и "N_b" представляют собой модификацию для нуклеотида, следующего за мотивом "Y₁Y₂", которая является иной, чем модификация Y и где N_a и N_b могут быть одинаковыми или различными модификациями. С другой стороны, N_a и/или N_b могут присутствовать или отсутствовать, когда присутствует фланговая модификация.

Средство дцРНК по изобретению может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может быть у любого нуклеотида смысловой цепи или антисмысловой цепи или обеих цепей в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может быть у любого нуклеотида смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в чередующейся структуре в смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержат обе модификации межнуклеотидной связи в чередующейся структуре. Чередующаяся структура модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может быть такая же, как в антисмысловой цепи, или отличаться от нее, и чередующаяся структура модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может иметь смещение относительно чередующейся структуры модификации межнуклеотидной связи в антисмысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления дцРНК содержит модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок содержит два нуклеотида, имеющих фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи могут быть получены для соединения нуклеотидов выступа с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексном участке. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все нуклеотиды выступа могут быть соединены через фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь и необязательно могут существовать дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие нуклеотид выступа со спаренным нуклеотидом, который следует за нуклеотидом выступа. Например, могут существовать по меньшей мере две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами, из которых два из трех нуклеотидов являются нуклеотидами выступа, и третий представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за нуклеотидом выступа. Предпочтительно такие концевые три нуклеотида могут находиться в 3'-конце антисмысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь дцРНК содержит 1-10 блоков из двух-десяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, при этом одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей располагается в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей любую фосфоротиоатную или метилфосфонатную или фосфатную связь.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь дцРНК содержит два блока из двух фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 фосфатными межнуклеотидными связями, при этом одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей располагается в любом положении в олигонуклеотидной последовательности и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей любую фосфоротиоатную или метилфосфонатную или фосфатную связь.

фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну в положении 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1, одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца), две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 20 и 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и 2, две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 смысловой цепи (считая от 5'-конца), одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1, одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца), две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и 2, две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 22 и 23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1, одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (считая от 5'-конца), две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 23 и 23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит ошибочное(ые) спаривание(я) с мишенью в пределах дуплекса или их комбинации. Ошибочное спаривание может иметь место в выступающем участке дуплексного участка. Пара оснований может быть классифицирована на основании их склонности промотировать диссоциацию или плавление (например, из-за свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, самым простым подходом является проверка пар на основании отдельной пары оснований, хотя также можно использовать анализ ближайшего соседа или подобный анализ). В смысле промотирования диссоциации A:U преобладает над G:C, G:U преобладает над G:C и I:C преобладает над G:C (I=инозин). Ошибочные спаривания, например неканонические или иные, чем канонические спаривания, предпочтительны перед каноническими (A:T, A:U, G:C) спариваниями; и спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительны перед каноническими спариваниями.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пару оснований в дуплексных участках от 5'-конца антисмысловой цепи, которые могут быть выбраны независимо из группы A:U, G:U, I:C, и ошибочные пары, например неканонические или иные, чем канонические, спаривания или спаривания, которые содержат универсальное основание, для промотирования диссоциации антисмысловой цепи в 5'-конце дуплекса.

В одном из вариантов осуществления нуклеотид в положении 1 в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи выбирают из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. С другой стороны, по меньшей мере одна из первых пар оснований 1, 2 или 3 в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первой парой оснований в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой цепи является пара оснований AU.

В одном из вариантов осуществления последовательность смысловой цепи может быть представлена формулой (I)



где i и j каждый независимо равен 0 или 1;

r и q каждый независимо равен 0-6;

каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два различным образом модифицированных нуклеотида;

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотид выступа;

при этом N_b и Y не имеют одну и ту же модификацию; и

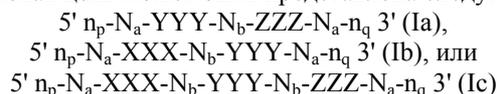
XXX, YYY и ZZZ каждый независимо представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

Предпочтительно YYY представляет собой все 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

В одном из вариантов осуществления N_a и/или N_b содержат модификации чередующейся структуры.

В одном из вариантов осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или вблизи него. Например, когда средство дцРНК имеет дуплексный участок длиной из 17-23 пар нуклеотидов, мотив YYY может встречаться в сайте расщепления или вблизи него (например, может встречаться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой цепи, причем исчисление начинают с 1-го нуклеотида от 5'-конца или необязательно исчисление начинают с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца.

В одном из вариантов осуществления i равен 1 и j равен 0; или i равен 0 и j равен 1; или оба i и j равны 1. Следовательно, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами



Когда смысловая цепь представлена формулой (Ia), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a может представлять собой независимо олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

Когда смысловая цепь представлена формулой (Ic), каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a может представлять собой независимо олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждый из X, Y и Z может быть одинаковым с другим или отличаться от него.

В одном из вариантов осуществления последовательность антисмысловой цепи дцРНК может быть представлена формулой (II)



при этом k и l каждый независимо равен 0 или 1;

r и q каждый независимо равен 0-6;

каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два различным образом модифицированных нуклеотида;

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

каждый n_p' и n_q' независимо представляет собой нуклеотидный выступ, содержащий 0-6 нуклеотидов;

где N_b' и Y' не имеют одну и ту же модификацию; и

каждый X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив их трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

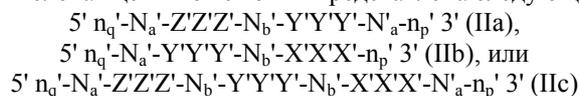
В одном из вариантов осуществления N_a' и/или N_b' содержит модификации чередующейся структуры.

Мотив Y'Y'Y' встречается в сайте расщепления антисмысловой цепи или вблизи него. Например, когда средство дцРНК имеет дуплексный участок длиной в 17-23 нк, мотив Y'Y'Y' может встречаться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, причем исчисление начинают с 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно исчисление начинают с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца. Предпочтительно мотив Y'Y'Y' встречается в положениях 11, 12, 13.

В одном из вариантов осуществления мотив Y'Y'Y' представляет собой все 2'-ОМемодифицированные нуклеотиды.

В одном из вариантов осуществления k равен 1 и l равен 0; или k равен 0 и l равен 1; или оба k и l равны 1.

Следовательно, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами



Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIa), N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержа-

щую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIc), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b' представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 модифицированных нуклеотидов.

Каждый из X' , Y' и Z' может быть одинаковым с другим или отличаться от него.

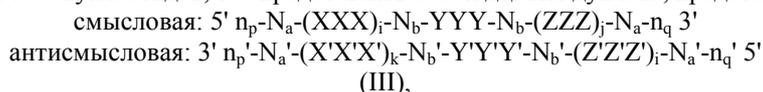
Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом или 2'-фтор. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.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

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь средства дцРНК содержит мотив $Y'Y'Y'$, встречающийся в положениях 9, 10 и 11 смысловой цепи, когда дуплексный участок состоит из 21 нк, причем исчисление начинают с 1-го нуклеотида от 5'-конца или необязательно исчисление начинают с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ как фланговые модификации в противоположном конце дуплексного участка; и каждый из XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив $Y'Y'Y'$, встречающийся в положениях 11, 12 и 13 цепи, причем исчисление начинают с 1-го нуклеотида от 5'-конца или необязательно исчисление начинают с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая цепь может дополнительно содержать мотив $X'X'X'$ или мотивы $Z'Z'Z'$ как фланговые модификации в противоположном конце дуплексного участка; и каждый из $X'X'X'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая цепь, представленная одной из приведенных выше формул (Ia), (Ib) и (Ic), образует дуплекс с антисмысловой цепью, представленной одной из приведенных выше формул (IIa), (IIb) и (IIc) соответственно.

Соответственно средство дцРНК может содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов, т.е. представлять собой дцРНК-дуплекс, представленный формулой



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

каждый p и q независимо равен 0-6;

каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность включает по меньшей мере два различных образом модифицированных нуклеотида;

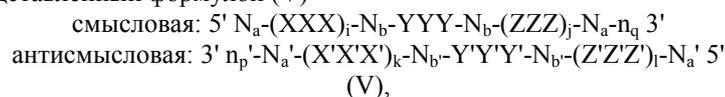
каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

где каждый n_p' , n_p , n_q' и n_q независимо представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность; и

каждый XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

В одном из вариантов осуществления i равен 1 и j равен 0; или i равен 0 и j равен 1; или оба i и j равны 1. В другом варианте осуществления k равен 1 и l равен 0; k равен 0 и l равен 1; или оба k и l равны 1.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов, т.е. представляет собой дцРНК-дуплекс, представленный формулой (V)



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

p и q равны каждый независимо 2;

каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей

мере два различным образом модифицированных нуклеотида;

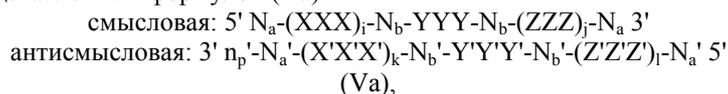
каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

где каждый n_p' и n_q независимо представляют собой выступающую нуклеотидную последовательность; и

XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ каждый независимо представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

В одном из вариантов осуществления i равен 1 и j равен 0; или i равен 0 и j равен 1; или оба i и j равны 1. В другом варианте осуществления k равен 1 и l равен 0; k равен 0 и l равен 1; или оба k и l равны 1.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов, т.е. представляет собой дцРНК-дуплекс, представленный формулой (Va)



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

каждый p и q независимо равен 2;

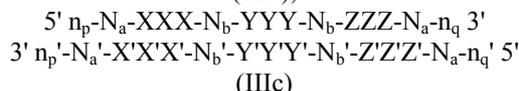
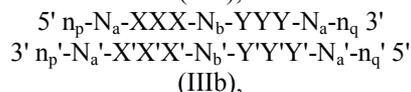
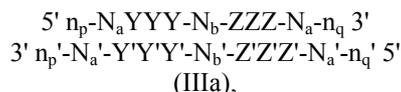
каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, причем каждая последовательность содержит по меньшей мере два различным образом модифицированных нуклеотида;

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

где n_p' представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность; и

каждый XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

Примеры комбинаций смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дцРНК-дуплекс, включают формулы, приведенные ниже.



Когда средство дцРНК представлено формулой (IIIa), каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда средство дцРНК представлено формулой (IIIb), каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда средство дцРНК представлено формулой (IIIc), каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации чередующейся структуры.

Каждый из X , Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb) и (IIIc) может быть одинаковым с другим или отличаться от него.

Когда средство дцРНК представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb) или (IIIc) по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним нуклеотидом Y' . С другой стороны по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y' или все три нуклеотида Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y' .

Понятно, что когда нуклеотиды N_a образуют пары оснований с N_a' , нуклеотиды N_b образуют пары оснований с N_b' , нуклеотиды X образуют пары оснований с X' , нуклеотиды Y образуют пары оснований с Y' и нуклеотиды Z образуют пары оснований с Z' .

Когда средство дцРНК представлено формулой (IIIa) или (IIIc) по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним нуклеотидом Z' . С другой стороны по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z' или все три нук-

леотида Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

Когда средство дцРНК представлено формулой (IIIb) или (IIIc) по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним нуклеотидом X'. С другой стороны, по меньшей мере, два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X', или все три нуклеотида X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

В одном из вариантов осуществления модификация в нуклеотиде Y иная, чем модификация в нуклеотиде Y', модификация в нуклеотиде Z иная, чем модификация в нуклеотиде Z', и/или модификация в нуклеотиде X иная, чем модификация в нуклеотиде X'.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК представляет собой полимер, содержащий по меньшей мере два дуплекса, представленных формулами (III), (IIIa), (IIIb) или (IIIc), при этом указанные дуплексы соединяются линкером. Линкер может поддаваться расщеплению или не поддаваться. Необязательно указанный полимер также содержит лиганд. Каждая из дцРНК может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена или каждая из дцРНК может нацеливаться на один и тот же ген на два различных сайта-мишени.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК представляет собой полимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или больше дуплексов, представленных формулами (III), (IIIa), (IIIb) или (IIIc), при этом указанные дуплексы соединяются линкером. Линкер может поддаваться расщеплению или не поддаваться. Необязательно указанный полимер также содержит лиганд. Каждая из дцРНК может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена или каждая из дцРНК может нацеливаться на один и тот же ген на два различных сайта-мишени.

В одном из вариантов осуществления два средства дцРНК, представленные формулами (III), (IIIa), (IIIb) или (IIIc), соединяются друг с другом по 5'-концу и один или оба 3'-конца необязательно конъюгируются с лигандом. Каждая из дцРНК может нацеливаться на один и тот же ген или на два различных гена; или каждая из дцРНК может нацеливаться на один и тот же ген на два различных сайта-мишени.

Во многих публикациях описывается полимерная миРНК, и все можно использовать в отношении дцРНК по изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, патент США № 7858769, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Средство дцРНК, которое содержит конъюгации одной или нескольких углеводных частей со средством дцРНК, может оптимизировать одно или больше свойств средства дцРНК. Во многих случаях углеводная часть будет присоединяться к модифицированному звену средства дцРНК. Например, сахар рибоза одного или нескольких рибонуклеотидных звеньев средства дцРНК может быть заменен на другую часть, например неуглеводный (предпочтительно, циклический) носитель, к которому присоединяется углеводный лиганд. Рибонуклеотидное звено, в котором сахар рибоза звена заменен таким образом, в настоящем описании называют звеном с модификацией заменой рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую систему, т.е. все атомы цикла являются атомами углерода, или гетероциклическую систему, т.е. один или больше атомов цикла могут представлять собой гетероатомы, например атомы азота, кислорода, серы. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую систему или может содержать два или больше циклов, например конденсированные циклы. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную циклическую систему или он может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду через носитель. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к главной цепи", предпочтительно две "точки присоединения к главной цепи", и (ii) по меньшей мере одну "точку промежуточного присоединения". Используемый в настоящем описании термин "точка присоединения к главной цепи" относится к функциональной группе, например гидроксильной группе, или вообще доступной для связи и которая подходит для введения носителя в главную цепь, например фосфатной группе или модифицированной фосфатной группе, например серосодержащей группе главной цепи рибонуклеиновой кислоты. Термин "точка промежуточного присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в цикл атому циклического носителя, например атому углерода или гетероатому (отличающемуся от атома, который обеспечивает точку присоединения главной цепи), который присоединяет выбранную часть. Часть может представлять собой, например, углевод, например моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранная часть соединяется с циклическим носителем посредством ковалентной связи. Таким образом, циклический носитель обычно будет включать функциональную группу, например аминогруппу, или, как правило, обеспечивающую связь, которая подходит для включения или для промежуточной связи для другой химической частицы, например лиганда, с составляющим циклом.

В варианте осуществления дцРНК по изобретению конъюгируют с лигандом через носитель, при этом носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно, циклическую группу выбирают из пирролидинила, пиразолинила, пирозолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидро-

фурила и декалина; предпочтительно ациклическую группу выбирают из главной цепи серинола или главной цепи диэтанолamina.

Двухцепочечное средство РНК (дцРНК) по изобретению необязательно может быть конъюгировано с одним или несколькими лигандами. Лиганд может присоединяться к смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеим цепям по 3'-концу, 5'-концу или обоим концам. Например, лиганд может быть конъюгирован со смысловой цепью, в частности с 3'-концом смысловой цепи.

Лиганды.

Широкий ряд частиц можно сочетать с олигонуклеотидами по настоящему изобретению. Предпочтительными частицами являются лиганды, которые присоединяются предпочтительно ковалентно или непосредственно или косвенно через промежуточную связь.

В предпочтительных вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни молекулы, в которую он включен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает усиленную аффинность в отношении выбранной мишени, например молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, рецептора, например клеточного компартмента или компартмента органа, ткани, органа или части тела, при сравнении, например, с аффинностью при отсутствии такого лиганда. Лиганды, обеспечивающие усиленную аффинность в отношении выбранной мишени, также называют нацеливающими лигандами.

Некоторые лиганды могут иметь эндосомолитические свойства. Эндосомолитические лиганды промотируют лизис эндосом и/или перенос композиции по изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой полианионный пептид или пептидомиметик, который показывает рН-зависимую мембранную активность и фузогенность. В одном из вариантов осуществления эндосомолитический лиганд проявляет свою активную конформацию при эндосомном рН. "Активной" конформацией является такая конформация, при которой эндосомолитический лиганд промотирует лизис эндосомы и/или перенос композиции по изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Примеры эндосомолитических лигандов включают пептид GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26:2964-2972), пептид EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118:1581-1586) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559:56-68). В одном из вариантов осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислотную), которая будет претерпевать изменение заряда или протонирования в ответ на изменение рН. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

Лиганды могут улучшать перенос, гибридизацию и свойства специфичности и также могут улучшать нуклеазоустойчивость полученного природного или модифицированного олигонуклеотида или полимерной молекулы, содержащей любую комбинацию мономеров, описанную в настоящем описании, и/или природных или модифицированных рибонуклеотидов.

Обычно лиганды могут содержать терапевтические модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или репортерные группы, например, для контроля за распределением; сшивающие средства и части, придающие нуклеазоустойчивость. Обычные примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и пептидомиметики.

Лиганды могут включать природное вещество, такое как белок (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин); углевод (например, декстрин, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту) или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например синтетическая полиаминокислота, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот включают полилизин (PLL), поли-L-аспартамовую кислоту, поли-L-глутамовую кислоту, сополимер стирола и малеинового ангидрида, сополимер поли(L-лактид, гликолиед), сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламида (НМРА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают полиэтиленмин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, пептидомиметический поламин, дендритный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или альфа-спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например средство, нацеливающее на клетку или ткань, например лектин, гликопротеин, липид или белок, например антитело, которое связывается со специфическим типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный активный белок А, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бифосфонат, полиглутамат, полиаспарат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин, пептид RGD, миметик пептида RGD или аптамер. Табл. 1 показывает некоторые примеры нацеливающих лигандов и их ассоциированные рецепторы.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие вещества (например, акридины),

сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (ТРРС4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелаторы (например, ЭДТК), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, антеннапептид, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминокислоты, меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), MPEG, [MPEG]₂, полиамины, алкилы, замещенные алкилы, меченные изотопами маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, облегчающие перенос/поглощение (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы Eu³⁺ тетраазамакроциклов), динитрофенил, HPR или AP.

Лигандами могут быть белки, например гликопротеины, или пептиды, например молекулы со специфической аффинностью к солиганду, или антигена, например антигено, которое связывается с клеткой определенного типа, такой как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные вещества, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза или аптамеры. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор р38 MAP-киназы или активатор NF-κB.

Лиганд может представлять собой вещество, например лекарственное средство, которое может усилить поглощение средства иРНК в клетке, например, путем разрыва цитоскелета клетки, например, путем разрыва микротрубочек клетки, микронитей и/или промежуточных нитей. Лекарственное средство может представлять собой, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, яплакинолид, ларункулин А, фаллодин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

Лиганд может усиливать поглощение олигонуклеотида в клетке путем активации воспалительной реакции, например. Примеры лигандов, которые могут иметь такое действие, включают фактор некроза опухоли альфа (TNF-альфа), интерлейкин-1-бета или гамма-интерферон.

В одном из аспектов лиганд представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такие липид или молекула на основе липида предпочтительно связывают сывороточный белок, например человеческий сывороточный альбумин (HSA). Связывающий HSA лиганд позволяет донести конъюгат до ткани-мишени, например непечечной ткани-мишени организма. Например, ткань-мишень может представлять собой ткань печени, включая паренхимные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связывать HSA, также можно использовать в качестве лигандов. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может

- (a) повышать устойчивость к разрушению конъюгатов;
- (b) повышать нацеливание или перенос в клетку-мишень или клеточную мембрану; и/или
- (c) использоваться для регулирования связывания с сывороточным белком, например HSA.

Лиганд на основе липида можно использовать для модуляции, например, регулирования, связывания конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или лиганд на основе липида, который связывается с HSA сильнее, с меньшей вероятностью будет нацеливаться на почки и поэтому менее вероятно выводиться из организма. Липид или лиганд на основе липида, который связывается с HSA с меньшей силой, может использоваться для нацеливания конъюгата на почки.

В предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывает HSA. Предпочтительно он связывает HSA с достаточной аффинностью, так что конъюгат будет предпочтительно доставляться в непечечную ткань. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание лигандом HSA не могло быть обратимым.

В другом предпочтительном варианте осуществления лиганд на основе липида связывает HSA слабо или вовсе не связывает, так что конъюгат предпочтительно будет доставляться в почки. Другие вещества, которые нацеливают на клетки почек, также могут использоваться вместо или в дополнение к лиганду на основе липида.

В другом аспекте лиганд представляет собой частицу, например витамин, которая поглощается клеткой-мишенью, например пролиферирующей клеткой. Это особенно применимо для лечения расстройств, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например, злокачественного или незлокачественного типа, например раковых клеток. Примеры витаминов включают витамин А, Е и К. Другие примеры витаминов включают витамины группы В, например фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включаются HAS, липопротеин низкой плотности (LDL) и липопротеин высокой плотности (HDL).

В другом аспекте лиганд представляет собой средство, проникающее в клетку предпочтительно спиральное проникающее в клетку средство. Предпочтительно средство является амфипатическим. При-

мером средства является пептид tat или антеннопедия. Если средство представляет собой пептид, он может быть модифицированным, включая пептидомиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое предпочтительно имеет липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем описании олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную складываться в определенную трехмерную структуру, схожую с природным пептидом. Часть пептида или пептидомиметика может иметь длину примерно в 5-50 аминокислот, например длину примерно в 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот. Пептид или пептидомиметик может представлять собой, например, пептид, проникающий в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Trp, Trp или Phe). Пептидная часть может представлять собой дендритный пептид, свернутый пептид или сшитый пептид. В другом случае пептидная часть может включать гидрофобную последовательность мембранной транслокации (MTS). Примером гидрофобного MTS-содержащего пептида является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP. Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP), содержащий гидрофобную MTS, также может являться нацеливающей частью. Пептид может являться "доставочным" пептидом, который может проносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олионуклеотиды, и белок, сквозь клеточные мембраны. Например, обнаружено, что последовательности из белка ВИЧ-Tat (GRKKRRQRRRPPQ) и белка дрозофилы антеннапедии (RQIKIWFQNRRMKWKK) способны функционировать как доставочные пептиды. Пептид или пептидомиметик может быть кодирован случайной последовательностью ДНК, так что пептид идентифицируется из библиотеки фагового дисплея, или комбинаторной библиотеки one-bead-one-compound (OBOC) (Lam et al., *Nature*, 354:82-84, 1991). Предпочтительно пептид или пептидомиметик, привязанный к средству иРНК через внедренное мономерное звено, представляет собой пептид, нацеливающий на клетку, такой как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Длина пептидной части может изменяться от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Пептидная часть может иметь структурную модификацию с тем, чтобы повысить устойчивость или усилить непосредственные конформационные свойства. Можно использовать любые структурные модификации, описанные ниже.

Пептидную RGD часть можно использовать для нацеливания на опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или клетка рака молочной железы (Zizmann et al., *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Пептид RGD может облегчить нацеливание средств иРНК на опухоли различных других тканей, включая легкие, почки, селезенку или печень (Aoki et al., *Cancer Gene Therapy*, 8:783-787, 2001). Предпочтительно пептид RGD будет облегчать нацеливание средств иРНК на почки. Пептид RGD может быть линейным или циклическим и может быть модифицирован, например гликозилирован или метилирован, для облегчения нацеливания на конкретные ткани. Например, гликозилированный пептид RGD может доставлять средство иРНК в опухолевую клетку, экспрессирующую $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001). Можно использовать пептиды, которые нацеливают маркеры, обогащенные в пролиферирующих клетках. Например, RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут нацеливаться на раковые клетки, в частности клетки, которые выставляют интегрин. Таким образом, можно использовать пептиды RGD, циклические пептиды, содержащие RGD, пептиды RGD, которые включают D-аминокислоты, а также синтетические миметики RGD. Кроме RGD можно использовать другие части, которые нацеливаются на лиганд интегрин. Как правило, такие лиганды можно использовать для регулирования пролиферации клеток и ангиогенеза. Предпочтительны конъюгаты лигандов такого типа, которые нацеливаются на PECAM-1, VEGF или другой раковый ген, например раковый ген, описанный в настоящем описании.

"Пептид, проникающий в клетку" способен проникать в клетку, например микробную клетку, такую как бактериальная клетка или клетка гриба, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептид, проникающий в микробную клетку, может представлять собой, например, α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или церопин P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефенсин, β -дефенсин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две доминирующие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин).

Пептид, проникающий в клетку, также может включать сигнал ядрышковой локализации (NLS). Например, пептид, проникающий в клетку, может представлять собой состоящий из двух частей амфипатический пептид, такой как MPG, который образован из домена слитого пептида ВИЧ-1 gp41 и NLS большого T-антигена SV40 (Simeoni et al., *Nucl. Acids Res.*, 31:2717-2724, 2003).

В одном из вариантов осуществления нацеливающий пептид может представлять собой амфипатический α -спиральный пептид. Примеры амфипатических α -спиральных пептидов включают, но ими не ограничиваются, цекропины, ликотоксины, парадаксины, буфорин, CPF, бомбининоподобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S. clava*, интестинальные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаинины, бревининс-2, дермасептины, мелиттины, плевроцидин, пептиды H₂A, пептиды Хепорус, эскулентин-1 и саегинс. Предпочтительно будет рассматриваться ряд факторов для поддер-

жания целостности и устойчивости спирали. Например, будет использоваться максимальное число стабилизирующих спираль остатков (например, leu, ala или lys) и минимальное число остатков, дестабилизирующих спираль (например, пролина или звеньев циклических мономеров). Будет рассматриваться копирующий остаток (например, Gly является примером N-кэпирующего остатка), и/или можно использовать C-концевое амидирование для обеспечения добавочной N-связи для стабилизации спирали. Образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенных $i\pm 3$ или $i\pm 4$ положениями, может обеспечить устойчивость. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомоаргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками глутамата или аспартата.

Лиганды пептиды и пептидомиметики включают вещества, имеющие природное происхождение, или модифицированные пептиды, например, D- или L-пептиды; α , β или γ -пептиды; N-метилпептиды; азапептиды; пептиды с одной или несколькими амидными, т.е. пептидными, связями, замененными одной или несколькими мочевиными, тиомочевинными, карбаматными или сульфонилмочевинными связями; или циклические пептиды.

Нацеливающий лиганд может представлять собой любой лиганд, способный нацеливаться на специфический рецептор. Примерами являются фолат, GalNAc, галактоза, манноза, манноза-6P, кластеры Сахаров, такие как кластер GalNAc, кластер маннозы, кластер галактозы, или аптамер. Кластер представляет собой комбинацию двух или больше звеньев сахаров. Нацеливающие лиганды также включают лиганды интегриновых рецепторов, лиганды хемокиновых рецепторов, трансферрин, биотин, лиганды серотонинных рецепторов, PSMA, эндотелии, GCP II, соматостатин, лиганды LDL и HDL. Лиганды также могут быть на основе нуклеиновой кислоты, например, аптамер. Аптамер может быть немодифицированным или иметь любую комбинацию модификаций, раскрытых в настоящем описании.

Средства высвобождения из эндосом включают имидазолы, поли- или олигоимидазолы, PEI, пептиды, фузогенные пептиды, поликарбоксилаты, polyacations, маскированные олиго- или поликатионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэферы, полимеры с маскированными или немаскированными катионными или анионными зарядами, дендриты с маскированными или немаскированными катионными или анионными зарядами.

PK модулятор обозначает фармакокинетический модулятор. PK модулятор включает липофильные соединения, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, средства, связывающие белки, ПЭГ, витамины и т.п. Примеры PK модуляторов включают, но ими не ограничиваются, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицериды, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин E, биотин и т.п. Также известно, что олигонуклеотиды, которые включают несколько фосфоротиоатных связей, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды в примерно 5, 10, 15 или 20 оснований, содержащие несколько фосфоротиоатных связей в главной цепи, также соответствуют настоящему изобретению в качестве лигандов (например, в качестве PK модулирующих лигандов).

Кроме того, в качестве PK модулирующих лигандов по настоящему изобретению также соответствуют аптамеры, которые связывают сывороточные компоненты (например, сывороточные белки).

Другие конъюгаты лигандов, соответствующие изобретению, описаны в заявках на патент США USSN: 10/916185, зарегистрированной 10 августа 2004 г.; USSN: 10/946873, зарегистрированной 21 сентября 2004 г.; USSN: 10/833934, зарегистрированной 3 августа 2007 г.; USSN: 11/115989, зарегистрированной 27 апреля 2005 г.; и USSN: 11/944227, зарегистрированной 21 ноября 2007 г., которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Когда присутствуют два или больше лигандов, они могут иметь одинаковые свойства, все могут иметь различные свойства или некоторые лиганды имеют одинаковые свойства, в то время как другие имеют различные свойства. Например, лиганд может иметь свойства нацеливания, иметь эндосомолитическую активность или иметь PK модулирующие свойства. В предпочтительном варианте осуществления все лиганды имеют различные свойства.

Лиганды могут соединяться с олигонуклеотидами в различных точках, например в 3'-конце, 5'-конце и/или в промежуточном положении. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд присоединяется к олигонуклеотидам через промежуточную связку, например носитель, описанный в настоящем описании. Лиганд или привязанный лиганд может присутствовать в мономере, когда указанный мономер включают в растущую цепь. В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть включен через сочетание с мономером "предшественником", после того как указанный мономер "предшественник" включен в растущую цепь. Например, мономер, имеющий, например, аминоконцевую группу (т.е. без ассоциированного лиганда), например $\text{TAP}-(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, может быть включен в растущую олигонуклеотидную цепь. Затем при последующей операции, т.е. после включения мономера предшественника в цепь, лиганд, имеющий электрофильную группу, например пентафторфенилэфирную или альдегидную группу, может быть присоединен к мономеру предшественнику путем сочетания электрофильной группы лиганда с концевой нуклеофильной группой связки мономера предшественника.

В другом примере мономер, имеющий подходящую группу для участия в реакции химии кликов,

может быть включен, например, азид- или алкинконцевой связкой/линкером. При последующей операции, т.е. после включения мономера предшественника в цепь, лиганд, имеющий комплементарную химическую группу, например алкиновую или азидную, может быть присоединен к мономеру предшественнику путем сочетания алкина и азиды.

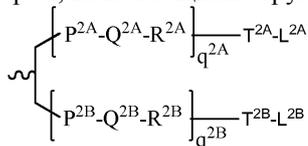
В случае двухцепочечных олигонуклеотидов лиганды могут быть присоединены к одной или обоим цепям. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечное средство иРНК содержит лиганд, конъюгированный со смысловой цепью. В других вариантах осуществления двухцепочечное средство иРНК содержит лиганд, конъюгированный с антисмысловой цепью.

В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеотидными основаниями, частями сахаров или межнуклеозидными связями молекул нуклеиновой кислоты. Конъюгация с пуриновыми нуклеотидными основаниями или их производными может иметь место в любом положении, включая эндоциклические и экзоциклические атомы. В некоторых вариантах осуществления положения 2, 6, 7 или 8 пуринового нуклеотидного основания присоединяются к части конъюгата. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеотидными основаниями или их производными также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления положения 2, 5 и 6 пиримидинового нуклеотидного основания могут быть замещены частью конъюгата. Конъюгация с частями сахаров нуклеозидов может происходить по любому атому углерода. Примеры атомов углерода части сахаров, которые могут быть присоединены к части конъюгата, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. Положение 1' также может соединяться с частью конъюгата, такой как неосновной остаток. Межнуклеозидные связи также могут нести части конъюгата. В случае фосфоросодержащих связей (например, фосфодиэфира, фосфоротиоата, фосфородитиоата, фосфоамидата и т.п.) часть конъюгата может присоединяться непосредственно в атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. В случае амин- или амидсодержащих межнуклеозидных связей (например, PNA) часть конъюгата может присоединяться к атому азота амина или амида или к соседнему атому углерода.

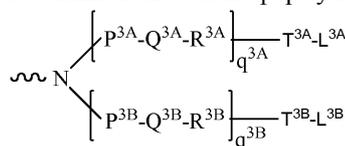
Любой подходящий в области РНК-интерференции лиганд может быть использован, хотя лиганд обычно представляет собой углевод, например моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, полисахарид.

Линкеры, которые конъюгируют лиганд с нуклеиновой кислотой, включают линкеры, обсужденные выше. Например, лиганд может представлять собой одно или несколько производных GalNAc (N-ацетилглюкозамин), присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

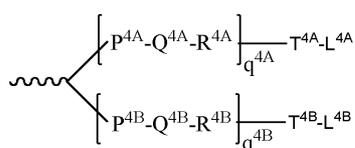
В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению конъюгирована с двухвалентным и трехвалентным линкером, включающими структуры, показанные в любой из формул (IV)-(VII)



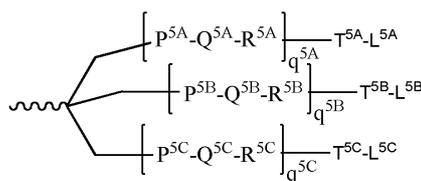
Формула (IV)



Формула (V)



Формула (VI)



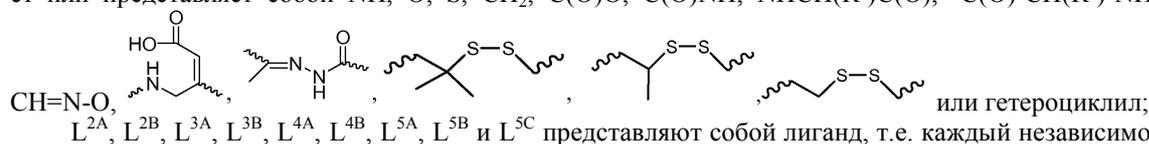
Формула (VII)

при этом q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} независимо равны в случае каждого появления 0-20, при этом повторяющееся звено может быть одним и тем же или другим;

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

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} независимо в случае каждого появления отсутствуют или представляют собой алкилен, замещенный алкилен, при этом один или несколько метиленов могут прерываться или обрываться одним или несколькими O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C=C или C(O);

Каждый R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} независимо в случае каждого появления отсутствует или представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO,

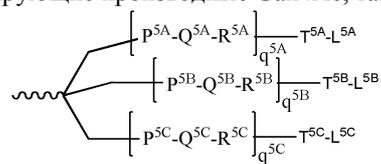


L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд, т.е. каждый независимо в случае каждого появления представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид,

тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и

R^a представляет собой H или аминокислотную боковую цепь.

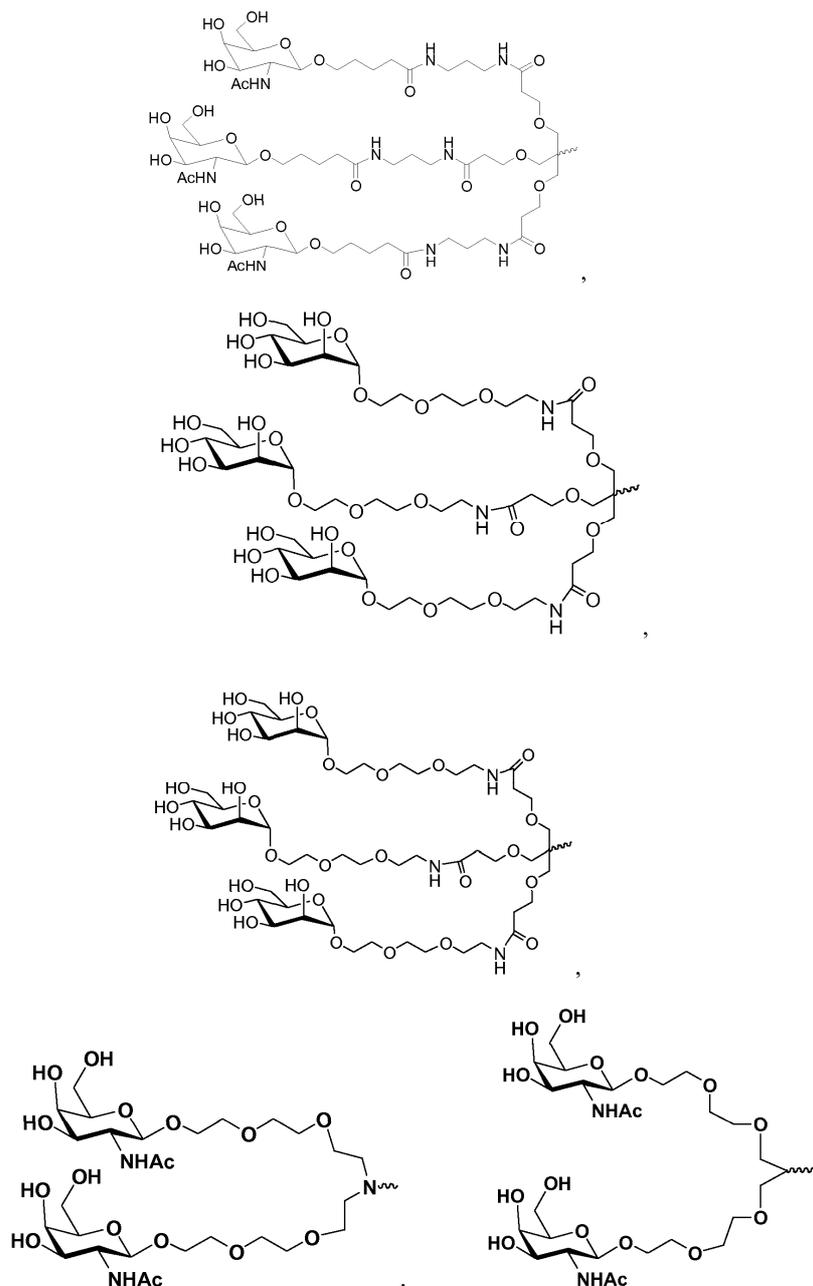
В частности, для использования со средствами РНКи для ингибирования экспрессии гена-мишени применимы трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc, такие как производные формулы (VII)

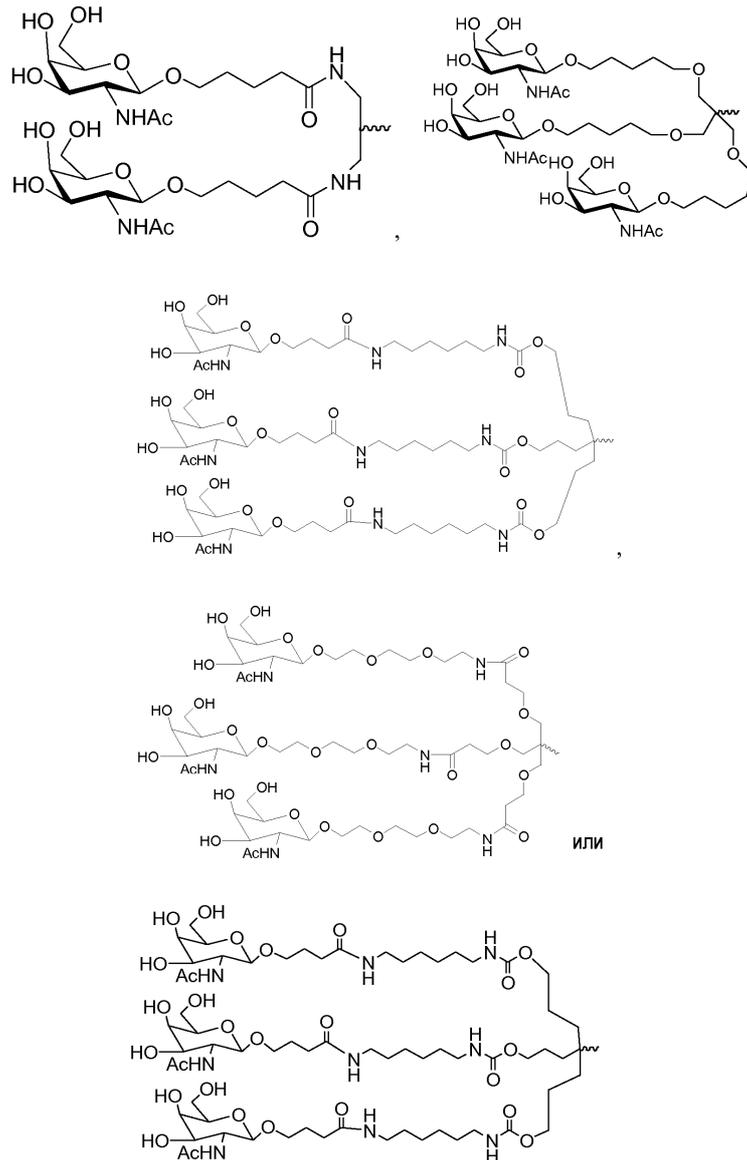


Формула (VII)

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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих производные GalNAc, включают, но ими не ограничиваются, следующие соединения:





Определения.

Используемые в настоящем описании термины "дцРНК", "миРНК" и "средство иРНК" используются как взаимозаменяемые для средств, которые могут опосредовать сайленсинг РНК-мишени, например мРНК, например транскрипт гена, который кодирует белок. Для удобства такую мРНК в настоящем описании также относят к мРНК, которую глушат. Такой ген в настоящем описании также относят к гену-мишени. Как правило, РНК, которую глушат, представляет собой эндогенный ген или патогенный ген. Кроме того, РНК, иные чем мРНК, например тРНК, и вирусные РНК также могут являться мишенями.

Используемое в настоящем описании выражение "опосредует РНКи" относится к способности заглушать РНК-мишень специфически для последовательности. Без связи с какой-либо теорией, полагают, что сайленсинг использует механизм или процесс РНКи и "руководящую" РНК, например средства миРНК из 21-23 нуклеотидов.

Как используется в настоящем описании, "специфически гибридизируемый" и "комплементарный" являются терминами, которые используют для того, чтобы показать достаточную степень комплементарности, так что имеет место устойчивое и специфическое связывание между соединением по изобретению и мишенью молекулой РНК. Специфическое связывание требует достаточной степени комплементарности для того, чтобы избежать неспецифического связывания олигомерного соединения с последовательностями не-мишени в условиях, в которых желательно специфическое связывание, т.е. в физиологических условиях в случае анализов или терапевтического лечения или в случае анализов *in vitro* в условиях, в которых анализы выполняют. Последовательности не-мишени, как правило, отличаются по меньшей мере 5 нуклеотидами.

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению является "достаточно комплементарным" к РНК-мишени, например мРНК-мишени, так что средство дцРНК глушит продуцирование белка, кодированного мРНК-мишенью. В другом варианте осуществления средство дцРНК по изобретению

является "точно комплементарным" к РНК-мишени, например РНК-мишень и средство дцРНК-дуплекс отжигаются, например, с образованием в участке точной комплементарности гибрида, состоящего исключительно из пар оснований по Уотсону-Крику. "Достаточно комплементарная" РНК-мишень может включать промежуточный участок (например, по меньшей мере из 10 нуклеотидов), который точно комплементарен РНК-мишени. Более того, в некоторых вариантах осуществления средство дцРНК по избранию специфически различает различие в один нуклеотид. В таком случае средство дцРНК опосредует РНКи только если в участке (например, в пределах 7 нуклеотидов) с различием в один нуклеотид обнаруживается точная комплементарность.

Используемый в настоящем описании термин "олигонуклеотид" относится к молекуле нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), например, длиной в менее 100, 200, 300 или 400 нуклеотидов.

Термин "гало" относится к любому радикалу фтора, хлора, брома или иода. Термин "алкил" относится к насыщенным и ненасыщенным неароматическим углеводородным цепям, которые могут представлять собой линейные цепи или разветвленные цепи, содержащим указанное число атомов углерода (которые включают без ограничения пропил, аллил или пропаргил), в которые могут необязательно встраиваться N, O или S. Например, C₁-C₁₀ показывает, что группа может иметь от 1 до 10 (включительно) атомов углерода. Термин "алкокси" относится к радикалу -O-алкил. Термин "алкилен" относится к двухвалентному алкилу (т.е. -R-). Термин "алкилендиоксо" относится к двухвалентным группам структуры -O-R-O-, в которых R представляет собой алкилен. Термин "аминоалкил" относится к алкилу, замещенному амино. Термин "меркапто" относятся к радикалу -SH. Термин "тиоалкокси" относится к радикалу -S-алкил.

Термин "арил" относится к моноциклической 6-углеродной или бициклической 10-углеродной ароматической системе, при этом 0, 1, 2, 3 или 4 атома каждого цикла могут быть замещены заместителем. Примеры арильных групп включают фенил, нафтил и т.п. Термин "арилалкил" или термин "аралкил" относится к алкилу, замещенному арилом. Термин "арилалкокси" относится к алкокси, замещенному арилом.

Термин "циклоалкил", используемый в настоящем описании, включает насыщенные и частично ненасыщенные циклические углеводородные группы с 3-12 атомами углерода, например, 3-8 атомами углерода, и, например, 3-6 атомами углерода, при этом циклоалкильная группа может быть, необязательно, дополнительно замещена. Циклоалкильные группы включают без ограничения циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил и циклооктил.

Термин "гетероарил" относится к ароматической 5-8-членной моноциклической, 8-12-членной бициклической или 11-14-членной трициклической системе с 1-3 гетероатомами, если система моноциклическая, 1-6 гетероатомами, если система бициклическая, или 1-9 гетероатомами, если система трициклическая, указанные гетероатомы выбирают из O, N или S (например, атомы углерода и 1-3, 1-6 или 1-9 гетероатомов O, N или S, если система моноциклическая, бициклическая или трициклическая соответственно), при этом 0, 1, 2, 3 или 4 атома каждого цикла могут быть замещены заместителем. Примеры гетероарильных групп включают пиридил, фурил или фуранил, имидазолил, бензимидазолил, пиримидинил, тиофенил или тиенил, хинолинил, индолил, тиазолил и т.п. Термин "гетероарилалкил" или термин "гетероаралкил" относится к алкилу, замещенному гетероарилом. Термин "гетероарилалкокси" относится к алкокси, замещенному гетероарилом.

Термин "гетероцикл" относится к неароматической 5-8-членной моноциклической, 8-12-членной бициклической или 11-14-членной трициклической системе с 1-3 гетероатомами, если система моноциклическая, 1-6 гетероатомами, если система бициклическая, или 1-9 гетероатомами, если система трициклическая, указанные гетероатомы выбирают из O, N или S (например, атомы углерода и 1-3, 1-6 или 1-9 гетероатомов O, N или S, если система моноциклическая, бициклическая или трициклическая соответственно), при этом 0, 1, 2 или 3 атома каждого цикла могут быть замещены заместителем. Примеры гетероциклических групп включают тризолил, тетразолил, пиперазинил, пирролидинил, диоксанил, морфолинил, тетрагидрофуранил и т.п.

Термин "оксо" относится к атому кислорода, который образует карбонил, когда присоединен к углероду, N-оксид, когда присоединен к азоту, и сульфоксид или сульфон, когда присоединен к сере.

Термин "ацил" относится к алкилкарбонильному, циклоалкилкарбонильному, арилкарбонильному, гетероциклкарбонильному или гетероарилкарбонильному заместителю, из которых любой может быть дополнительно замещен заместителем.

Термин "замещенный" относится к замене одного или нескольких водородных радикалов в данной структуре радикалом определенного заместителя, включая, но ими не ограничиваясь, галоген, алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероцикл, тиол, алкилтио, арилтио, алкилтиоалкил, арилтиоалкил, алкилсульфонил, алкилсульфонилалкил, арилсульфонилалкил, алкокси, арилокси, аралкокси, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, ариламинокарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, галогеналкил, амино, трифторметил, циано, нитро, алкиламино, ариламино, алкиламиноалкил, ариламиноалкил, аминоалкиламино, гидроксил, алкоксиалкил, карбоксиалкил, алкоксикарбонилалкил, аминикарбонилалкил, ацил, аралкоксикарбонил, карбоксильную группу, остаток сульфоновой кислоты, сульфонил, остаток фосфоновой кислоты, арил, гетероарил, гетероцикл или алифатическую группу. Следует иметь в виду, что замести-

тель также может быть замещенным.

Расщепляемые связывающие группы.

Расщепляемая связывающая группа представляет собой группу, которая достаточно устойчива вне клетки, но которая после внедрения в клетку-мишень расщепляется с высвобождением двух частей, удерживаемых вместе линкером. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая связывающая группа расщепляется по меньшей мере в 10 раз или больше, предпочтительно по меньшей мере в 100 раз быстрее в клетке-мишени или в первом стандартном условии (которое можно выбрать, например, как имитирующее или представляющее внутриклеточные условия), чем в крови индивида или во втором стандартном условии (которое можно выбрать, например, как имитирующее или представляющее условия в крови или сыворотке).

Расщепляемые связывающие группы чувствительны к средствам расщепления, например, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или наличию разрушающих молекул. Как правило, средства расщепления внутри клеток преобладают или обнаруживаются на более высоких уровнях или активностях, чем в сыворотке или крови. Примеры таких разрушающих средств включают окислительно-восстановительные средства, которые выбирают для определенных субстратов или которые не имеют специфичности к субстрату, включая, например, окисляющие или восстанавливающие ферменты или восстановители, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушить поддающуюся окислительно-восстановительному расщеплению связывающую группу путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например средства, которые дают рН пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушать расщепляемую кислотой связывающую группу путем действия как обычная кислота, пептидазы (которые могут являться субстратспецифическими) и фосфатазы.

Расщепляемая связывающая группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчива к рН. Величина рН сыворотки человека 7,4, в то время как средний внутриклеточный рН несколько ниже, колеблясь в интервале примерно 7,1-7,3. Эндосомы имеют более кислый рН в интервале 5,5-6,0, и лизосомы имеют даже более кислый рН примерно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется при предпочтительном рН, причем посредством этого из лиганда высвобождается катионный липид внутри клетки или в нужный компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется определенным ферментом. Тип расщепляемой связывающей группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, которая является мишенью. Например, лиганды, нацеленные на печень, могут быть соединены с катионными липидами через линкер, который включает сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет расщепляться эффективнее в клетках печени, чем в клетках типов, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатых эстеразами, включают клетки легкого, корковое вещество почек и яичко.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно использовать, когда типы клеток-мишеней богаты пептидазами, например клетки печени и синовиоциты.

Вообще пригодность кандидата в расщепляемую связывающую группу можно оценить путем проверки возможности разрушающего средства (или условия) расщеплять кандидата в связывающую группу. Также будет желательна проверка кандидата в расщепляемую связывающую группу также на способность сопротивляться расщеплению в крови или при контакте с другой тканью, не являющейся мишенью. Таким образом можно определить относительную чувствительность к расщеплению при первом и втором условии, где первое выбирают как показывающее расщепление в клетке-мишени, и второе выбирают как показывающее расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например крови или сыворотке. Оценки можно осуществить в бесклеточных системах, в клетках, в клеточной культуре, в культуре органа или ткани или на интактных животных. Может быть полезно провести начальную оценку в бесклеточной среде или в условиях культивирования и подтвердить дополнительными оценками на интактных животных. В предпочтительных вариантах осуществления применимые соединения-кандидаты расщепляются по меньшей мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации условий в клетке) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации условий вне клетки).

Связывающие группы, расщепляемые в условиях окисления-восстановления.

Одним из классов расщепляемых связывающих групп являются связывающие группы, расщепляемые в условиях окисления-восстановления. Примером связывающей группы, расщепляемой при восстановлении, является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Для того чтобы определить, является ли кандидат в расщепляемую связывающую группу подходящим для "связывающей группы, расщепляемой при восстановлении" или, например, подходящим для использования с определенной частью иРНК и определенным нацеливающим средством, можно рассмотреть способы, описанные в настоящем описании. Например, кандидата можно оценить путем инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстановителем с использованием реагентов, известных в данной области, которые имитируют скорость расщепления, которую можно было бы наблюдать в клетке, например клетке-мишени. Кандидатов также можно оценить в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке. В предпоч-

тительном варианте осуществления соединения-кандидаты расщепляются в крови самое большее на 10%. В предпочтительных вариантах осуществления применимые соединения-кандидаты разрушаются по меньшей мере в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации условий в клетке) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации условий вне клетки). Скорость расщепления соединений-кандидатов можно определить с использованием стандартных ферментных кинетических анализов в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнения с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

Расщепляемые связывающие группы на основе фосфатов.

Расщепляемые связывающие группы на основе фосфатов расщепляются средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примерами средств, которые расщепляют фосфатную группу в клетках, являются ферменты в клетках, такие как фосфатазы. Примерами связывающих групп на основе фосфатов являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительными являются -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительным является -O-P(O)(OH)-O-. Таких кандидатов можно оценивать с использованием методов, аналогичных методам, описанным выше.

Связывающие группы, расщепляемые кислотой.

Связывающие группы, расщепляемые кислотой, представляют собой группы, которые расщепляются в кислой среде. В предпочтительных вариантах осуществления связывающие группы, расщепляемые кислотой, расщепляются в кислой среде с pH примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,5, 5,0 или ниже), или средствами, такими как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить условия расщепления для связывающих групп, расщепляемых кислотой. Примеры связывающих групп, расщепляемых кислотой, включают, но не ограничиваются указанным, гидразоны, сложные эфиры и эфиры аминокислот. Группы, расщепляемые кислотой, могут иметь общую формулу -C=NN-, C(O)O или -OC(O). Предпочтительным является воплощение, когда углерод, присоединенный к кислороду сложноэфирной (или алкокси) группы, представляет собой углерод арильной группы, замещенной алкильной группы или третичной алкильной группы, такой как диметилпентил или трет-бутил. Таких кандидатов можно оценивать с использованием методов, аналогичных методам, описанным выше.

Связывающие группы на основе сложных эфиров.

Расщепляемые связывающие группы на основе сложных эфиров расщепляются в клетках ферментами, такими как эстеразы и амидазы. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложных эфиров включают, но не ограничиваются указанным, эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Эфирные расщепляемые связывающие группы имеют общую формулу -C(O)O- или -OC(O)-. Таких кандидатов можно оценить с использованием методов, аналогичных методам, описанным выше.

Расщепляющиеся группы на основе пептидов

Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов расщепляются в клетках ферментами, такими как пептидазы и протеазы. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами, с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.п.) и полипептидов.

Расщепляемые группы на основе пептидов не включают аминогруппу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь является особым типом амидной связи, образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничивается пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов имеют общую формулу -NHCHR^AC(O)NHCR^BC(O)-, где R^A и R^B представляют собой группы R двух соседних аминокислот. Таких кандидатов можно оценить с использованием методов, аналогичных методам, описанным выше. Используемый в настоящем описании термин "углевод" относится к соединению, которое или само по себе является углеводом, состоящим из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или соединение, имеющее в качестве своей части углеводную часть, состоящую из одного или нескольких моносахаридных звеньев, причем каждое имеет по меньшей мере 6 атомов углерода (которое может быть линейным, разветвленным или циклическим), с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Характерные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4-9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Конкретные сахара включают C₅ и высшие (предпочтительно, C₅-C₈) сахара; ди- и трисахариды включают сахара, имеющие два или три моносахаридных звена (предпочтительно, C₅-C₈).

Альтернативные варианты осуществления.

В другом варианте осуществления изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций в три последовательных нуклеотида, где по меньшей мере один из мотивов встречается в сайте расщепления в антисмысловой цепи или возле нее. Каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи модифицирован. Модификации в смысловой цепи и антисмысловой цепи, в каждой независимо, включают по меньшей мере две различные модификации.

В другом варианте осуществления изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов встречается в сайте расщепления в антисмысловой цепи или вблизи него. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Структура модификации антисмысловой цепи смещена на один или больше нуклеотидов относительно структуры модификации смысловой цепи.

В другом варианте осуществления изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере два мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, когда по меньшей мере один из мотивов встречается в сайте расщепления или вблизи него в цепи и по меньшей мере один из мотивов встречается в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления по меньшей мере одним нуклеотидом. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов расположен в сайте расщепления или вблизи него в цепи и по меньшей мере один из мотивов расположен в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления или вблизи него по меньшей мере одним нуклеотидом.

В другом варианте осуществления изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере два мотива из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов расположен в сайте расщепления в цепи или вблизи него и по меньшей мере один из мотивов расположен в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления по меньшей мере одним нуклеотидом. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов расположен в сайте расщепления в цепи или вблизи него и по меньшей мере один из мотивов расположен в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления или вблизи него по меньшей мере одним нуклеотидом. Модификация в мотиве, расположенном в сайте расщепления в смысловой цепи, отличается от модификации в мотиве, расположенном в сайте расщепления или вблизи него в антисмысловой цепи. В другом варианте осуществления изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 12-30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов расположен в сайте расщепления в цепи. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метильных модификаций на трех последовательных нуклеотидах.

Смысловая цепь также может содержать один или больше мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где один или больше дополнительных мотивов встречаются в другой части цепи, которая отделена от трех 2'-F модификаций в сайте расщепления по меньшей мере одним нуклеотидом. Антисмысловая цепь также может содержать один или больше мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где один или больше дополнительных мотивов расположены в другой части цепи, которая отделена от трех 2'-O-метильных модификаций в сайте расщепления по меньшей мере одним нуклеотидом. По меньшей мере один из нуклеотидов, имеющих модификацию 2'-F, может образовывать пару оснований с одним нуклеотидом, имеющим 2'-O-метильную модификацию.

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению вводят в буфере.

В одном из вариантов осуществления соединения миРНК, описанные в настоящем описании, могут быть включены в препарат для введения индивиду. Композиция миРНК может находиться в различных состояниях. В некоторых примерах композиция по меньшей мере частично является кристаллической, однородно кристаллической и/или безводной (например, воды меньше 80, 50, 30, 20 или 10%). В другом примере миРНК находится в водной фазе, например в растворе, который включает воду.

Водные или кристаллические композиции можно, например, включить в среду для доставки, например, в липосому (особенно в случае водной фазы) или частицу (например, микрочастицу, что может

быть подходящим для кристаллической композиции). Как правило, композицию миРНК получают способом, который совместим с предполагаемым способом введения, описанным в настоящем описании. Например, в отдельных вариантах осуществления композицию получают по меньшей мере одним из следующих способов: сушка распылением, лиофилизация, вакуумная сушка, выпаривание, сушка в псевдооживленном слое или комбинация таких методов; или обработкой ультразвуком с липидом, сушкой вымораживанием, кондансацией и другой самосборкой.

Препарат миРНК можно получить в комбинации с другим средством, например другим терапевтическим средством или средством, которое стабилизирует миРНК, например белком, который образует комплекс с миРНК с образованием иРНК. Другие средства также включают хелаторы, например ЭДТК (например, для удаления двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+}), соли, ингибиторы РНКаз (например, ингибитор РНКазы широкой специфичности, такой как RNAsin) и т.п.

В одном из вариантов осуществления препарат миРНК содержит другое соединение миРНК, например вторую миРНК, которая опосредует РНКи в отношении второго гена и в отношении того же гена. Другой препарат может содержать по меньшей мере три, пять, десять, двадцать, пятьдесят, сто или больше различных видов миРНК. Такие миРНК могут опосредовать РНКи в отношении подобного числа различных генов.

В одном из вариантов осуществления препарат миРНК содержит по меньшей мере второе терапевтическое средство (например, средство иное, чем РНК или ДНК). Например, композиция миРНК для лечения вирусного заболевания, например ВИЧ, может содержать известное противовирусное средство (например, ингибитор протеаз или ингибитор обратной транскриптазы). В другом примере композиция миРНК для лечения рака может дополнительно содержать химиотерапевтическое средство.

Примеры препаратов обсуждаются ниже.

Липосомы.

Для простоты описания препараты, композиции и способы в данном разделе большей частью обсуждаются в отношении немодифицированных соединений миРНК. Однако следует иметь в виду, что такие препараты, композиции и способы могут быть осуществлены с другими соединениями миРНК, например модифицированными миРНК, и такая практика входит в изобретение. Соединение миРНК, например соединение двухцепочечная миРНК, или соединение кмиРНК (ssiRNA) (например, предшественник, например более крупное соединение миРНК, которое может быть процессировано до соединения кмиРНК, или ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например двухцепочечной миРНК, или соединения кмиРНК, или его предшественника) можно ввести в препарат для доставки в совокупности мембранных молекул, например липосоме или мицелле. Используемый в настоящем описании термин "липосома" относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных по меньшей мере в одном бислое, например одном бислое или нескольких бислоях. Липосомы включают униламеллярные и полиламеллярные везикулы, которые имеют оболочку, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию миРНК. Липофильный материал изолирует водную внутреннюю часть от водного наружного окружения, которое, как правило, не включает композицию миРНК, хотя в некоторых примерах это может иметь место. Липосомы применимы для переноса и доставки активных ингредиентов в место действия. Поскольку липосомная оболочка структурно схожа с биологическими мембранами, то когда липосомы применяют к ткани, липосомный бислой сливается с клеточными мембранами. Так как слияние липосомы и клетки продолжается, внутреннее водное содержимое, которое включает миРНК, доставляется в клетку, где миРНК может специфически связываться с РНК-мишенью и может опосредовать РНКи. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления миРНК в определенные типы клеток.

Липосому, содержащую миРНК, можно получить различными способами. В одном из примеров липидный компонент липосомы растворяют в детергенте, так что образуются мицеллы с липидным компонентом. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или конъюгат липида. Детергент может иметь высокую критическую концентрацию мицелл и может быть неионогенным. Примеры детергентов включают холаты, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Затем препарат миРНК добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют с миРНК и конденсируются вокруг миРНК с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, диализом и получают липосомный препарат миРНК.

При необходимости во время реакции конденсации можно добавить соединение-носитель, которое способствует конденсации, например, путем регулируемого добавления. Например, носитель может представлять собой полимер иной, чем нуклеиновая кислота (например, спермин или спермидин). Также можно регулировать pH для благоприятной конденсации.

Дополнительное описание способов получения устойчивых везикул для доставки полинуклеотидов, которые содержат комплекс полинуклеотид/катионный липид как структурный компонент доставочной везикулы, приводится, например, в WO 96/37194. Образование липосом также может включать один или несколько аспектов описанных примеров методов из Feigner P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 8:7413-7417, 1987; патент США № 4897355; патент США № 5171678; Bangham et al., M. Mol. Biol., 23:238, 1965;

Olson et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 557:9, 1979; Szoka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75:4194, 1978; Mayhew et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 775:169, 1984; Kim et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 728:339, 1983; и Fukunaga et al., *Endocrinol.*, 115:757, 1984. Обычно используемые методы получения липидных агрегатов соответствующего размера для использования в доставочных везикулах включают ультразвуковую обработку и замораживание-оттаивание плюс экструзия (см., например, Mayer et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 858:161, 1986). Когда требуются сообразно небольшие (50-200 нм) и относительно однородные агрегаты, можно использовать микрофлюидизацию (Mayhew et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 775:169, 1984). Такие способы легко адаптируются для упаковки препаратов мРНК в липосомы.

Липосомы, которые являются рН-чувствительными или отрицательно заряженными, захватывают молекулы нуклеиновой кислоты, а не комплекс с ними. Так как молекулы нуклеиновой кислоты, так и липид заряжены подобным образом, происходит отталкивание, а не образование комплекса. Тем не менее некоторые молекулы нуклеиновой кислоты захватываются водной внутренней частью таких липосом. Липосомы, которые являются рН-чувствительными, используют для доставки кодирующей ген тимидинкиназы ДНК в клеточные слои в монокультуре. В клетках-мишенях обнаружена экспрессия экзогенного гена (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 19 (1992), 269-274).

Один основной тип липосомной композиции включает иные фосфолипиды, чем фосфатидилхолин природного происхождения. Нейтральные липосомные композиции можно получить, например, из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомные композиции, как правило, получают из димиристоилфосфатидилглицерина, в то время как анионные фузогенные липосомы получают преимущественно из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомной композиции получают из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, соевый PC и яичный PC. Еще один тип получают из смесей фосфолипида и/или фосфатидилхолина и/или холестерина.

Примеры других способов введения липосом в клетки *in vitro* приводятся в патенте США № 5283185, патенте США № 5171678, WO 94/00569, WO 93/24640, WO 91/16024, Feigner, *J. Biol. Chem.*, 169:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.*, 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.*, 32:7143, 1993; и Strauss, *EMBO J.*, 11:417, 1992.

В одном из вариантов осуществления используют катионные липосомы. Катионные липосомы обладают преимуществом способности сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы хотя не способны сливаться так эффективно с плазматической мембраной, *in vivo* захватываются макрофагами и могут использоваться для доставки мРНК макрофагам.

Другие преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биоразлагаемыми; липосомы могут включать широкий ряд водо- и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные в их внутренних компартментах мРНК от метаболизма и деградации (Rosoff, в "*Pharmaceutical Dosage Forms*", Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, vol. 1, p. 245). Важными соображениями при получении липосомных композиций являются поверхностный заряд липида, размер везикул и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA) можно использовать для получения небольших липосом, которые взаимодействуют спонтанно с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры ткани, что приводит к доставке мРНК (см., например, Feigner P.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 8:7413-7417, 1987; и патент США № 4897355 с описанием DOTMA и его использования с ДНК).

Аналог DOTMA 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмиак)пропан (DOTAP) можно использовать в комбинации с фосфолипидом с образованием содержащих комплекс ДНК везикул. Липофектин™ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) является эффективным средством для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в клетки живой культуры ткани, которые включают положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые взаимодействуют спонтанно с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Когда используют достаточно положительно заряженные липосомы, суммарный заряд на полученных комплексах также является положительным. Положительно заряженные комплексы, полученные таким путем, спонтанно присоединяются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты в, например, клетки культуры ткани. Другой коммерчески доступный катионный липид 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмиак)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) отличается от DOTMA в том, что олеоильные части соединены сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие описанные катионные липиды включают соединения, которые конъюгированы с различными частями, включая, например, карбоксиспермин, который конъюгируют с одним из двух типов липидов, и включает соединения, такие как диоктаолеоиламид 5-карбоксиспермилламина ("DOGS") (трансфектам™, Promega, Madison, Wisconsin) и 5-карбоксиспермилламид дипальмитоилфосфатидилэтанолами-

на ("DPPEs") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат катионного липида включает продукт дериватизации липида холестеринном ("DC-Choi"), который вводят в липосомы в комбинации с DOPE (см. Gao X. and Huang L., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179:280, 1991). Сообщается, что липополизин, полученный конъюгацией полилизина с DOPE, является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou X. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1065:8, 1991). Иными словами, для некоторых клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, показывают меньшую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA-содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты катионные липиды включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные препараты особенно подходят для местного введения, и липосомы имеют некоторые преимущества перед другими препаратами. Такие преимущества включают накопление введенного лекарственного средства в нужной мишени и возможность вводить миРНК в кожу. При некоторых осуществлениях липосомы используют для доставки миРНК в эпидермальные клетки и также для усиления пенетрации миРНК в кожные ткани, например, в кожу. Например, липосомы можно применять местно. Местная доставка в кожу лекарственных средств, полученных в виде липосом, описана в документах (см., например, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410; и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino R.J. and Fould-Fogerite S., *Biotechniques*, 6:682-690, 1988; Itani T. et al., *Gene*, 56:267-276, 1987; Nicolau C. et al., *Meth. Enz.*, 149:157-176, 1987; Straubinger R.M. and Papahadjopoulos D., *Meth. Enz.*, 101:512-527, 1983; Wang C.Y. and Huang L., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 84:7851-7855, 1987).

Неионные липосомные системы также проверяли для определения их полезности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности системы, включающие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные препараты, содержащие новасом I (простой 10-стеариловый эфир глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилена) и новасом II (простой 10-стеариловый эфир глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилена) использовали для доставки лекарственного средства в дерму кожи мыши. Такие препараты с миРНК применимы для лечения дерматологического расстройства.

Липосомы, которые включают миРНК, могут быть получены как поддающиеся высокой деформации. Такая способность к деформации может позволить липосомам проникать сквозь пору, которая меньше, чем средний радиус липосомы. Например, трансферсомы представляют собой тип липосом, поддающихся деформации. Трансферсомы можно получить, добавляя активаторы поля поверхности, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы, которые включают миРНК, могут быть доставлены, например, подкожно, путем инъекции, для того, чтобы доставить миРНК в кератиноциты в коже. Для того чтобы пройти интактную кожу млекопитающего, липидные везикулы должны пройти через ряд тонких пор, каждая диаметром менее 50 нм, под влиянием подходящего трансдермального градиента. Кроме того, из-за свойств липидов такие трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (адаптивными к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися и обычно могут достигать своих мишеней без фрагментации, а также часто самозаряжающимися.

Другие препараты, подходящие для настоящего изобретения, описаны в предварительных заявках на патент США, регистрационные № 61/018616, зарегистрирована 2 января 2008 г., 61/018611, зарегистрирована 2 января 2008 г., 61/039748, зарегистрирована 26 марта 2008 г., 61/047087, зарегистрирована 22 апреля 2008 г., и 61/051528, зарегистрирована 8 мая 2008 г. В заявке РСТ № РСТ/US2007/080331, зарегистрированной 3 октября 2007 г., также описываются препараты, подходящие для настоящего изобретения.

Поверхностно-активные вещества.

Для простоты описания препараты, композиции и способы в данном разделе большей частью обсуждаются в отношении немодифицированных соединений миРНК. Однако следует иметь в виду, что такие препараты, композиции и способы могут быть осуществлены с другими соединениями миРНК, например модифицированными миРНК, и такая практика входит в изобретение. Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в композициях, таких как эмульсии (включая микроэмульсии) и липосомы (см. выше). Композиции миРНК (или предшественника, например более крупной дцРНК, которая может быть процессирована до миРНК, или ДНК, которая кодирует миРНК или предшественника) могут включать поверхностно-активное вещество. В одном из вариантов осуществления миРНК находится в препарате в виде эмульсии, которая включает поверхностно-активное вещество. Самым общим способом классификации и оценки свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ как природных, так и синтетических является использование гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ). Характер гидрофильной группы дает наиболее применимое средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, используемых в препаратах (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не является ионизированной, оно классифициру-

ется как неионогенное поверхностно-активное вещество. Неионогенные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических продуктах и применимы в широком интервале значений рН. Обычно значения их ГЛБ колеблются от 2 до примерно 18 в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, глицерилловые сложные эфиры, полиглицерилловые сложные эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионогенные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирных спиртов, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блок-сополимеры также включены в такой класс. Полиоксиэтилированные поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными членами класса неионогенных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд, когда она растворена или диспергирована в воде, поверхностно-активное вещество классифицируется как анионогенное. Анионогенные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламиды аминокислот, эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты и фосфаты. Наиболее значительными членами класса анионогенных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и мыла.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд, когда она растворена или диспергирована в воде, поверхностно-активное вещество классифицируется как катионогенное. Катионогенные поверхностно-активные вещества включают четвертичные аммониевые соли и этоксилированные амины. Четвертичные аммониевые соли являются наиболее применимыми членами этого класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества имеет способность нести положительный или отрицательный заряд, поверхностно-активное вещество классифицируется как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламидами, N-алкилбетаины и фосфатиды.

Использование поверхностно-активных веществ в лекарственных продуктах, препаратах и эмульсиях рассматривается Rieger в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285.

Мицеллы и другие мембранные препараты.

Для простоты описания мицеллярные и другие препараты, композиции и способы в данном разделе большей частью обсуждаются в отношении немодифицированных соединений миРНК. Однако понятно, что такие мицеллярные и другие препараты, композиции и способы могут быть осуществлены с другими соединениями миРНК, например модифицированными миРНК, и такая практика входит в изобретение. Композиция соединения миРНК, например соединения двухцепочечной миРНК, или соединения кмиРНК (ssiRNA) (например, предшественника, например, более крупного соединения миРНК, которое может быть процессировано до соединения кмиРНК, или ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например двухцепочечную миРНК, или соединения кмиРНК, или его предшественника) может быть предоставлена в мицеллярном препарате. В настоящем описании "мицеллы" определяются как определенный тип скопления молекул, в котором амфипатические молекулы располагаются в сферической структуре, так что все гидрофобные части молекул направлены внутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Существует обратное расположение, если окружающая среда является гидрофобной.

Смешанный мицеллярный препарат, подходящий для доставки через кожные мембраны, можно получить путем смешивания водного раствора композиции миРНК, (C₈-C₁₀)алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующего соединения. Примеры мицеллообразующих соединений включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, огуречный экстракт, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло энотеры, ментол, тригидроксиоксохолонилглицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые полиоксиэтиленэфиры и их аналоги, простые полидоканолалкилэфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения могут быть добавлены одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться по существу при любом виде смешивания ингредиентов, но при энергичном перемешивании обеспечиваются мицеллы меньшего размера.

В одном из способов получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию миРНК и, по меньшей мере, алкилсульфат щелочного металла. Затем первую мицеллярную композицию смешивают по меньшей мере с тремя мицеллообразующими соединениями для образования смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают, смешивая при энергичном перемешивании композицию миРНК, алкилсульфат щелочного металла и по меньшей мере одно из мицеллообразующих соединений и затем добавляя остальные мицеллообразующие соединения.

В смешанную мицеллярную композицию можно добавлять фенол и/или м-крезол для стабилизации препарата и защиты от роста бактерий. С другой стороны, фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами. Изотоническое средство, такое как глицерин, можно добавлять по-

сле образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярной композиции в виде спрея препарат может быть помещен в аэрозольный дозатор, и в дозатор загружают пропеллент. Пропеллент, который находится под давлением, в дозаторе находится в жидкой форме. Соотношения ингредиентов регулируют таким образом, чтобы водная и пропеллентная фазы становились одной фазой, т.е. чтобы была одна фаза. Если существуют две фазы, необходимо встряхивать дозатор перед распылением порции содержимого, например, через мерный клапан. Распыляемая доза фармацевтического средства выталкивается из мерного клапана мелкими брызгами.

Пропелленты могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, диметиловый эфир и диэтиловый эфир. В некоторых вариантах осуществления может быть использован HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации необходимых ингредиентов могут быть определены относительно простым опытным путем. Для всасывания в полости рта дозировку обычно желательнее повысить, например, по меньшей мере в два или три раза по сравнению с дозировкой для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

Частицы.

Для простоты описания частицы, препараты, композиции и способы в данном разделе большей частью обсуждаются в отношении немодифицированных соединений миРНК. Однако можно понять, что такие частицы, препараты, композиции и способы могут быть осуществлены с другими соединениями миРНК, например модифицированными миРНК, и такая практика входит в изобретение. В другом варианте осуществления препараты соединения миРНК, например соединения двухцепочечной миРНК или соединения кмиРНК (например, предшественника, например более крупного соединения миРНК, которое может быть процессировано до соединения кмиРНК, или ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например двухцепочечную миРНК, или соединение кмиРНК, или его предшественника) могут быть включены в частицу, например микрочастицу. Микрочастицы можно получить распылительной сушкой, но также можно получить другими способами, включая лиофилизацию, выпаривание, сушку в псевдоожиженном слое, вакуумную сушку, или комбинацией таких методов.

Фармацевтические композиции.

Средства миРНК по изобретению могут быть введены в композиции для фармацевтического применения. Фармацевтически приемлемые композиции содержат терапевтически эффективное количество одного или нескольких средств дцРНК по любому из предшествующих вариантов осуществления, взятые одни или в композиции с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (добавками), эксципиентами и/или разбавителями.

Фармацевтические композиции могут быть составлены специально для введения в твердой или жидкой форме, включая формы, адаптированные для следующего:

(1) перорального введения, например формы для вливания (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например, имеющие целью трансбуккальное, сублингвальное и системное всасывание, болусы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык;

(2) парентерального введения, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидермальной инъекции, например, в виде стерильного раствора, или суспензии, или препарата с отсроченным высвобождением;

(3) местного введения, например, в виде крема, мази, или пэчча с регулируемым высвобождением, или спрея, наносимого на кожу;

(4) интравагинального или интаректального введения, например, в виде пессария, крема или пенки;

(5) сублингвального введения;

(6) внутриглазного введения;

(7) трансдермального введения; или

(8) назального введения.

Доставка с использованием подкожного или внутривенного способа может быть особенно предпочтительной.

Выражение "терапевтически эффективное количество", используемое в настоящем описании, обозначает количество соединения, материала или композиции, включающих соединение по изобретению, которое является эффективным, для того чтобы вызывать некоторый желательный терапевтический эффект в, по меньшей мере, субпопуляции клеток у животного при разумном соотношении польза/опасность, приемлемом для любого лечения лекарственными препаратами.

Выражение "фармацевтически приемлемый" используется в настоящем описании как относящееся к таким соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые в пределах разумной медицинской оценки подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без избыточной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, при разумном соотношении польза/опасность.

Выражение "фармацевтически приемлемый носитель", используемое в настоящем описании, обозначает фармацевтически приемлемый материал, композицию или среду, такую как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, вспомогательное вещество при получении (например, смазываю-

щее вещество, тальк, стеараты магния, кальция или цинка или стеариновая кислота) или инкапсулирующий растворитель материал, вовлеченные в перемещение или перенос соединения в организме индивида из одного органа или части организма в другой орган или часть организма. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и не наносить вред пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают

- (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза;
- (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал;
- (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы;
- (4) измельченный трагакант;
- (5) солод;
- (6) желатин;
- (7) смазывающие вещества, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк;
- (8) эксципиенты, такие как масло какао и воски для суппозиторий;
- (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, сезамовое масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло;
- (10) гликоли, такие как пропиленгликоль;
- (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль;
- (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат;
- (13) агар;
- (14) буферирующие вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия;
- (15) альгиновую кислоту;
- (16) апирогенную воду;
- (17) изотоничный солевой раствор;
- (18) раствор Рингера;
- (19) этиловый спирт;
- (20) pH-буферные растворы;
- (21) сложные полиэфиры, поликарбонат и/или полиангидриды;
- (22) наполнители, такие как полипептиды и аминокислоты;
- (23) сывороточный компонент, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и
- (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических препаратах.

Препараты могут быть представлены для удобства в стандартной лекарственной форме и могут быть получены любыми способами, известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения единой лекарственной формы, будет изменяться в зависимости от реципиента, которого лечат и определенного способа введения. Количество активного ингредиента, которое может быть объединено с материалом носителя для получения единой лекарственной формы, как правило, будет таким количеством соединения, которое вызывает терапевтический эффект. Как правило, в одной сотне процентов такое количество будет изменяться от примерно 0,1% до примерно 99% активного ингредиента, предпочтительно от примерно 5% до примерно 70%, наиболее предпочтительно от примерно 10% до примерно 30%.

В некоторых вариантах осуществления препарат по настоящему изобретению содержит эксципиент, выбранный из группы, состоящей из циклодекстринов, целлюлоз, липосом, мицеллообразующих средств, например желчных кислот, и полимерных носителей, например сложных полиэфиров и полиангидридов, и соединение по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вышеуказанный препарат придает пероральную биодоступность соединению по настоящему изобретению.

Препарат средства мРНК может содержать комбинацию с другим средством, например другим терапевтическим средством или веществом, которое стабилизирует мРНК, например белком, который образует комплекс с мРНК с образованием iRNP. Кроме того, другие средства включают хелаторы, например ЭДТК (например, для удаления двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+}), соли, ингибиторы РНКаз (например, ингибитор РНКазы широкой специфичности, такой как RNAsin) и т.п.

Способы получения таких препаратов или композиций включают стадию приведения соединения по настоящему изобретению в сочетание с носителем и необязательно одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Как правило, препараты получают путем равномерного приведения соединения по настоящему изобретению в тесный контакт с жидкими носителями или тонко измельченными твердыми носителями или теми и другими и последующим при необходимости формованием продукта.

В некоторых случаях, для того чтобы пролонгировать действие лекарственного средства, желательным замедлить поглощение лекарственного средства из подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно выполнить за счет использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего плохую растворимость в воде. Тогда скорость абсорбции лекарственного средства зависит от скорости растворения в воде, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. С другой стороны, замедленную абсорбцию парентерально введенного лекарственного

средства можно получить, растворяя или суспендируя лекарственное средство в масляной среде.

Соединения по изобретению могут быть включены в составы для введения любым удобным путем для использования в медицине или ветеринарии по аналогии с другими фармацевтическими препаратами.

Термин "лечение" предназначен для обозначения также профилактики, лечения и исцеления. Пациентом, получающим такое лечение, является любое животное, нуждающееся в этом, включая приматов, в частности человека, и других млекопитающих, таких как лошади, крупный рогатый скот, свиньи и овцы, и домашнюю птицу и всех домашних животных.

Двухцепочечные средства РНКи получают в клетке *in vivo*, например, из экзогенных ДНК-матриц, которые доставляются в клетку. Например, ДНК-матрицы могут быть встроены в векторы и использованы в качестве векторов генной терапии. Векторы генной терапии могут быть доставлены индивиду, например, внутривенной инъекцией, местным введением (патент США № 5328470) или стереотаксической инъекцией (см., например, Chen et al. (1994), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91: 3054-3057). Фармацевтический препарат вектора генной терапии может включать вектор генной терапии в приемлемой разбавителе или может включать матрицу медленного высвобождения, в которую вставлена доставочная среда для гена. ДНК-матрицы, например, могут включать две единицы транскрипции, из которых одна продуцирует транскрипт, который включает верхнюю цепь средства дцРНК, и другая продуцирует транскрипт, который включает нижнюю цепь средства дцРНК. Когда матрицы транскрибируют, средство дцРНК продуцируется и процессируется в фрагменты средства мцРНК, которые опосредуют сайленсинг гена.

Пути доставки.

Композиция, которая включает иРНК, может быть доставлена индивиду различными путями. Примеры путей включают внутривенный, подкожный, местный, ректальный, анальный, вагинальный, назальный, легочный, глазной.

Молекулы иРНК по изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, содержат один или несколько видов иРНК и фармацевтически приемлемый носитель. Используемая в настоящем описании формулировка "фармацевтически приемлемый носитель" предназначена для включения любого и всех растворителей, диспергирующих сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, средств изотоничности и средств, замедляющих абсорбцию, и т.п., совместимых с фармацевтическим введением. Использование таких сред и средств с фармацевтически активными веществами хорошо известно в данной области. Их использование в композиции предполагается за исключением случая, когда любая обычная среда или средство несовместимы с активным соединением. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить рядом способов в зависимости от того, желательно локальное или системное лечение, и участка, который обрабатывают. Введение может быть местным (включая офтальмическое, вагинальное, ректальное, интраназальное, трансдермальное), пероральное или парентеральное. Парентеральное введение включает капельное внутривенное вливание, подкожную, интраперитонеальную или внутримышечную инъекцию или интратекальное или интравентрикулярное введение.

Путь и место введения могут быть выбраны для усиления нацеливания. Например, для того чтобы попасть в мышечные клетки, логичным выбором может быть внутримышечная инъекция в мышцы, представляющие интерес. В клетки легких можно попасть путем введения иРНК в аэрозольной форме. В сосудистые эндотелиальные клетки можно попасть с помощью покрытия с иРНК на катетере и механическим введением ДНК.

Дозировка.

В одном из аспектов особенностью изобретения является способ введения индивиду (например, человеку) средства дцРНК, например средства мцРНК. Способ включает введение стандартной дозы средства дцРНК, например средства мцРНК, например двухцепочечного средства мцРНК, которая (а) имеет двухцепочечную часть длиной в 14-30 нуклеотидов (нк), например 21-23 нк, (b) комплементарна РНК-мишени (например, эндогенной или патогенной РНК-мишени) и необязательно (с) включает по меньшей мере один 3'-выступ длиной в 1-5 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления стандартная доза составляет менее 10 мг/кг массы тела или менее 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005 или 0,00001 мг/кг массы тела и менее 200 нмоль средства РНК (например, примерно $4,4 \times 10^{16}$ копий) на кг массы тела или менее 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075 или 0,00015 нмоль средства РНК на кг массы тела.

Определенное количество может представлять собой количество, эффективное для лечения или профилактики заболевания или расстройства, например заболевания или расстройства, связанного с РНК-мишенью. Стандартную дозу можно ввести, например, инъекцией (например, внутривенной, подкожной или внутримышечной), ингаляционной дозой или местным введением. В некоторых вариантах осуществления дозировки могут составлять менее 10, 5, 2, 1 или 0,1 мг/кг массы тела.

В некоторых вариантах осуществления стандартную дозу вводят реже одного раза в сутки, например реже чем каждые 2, 4, 8 или 30 дней. В другом варианте осуществления стандартную дозу вводят

нерегулярно. Например, стандартная доза может быть введена однократно.

В одном из вариантов осуществления эффективную дозу вводят с другими традиционными терапевтическими способами. В одном из вариантов осуществления индивид имеет вирусную инфекцию и средством является противовирусное средство, иное, чем средство дцРНК, например иное, чем средство миРНК. В другом варианте осуществления индивид имеет атеросклероз и эффективную дозу средства дцРНК, например средства миРНК, вводят в комбинации, например, после, хирургического вмешательства, например ангиопластики.

В одном из вариантов осуществления индивиду вводят начальную дозу и одну или несколько поддерживающих доз средства дцРНК, например средства миРНК (например, предшественника, например средства более крупной дцРНК, которая может быть процессирована в средство миРНК, или ДНК, которая кодирует средство дцРНК, например средство миРНК, или его предшественника). Поддерживающая доза или дозы могут быть такими же или меньше, чем начальная доза, например наполовину меньше начальной дозы. Схема поддерживающего лечения может включать лечение индивида дозой или дозами, колеблющимися от 0,01 до 15 мг/кг массы тела в сутки, например 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 или 0,00001 мг на кг массы тела в сутки. Поддерживающие дозы вводят, например, не чаще чем один раз каждые 2, 5, 10 или 30 дней. Кроме того, схема лечения может длиться в течение периода времени, который будет изменяться в зависимости от характера определенного заболевания, его тяжести и общего состояния пациента. В некоторых вариантах осуществления дозировка может доставляться не более одного раза в сутки, например не более одного раза в 24, 36 или 48 или более часов, например не более одного раза каждые 5 или 8 дней. После лечения пациента можно проконтролировать изменения в его состоянии и облегчение симптомов болезненного состояния. Дозировка соединения может быть или увеличена, в случае когда пациент не реагирует в достаточной степени на текущие уровни дозировки, или доза может быть уменьшена, если наблюдается облегчение симптомов болезненного состояния, если болезненное состояние не устраняется или если наблюдают побочное действие.

Эффективную дозу можно ввести в однократной дозе или в двух или более дозах, как желательно или считается соответствующим в конкретных обстоятельствах. Если желательно облегчить повторные или частые инфузии, может быть целесообразна имплантация доставочного устройства, например насоса, временного стента (например, внутривенного, интраперитонеального, интрацистерального или интракапсулярного) или резервуара.

В одном из вариантов осуществления композиция включает несколько видов средства дцРНК. В другом варианте осуществления вид средства дцРНК имеет последовательности, которые не перекрываются и не соседствуют с другими видами в отношении последовательности-мишени, встречающейся в природе. В другом варианте осуществления несколько видов средства дцРНК специфичны для различных природных генов-мишеней. В другом варианте осуществления средство дцРНК является аллельспецифическим.

Средства дцРНК по изобретению, описанные в настоящем описании, можно вводить млекопитающим, в частности крупным млекопитающим, таким как приматы, не принадлежащие к человеку, или человеку, различными путями.

В одном из вариантов осуществления введение композиции средства дцРНК, например средства миРНК, представляет парентеральное введение, например внутривенное (например, в виде болюса или в виде диффундирующей инфузии), интрадермальное, интраперитонеальное, внутримышечное, интраклеточное, интравентрикулярное, интракраниальное, подкожное, трансмукозное, трансбуккальное, сублингвальное, эндоскопическое, ректальное, пероральное, вагинальное, местное, легочное, интраназальное, уретральное или глазное. Введение может быть проведено индивидом или другим человеком, например медицинским работником. Лекарственный препарат может предоставляться в отмеренных дозах или в устройстве, которое доставляет отмеренную дозу. Выбираемые типы доставки подробнее обсуждаются ниже.

Изобретение относится к способам, композициям и наборам для ректального введения или доставки средств дцРНК, описанных в настоящем описании.

Способы ингибирования экспрессии гена-мишени.

Варианты осуществления изобретения также относятся к способам ингибирования экспрессии гена-мишени. Способ включает стадию введения средств дцРНК по любому из предшествующих вариантов осуществления в количестве, достаточном для ингибирования экспрессии гена-мишени.

Другой аспект изобретения относится к способу модуляции экспрессии гена-мишени в клетке, включающему предоставление указанной клетке средства дцРНК по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления ген-мишень выбирают из группы, состоящей из фактора VII, Eg5, PCSK9, TPX2, ароВ, SAA, TTR, RSV, гена PDGF-бета, гена Erb-B, гена Src, гена CRK, гена CRB2, гена RAS, гена MEKK, гена JNK, гена RAF, гена Erc1/2, гена PCNA(p21), гена MYB, гена JUN, гена FOS, гена BCL-2, гепцидена, активированного белка C, гена циклина D, гена VEGF, гена EGFR, гена циклина A, гена циклина E, гена WNT-1, гена бета-катенина, гена c-MET, гена PKC, гена NFkB, гена STAT3, гена сурвивина, гена Her2/Neu, гена топоизомеразы I, гена топоизомеразы II альфа, мутаций в гене p73, мутаций в гене p21 (WAF1/CIP1), мутаций в гене p27(KIP1), мутаций в гене PPMID, мутаций в гене RAS, мутаций в гене

кавеолина I, мутаций в гене MIB I, мутаций в гене MTA1, мутаций в гене M68, мутаций в опухолевых генах-супрессорах и мутаций в опухолевом гене-супрессоре p53.

Изобретение дополнительно поясняется приведенными далее примерами, которые не следует рассматривать как ограничительные. Все ссылки, находящиеся на рассмотрении заявки на патент и опубликованные патенты, цитированные в настоящем описании, включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Примеры

Пример 1. Скрининг миРНК-дуплексов *in vitro*.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки человека Hep3В или клетки крысы Н.П.4.Е (ATCC, Manassas, VA) выращивают почти до слияния при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в RPMI (ATCC) с добавлением 10% FBS, стрептомицина и глутамина (ATCC) и затем извлекают из чашки трипсинизацией. Трансфекцию выполняют, добавляя к 5 мкл миРНК-дуплексов на лунку в 96-луночном планшете 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл липофектамина RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad, CA, кат. № 13788-150), и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляют 80 мкл полной среды для выращивания без антибиотиков, содержащей ~2×10⁴ клеток Hep3В. Клетки инкубируют или 24 или 120 ч и затем очищают РНК. Эксперименты с однократной дозой выполняют при конечной концентрации дуплексов 10 и 0,1 нМ, и эксперименты по зависимости реакции от дозы выполняют с использованием 8, 4-кратных серийных разведений с максимальной дозой дуплексов в конечной концентрации 10 нМ.

Изоляция полной РНК с использованием набора DYNABEADS mRNA (Invitrogen, part #: 610-12).

Клетки собирают и лизируют в 150 мкл буфера для лизиса/связывания, затем перемешивают 5 мин при 850 об/мин с использованием термосмесителя Эппендорфа (скорость перемешивания одна и та же на протяжении процесса). В лунки планшета с круглодонными лунками добавляют смесь 10 мкл магнитных гранул и 80 мкл буфера для лизиса/связывания и перемешивают в течение 1 мин. Магнитные гранулы закрепляют с использованием магнитной подставки и супернатант удаляют, не затрагивая гранулы. После удаления супернатанта к оставшимся гранулам добавляют лизированные клетки и перемешивают в течение 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывают 2 раза 150 мкл буфера для промывки А и перемешивают в течение 1 мин. Гранулы снова закрепляют и удаляют супернатант. Затем гранулы промывают 150 мкл буфера для промывки В, закрепляют и удаляют супернатант. Затем гранулы промывают 150 мкл буфера для элюирования, закрепляют и удаляют супернатант. Гранулы оставляют сушиться на 2 мин. После сушки добавляют 50 мкл буфера для элюирования и перемешивают в течение 5 мин при 70°C. Гранулы закрепляют магнитом в течение 5 мин. Извлекают 40 мкл супернатанта и добавляют в другой 96-луночный планшет.

Синтез кДНК с использованием высокопроизводительного набора для обратной транскрипции кДНК ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, кат. № 4368813).

К 5 мкл полной РНК добавляют основную смесь из 1 мкл 10X буфера, 0,4 мкл 25X dNTP, 1 мкл случайных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 1,6 мкл H₂O на реакцию. Генерируют кДНК с использованием термоячейки Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, CA) через следующие стадии: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 с, 4°C выдержка.

ПЦР в реальном времени.

К основной смеси, содержащей 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan (Applied Biosystems, кат. № 4236317E (человека), кат. № 4308313 (грызуна)), 0,5 мкл зонда TTR TaqMan (Applied Biosystems, кат. № HS00174914_m1 (человека), кат. № Rn00562124_m1 (крысы)) и 5 мкл основной смеси зонда Light-cycler 480 (Roche, кат. № 04887301001), на лунку в 384-луночном планшете (Roche, кат. № 04887301001) добавляют 2 мкл кДНК. ПЦР в реальном времени проводят в аппарате для ПЦР в реальном времени Roche LC 480 (Roche). Каждый дуплекс испытывают при по меньшей мере двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию анализируют двукратно, если не указано иное.

Для того чтобы вычислить относительное кратное изменение, данные в реальном времени анализируют с использованием метода ΔΔCt и нормализуют к анализам, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или мнимотрансфицированными клетками. IC₅₀ вычисляют с использованием 4-параметрической модели соответствия с использованием XLFit и нормализуют к клеткам, трансфицированным AD-1955, или наивным клеткам в одном и том же интервале доз или к их собственной наименьшей дозе. IC₅₀ вычисляют для каждой отдельной трансфекции, а также в комбинации, где одна IC₅₀ соответствует данным из обеих трансфекций.

Результаты по сайленсингу гена примера миРНК-дуплекса с различными модификациями мотивов по изобретению приводятся в таблице ниже.

Пример 2. Синтез РНК и отжиг дуплексов.

1. Синтез олигонуклеотидов.

Все олигонуклеотиды синтезируют в синтезаторе АКТАoligopilot или синтезаторе ABI 394. Для синтеза олигонуклеотидов используют, если не указано иное, коммерчески доступный твердый носитель из пористого стекла с определенным размером пор (dT-CPG, 500A, Prime Synthesis) и фосфорамидиты

РНК со стандартными защитными группами 5'-О-диметокситритил-N6-бензоил-2'-трет-бутилдиметилсилиладенозин-3'-О-N,N'-диизопропил-2'-цианоэтилфосфорамидит, 5'-О-диметокситритил-N4-ацетил-2'-трет-бутилдиметилсилилцитидин-3'-О-N,N'-диизопропил-2'-цианоэтилфосфорамидит, 5'-О-диметокситритил-N2-изобутирил-2'-трет-бутилдиметилсилилгуанозин-3'-О-N,N'-диизопропил-2'-цианоэтилфосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-трет-бутилдиметилсилилуридин-3'-О-N,N'-диизопропил-2'-цианоэтилфосфорамидит (Pierce Nucleic Acids Technologies). 2'-F-Фосфорамидиты 5'-О-диметокситритил-N4-ацетил-2'-фторцитидин-3'-О-N,N'-диизопропил-2'-цианоэтилфосфорамидит и 5'-О-диметокситритил-2'-фторуридин-3'-О-N,N'-диизопропил-2'-цианоэтилфосфорамидит закупают у Promega. Все фосфорамидиты используют в концентрации 0,2 М в ацетонитриле (CH₃CN) за исключением гуанозина, который используют в концентрации 0,2 М в смеси 10% ТГФ/АНС (об./об.). Используют время присоединения/рециклинга 16 мин. Активатором является 5-этилтиотетразол (0,75 М, American International Chemicals) для PO-окисления используют смесь иод/вода/пиридин, и для PS-окисления используют PADS (2%) в смеси 2,6-лутидин/ACN (1:1, об./об.).

Лигандконъюгированные цепи синтезируют с использованием твердого носителя, содержащего соответствующий лиганд. Например, введения углеводной части/лиганда (в случае, например, GalNAc) в 3'-конец последовательности достигают, начиная синтез с помощью соответствующего углеводного твердого носителя. Подобным образом холестериновую часть вводят в 3'-конец, начиная синтез на холестериновом носителе. Как правило, лигандная часть привязывается к транс-4-гидроксипролинолу через связку, выбранную так, как описано в предыдущих примерах, и получают часть гидроксипролинол-лиганд. Затем часть гидроксипролинол-лиганд соединяют с твердым носителем через сукцинатный линкер или превращают в фосфорамидит в стандартных условиях фосфорилирования и получают нужные строительные блоки углеводного конъюгата. Меченые флуорофором миРНК синтезируют из соответствующего фосфорамидита или твердого носителя, закупленных у Biosearch Technologies. Олеиллитохолический (GalNAc)₃ полимерный носитель готовят на фирме при нагрузке 38,6 мкмоль/г. Маннозный (Man)₃ полимерный носитель также готовят на фирме при нагрузке 42,0 мкмоль/г.

Конъюгации выбранного лиганда с нужным положением, например 5'-концом последовательности, достигают, присоединяя соответствующий фосфорамидит к растущей цепи в стандартных условиях фосфорамидитного сочетания, если не указано иное. На протяжении 15 мин сочетание 0,1 М раствора фосфорамидита в безводном CH₃CN в присутствии активатора 5-(этилтио)-1Н-тетразола связывает его с олигонуклеотидом. Окисление интернуклеозидного фосфита до фосфата осуществляют с использованием стандартной йодной воды, как сообщается в (1), или путем обработки смесью трет-бутилгидроксипероксид/ацетонитрил/вода (10:87:3) с 10-минутным временем выдержки для окисления конъюгированного олигонуклеотида. Фосфоротиоат вводят окислением фосфита до Фосфоротиоата с использованием реагента переносчика серы, такого как DDTT (закупают у AM Chemicals), PADS и/или реагента Бокажа. Холестеринфосфорамидит синтезируют на фирме и используют в концентрации 0,1 М в дихлорметане. Время сочетания для холестеринфосфорамидита составляет 16 мин.

2. Удаление защитной группы-I (удаление защитной группы нуклеотидного основания).

По завершении синтеза носитель переносят в 100-мл стеклянный флакон (VWR). Олигонуклеотид отщепляют от носителя с одновременным удалением защитной группы основания и фосфатных групп с помощью 80 мл смеси этанола с аммиаком [аммиак:этанол (3:1)] в течение 6,5 ч при 55°C. Флакон недолго охлаждают на льду и затем этанолааммиачную смесь фильтруют в другой 250-миллилитровый флакон. СРГ промывают смесью этанол/вода (1:1, об./об.) 2×40 мл. Затем объем смеси уменьшают до ~30 мл роторным испарением. Затем смесь замораживают на сухом льду и сушат в вакууме на speed vac.

3. Удаление защитной группы-II (удаление группы 2'-TBDMS).

Высушенный остаток ресуспендируют в 26 мл смеси триэтиламина, тригидрофторида триэтиламина (TEA.3HF) или пиридин-HF и ДМСО (3:4:6) и греют при 60°C в течение 90 мин для удаления трет-бутилдиметилсилильных (TBDMS) групп в положении 2'. Затем реакцию гасят 50 мл 20 мМ раствора ацетата натрия, доводят рН до 6,5 и хранят в замороженном состоянии до очистки.

4. Анализ.

Олигонуклеотиды перед очисткой анализируют высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ), и выбор буфера и колонки зависит от характера последовательности и или конъюгированного лиганда.

5. Очистка ВЭЖХ.

Олигонуклеотиды, конъюгированные с лигандами, очищают препаративной ВЭЖХ с обращенной фазой. Неконъюгированные олигонуклеотиды очищают анионообменной ВЭЖХ на колонке с гелем TSK, которую набивают на фирме. Буферами являются 20 мМ раствор фосфата натрия (рН 8,5) в 10% CH₃CN (буфер А) и 20 мМ раствор фосфата натрия (рН 8,5) в 10% CH₃CN, 1 М NaBr (буфер В). Фракции, содержащие полноразмерные олигонуклеотиды, собирают вместе, обессоливают и лиофилизируют. Приблизительной 0,15 OD обессоленные олигонуклеотиды разводят в воде до 150 мкл и затем пипеткой вносят в специальные сосуды для анализа CGE и ЖХ/МС. Соединения в заключение анализируют ЖХ-ESMC и CGE.

6. Получение миРНК.

Для получения миРНК эквимоллярные количества смысловой и антисмысловой цепи греют в 1×PBS при 95°C в течение 5 мин и медленно охлаждают до комнатной температуры. Целостность дуплекса подтверждают методом ВЭЖХ.

Таблица 1

Модифицированный дуплекс ANGPTL3

Дуплекс ID	S ID	Смысловая цепь (S)	AS ID	Антисмысловая цепь (AS)	% мРНК оставшейся конц. миРНК			IC50 (нМ)
					1 нМ	0.1 нМ	0.01 нМ	
D1000	S1000	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1000	AfUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.1	0.47	0.006
D1001	S1001	AfsuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1001	aUfsgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.10	0.49	0.0065
D1002	S1002	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1002	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.10	0.46	0.0068
D1003	S1003	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1003	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.12	0.56	0.0073
D1004	S1004	aUGuaACccAGagUAuuCCcasu	AS1004	AUggAAuaCUcuUGguUAcaUsGsa	0.07	0.13	0.44	0.008
D1005	S1005	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1005	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.11	0.53	0.0093
D1006	S1006	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1006	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.16	0.55	0.0095
D1007	S1007	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1007	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfguuAfcAfusGfsa	0.05	0.14	0.48	0.0098
D1008	S1008	auguaaccaadGadGudAudAcGasu	AS1008	aUfgGfaAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.11	0.33	0.010
D1009	S1009	UfgGfGfaUfuUfaCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1009	uCfuugGfuUfaCfaugAfaAfuucCfasUfsc	0.03	0.14	0.56	0.0101
D1010	S1010	UfgGfGauUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1010	uCfuUfgUfuUfaCfaugAfaAfuUfcCfasUfsc	0.03	0.14	0.65	0.0101
D1011	S1011	aUfGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1011	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.10	0.55	0.011
D1012	S1012	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1012	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.13	0.54	0.0114
D1013	S1013	auguaaccaadGadGudAudAcGasu	AS1013	aUfgGfaAfaAfcUfcUfudGudTadCadTsgsa	0.11	0.19	0.49	0.011
D1014	S1014	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1014	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.16	0.59	0.013
D1015	S1015	AfuguAfaCfaGfdAGfdAdTudCcdAsu	AS1015	dAUdGgdAAdTafdCUfcUfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.15	0.51	0.013
D1016	S1016	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1016	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.14	0.64	0.013
D1017	S1017	UfGfgGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1017	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.41	0.74	0.0133
D1018	S1018	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1018	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.14	0.61	0.014
D1019	S1019	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1019	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.02	0.2	0.7	0.014
D1020	S1020	AfsuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1020	asUfsgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.16	0.67	0.0156
D1021	S1021	aUfguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1021	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.24	0.64	0.016
D1022	S1022	dTdGggdAdTuudCdAugdTdAacdCdAagsdA	AS1022	uCdTugdGdTdAdAugdTdAacdCdCasdTsc	0.08	0.27	0.64	0.0161
D1023	S1023	AfsuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1023	aUfsgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.19	0.63	0.0163
D1024	S1024	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1024	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.05	0.25	0.69	0.0164
D1025	S1025	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1025	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.18	0.75	0.0166
D1026	S1026	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1026	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.19	0.66	0.0178
D1027	S1027	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1027	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.19	0.69	0.018
D1028	S1028	dAdTgudAdAcddAdAgadGdTaudTdCcasdT	AS1028	adTdGgadAdTacdTdCuudGdGuudAdCausdGsa	0.15	0.29	0.72	0.018
D1029	S1029	adTgdTadAdCcdAdAGdAGdTAdTudCcdAsu	AS1029	dAUdGgdAAdTadCudCudTgdGudTadCadTsGsdA	0.1	0.27	0.61	0.018
D1030	S1030	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1030	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.21	0.64	0.0187
D1031	S1031	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1031	AfUfGfGfaAfaAfcUfcUfGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.15	0.62	0.019
D1032	S1032	AfsuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1032	asUfsgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.34	0.78	0.021
D1033	S1033	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1033	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.06	0.26	0.57	0.0212
D1034	S1034	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1034	aUfgGfaAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.39	0.82	0.0216
D1035	S1035	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1035	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.16	0.56	0.0222
D1036	S1036	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1036	uCfuugGfuUfaCfaUfgUfaAfuucCfasUfsc	0.06	0.31	0.78	0.0234
D1037	S1037	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1037	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuucCfasUfsc	0.03	0.14	0.62	0.0235
D1038	S1038	UfGfgGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1038	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.39	0.78	0.0239
D1039	S1039	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1039	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.14	0.59	0.025
D1040	S1040	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1040	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.13	0.56	0.025
D1041	S1041	AfsuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1041	asUfsgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.27	0.79	0.0252
D1042	S1042	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1042	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.05	0.27	0.67	0.0259
D1043	S1043	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1043	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.02	0.16	0.63	0.027
D1044	S1044	AfsuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1044	asUfsgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.30	0.81	0.0271
D1045	S1045	aUfguAfaCfcAfaGfaGfuUfcCfasUf	AS1045	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.29	0.8	0.028
D1046	S1046	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1046	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.15	0.59	0.030
D1047	S1047	UfgGfGfaUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1047	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.08	0.44	0.83	0.0324
D1048	S1048	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1048	aUfgGfaAfaAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.23	0.67	0.036
D1049	S1049	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1049	AfUfGfGfaAfaAfcUfcUfGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.23	0.73	0.037

D1050	S1050	UfgGfAfuuuCfaUfgUfaAfcCfAfaFgsAf	AS1050	uCfuugGfuUfaCfaUfgAfAfaUfcCfCfasUfsc	0.06	0.29	0.78	0.0372
D1051	S1051	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1051	aUfgGfaAfuAdAcTcdTudGgdTuAfcAfusgsa	0.12	0.41	0.86	0.040
D1052	S1052	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTudCcdAsu	AS1052	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.22	0.72	0.042
D1053	S1053	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTudCcdAsu	AS1053	dAUdGGdAAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.31	0.69	0.044
D1054	S1054	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGdTafuUfcdCdAsUf	AS1054	adTdGGfaAfuAdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.75	0.047
D1055	S1055	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTudCcdAsu	AS1055	dAUdGGdAadTafCufUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.26	0.7	0.049
D1056	S1056	AuGuAaCcAaGaGuAuUcCasU	AS1056	aUfgGfaAuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.24	0.65	0.050
D1057	S1057	AfuguAfaccAfaGfaGfuauUfccasUf	AS1057	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.42	0.62	0.051
D1058	S1058	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1058	aUfgGfaAfuAdAcTcdTudGgdTuAfcAfusGfsa	0.12	0.36	0.86	0.053
D1059	S1059	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTudCcdAsu	AS1059	dAUdGGdAadTafCufUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.27	0.7	0.054
D1060	S1060	adTgdAdAccdAdAgadTadTudCcdAsu	AS1060	adTdGgdAadTadCcdCuudGdGuudAdCadTsgsa	0.11	0.37	0.66	0.056
D1061	S1061	AfuGfuAfaCfcAfaGfdAdGuAfuUfcdCdAsUf	AS1061	adTdGGfaAfuAfdCdfUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.31	0.77	0.059
D1062	S1062	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTudCcdAsu	AS1062	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.27	0.65	0.059
D1063	S1063	adTdGuadAdCcdAdGagdTAdAuudCdCasu	AS1063	dAdTggdAdAadCcdTudTdGgdTdAcadTsdGsa	0.12	0.44	0.82	0.064
D1064	S1064	AfuGfuAfaCfcAfaGfdTAdTudCcdAsu	AS1064	adTdGGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.32	0.83	0.064
D1065	S1065	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTudCcdAsu	AS1065	dAUdGGdAadTafCufUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.34	0.72	0.066
D1066	S1066	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfdAdTudCcdAsu	AS1066	adTdGGfadAdTafCufUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.33	0.72	0.067
D1067	S1067	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTudCcdAsu	AS1067	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.37	0.62	0.070
D1068	S1068	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTudCcdAsu	AS1068	dAUdGGdAAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.33	0.64	0.072
D1069	S1069	aUfgGfaAfcCfcAfaGfdAGfdTAdTudCcdAsu	AS1069	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.43	0.73	0.074
D1070	S1070	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGdTafuUfcdCdAsUf	AS1070	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.42	0.94	0.075
D1071	S1071	UfgGfAfuuuCfaUfgUfaAfcCfAfaFgsAf	AS1071	uCfuugGfuUfaCfaUfgAfAfaUfcCfCfasUfsc	0.14	0.28	0.83	0.0797
D1072	S1072	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGdTAdTudCcdAsu	AS1072	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.26	0.8	0.082
D1073	S1073	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGdTAdTudCcdAsu	AS1073	aUfgGfadAdTadAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.41	0.73	0.083
D1074	S1074	AfUfgUfaAfcCfcAfaGfadGdTAdTudCcdAsu	AS1074	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.44	0.75	0.086
D1075	S1075	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1075	aUfgGfadAdTadAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.41	0.72	0.088
D1076	S1076	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1076	aUfgGfadAdTadAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.45	0.86	0.088
D1077	S1077	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1077	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.46	0.95	0.092
D1078	S1078	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1078	dAUdGGdAadTafCufUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.32	0.76	0.093
D1079	S1079	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTudCcdAsu	AS1079	dAUdGGdAadTafCufUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.38	0.76	0.095
D1080	S1080	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGdTafuUfcdCdAsUf	AS1080	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.42	0.86	0.099
D1081	S1081	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcdCdAsdT	AS1081	dAdTdGdGaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.47	0.9	0.105
D1082	S1082	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1082	aUfgGfaAfuAdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.44	0.83	0.106
D1083	S1083	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1083	adTdGGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.34	0.74	0.109
D1084	S1084	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1084	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.93	0.117
D1085	S1085	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1085	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.42	0.78	0.120
D1086	S1086	aUfgGfaAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1086	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.45	0.83	0.1197
D1087	S1087	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1087	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.3	0.7	0.120
D1088	S1088	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1088	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.46	0.8	0.120
D1089	S1089	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1089	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.49	0.85	0.122
D1090	S1090	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1090	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.41	0.85	0.125
D1091	S1091	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTudCcdAsu	AS1091	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.38	0.77	0.125
D1092	S1092	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1092	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.31	0.93	0.126
D1093	S1093	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1093	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.33	0.9	0.135
D1094	S1094	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1094	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.39	0.85	0.142
D1095	S1095	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1095	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.39	0.76	0.146
D1096	S1096	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1096	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.38	0.85	0.147
D1097	S1097	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1097	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.47	0.87	0.147
D1098	S1098	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1098	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.42	0.85	0.151
D1099	S1099	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1099	dAUdGGdAadTafCufUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.41	0.85	0.152
D1100	S1100	AfuguAfaccAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1100	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.48	0.72	0.152
D1101	S1101	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1101	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.38	0.94	0.158
D1102	S1102	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1102	aUfgGfaAfuAfdCufUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.21	0.45	0.89	0.162
D1103	S1103	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1103	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.49	0.95	0.163

D1104	S1104	AfuGfuAfacCfAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1104	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.36	0.92	0.163
D1105	S1105	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1105	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.84	0.167
D1106	S1106	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1106	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.43	0.91	0.170
D1107	S1107	AfuGfuAfacCfAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1107	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.46	1	0.171
D1108	S1108	AfuguAfacCfAfaGfaGfdTadTudCcdAsu	AS1108	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.39	0.71	0.176
D1109	S1109	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1109	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.43	0.9	0.180
D1110	S1110	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfUfcCfasUf	AS1110	aUfgGfaaAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.42	0.88	0.182
D1111	S1111	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1111	dAUdGGdAAuAfcUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.49	0.79	0.183
D1112	S1112	AfuGfuUfAfacCfAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1112	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.48	0.85	0.195
D1113	S1113	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfUfcCfasUf	AS1113	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.41	0.85	0.201
D1114	S1114	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1114	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.44	0.94	0.201
D1115	S1115	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1115	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.41	0.96	0.204
D1116	S1116	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1116	adTdGGfadAfcUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.47	0.79	0.208
D1117	S1117	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1117	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.42	0.92	0.224
D1118	S1118	auguaaccaagaguauuccasu	AS1118	AfUFGfGfaAfuAfcUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.5	0.87	0.303
D1119	S1119	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1119	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.55	0.89	
D1120	S1120	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1120	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.63	0.72	
D1121	S1121	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1121	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.61	0.91	
D1122	S1122	AfUFGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfccasUf	AS1122	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.54	0.95	
D1123	S1123	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1123	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfuuAfcAfusGfsa	0.13	0.61	0.97	
D1124	S1124	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1124	aUfgGfaaAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.56	0.94	
D1125	S1125	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1125	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.21	0.74	0.95	
D1126	S1126	AfUFGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1126	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.2	0.69	0.91	
D1127	S1127	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1127	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfuuAfcAfusGfsa	0.17	0.7	0.96	
D1128	S1128	AfUFGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1128	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.62	0.85	
D1129	S1129	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1129	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.23	0.76	0.98	
D1130	S1130	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1130	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.21	0.64	0.9	
D1131	S1131	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1131	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.17	0.7	1.01	
D1132	S1132	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1132	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.58	0.87	
D1133	S1133	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1133	augGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.33	0.89	1.05	
D1134	S1134	AfUFGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfUfcCfasUf	AS1134	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.64	0.96	
D1135	S1135	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfUfcCfasUf	AS1135	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.53	0.96	
D1136	S1136	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfUfcCfasUf	AS1136	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.16	0.58	0.98	
D1137	S1137	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1137	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.16	0.6	0.91	
D1138	S1138	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1138	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.54	0.91	
D1139	S1139	AfUFGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1139	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.24	0.68	0.98	
D1140	S1140	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1140	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.75	0.9	
D1141	S1141	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfUfcCfasUf	AS1141	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.15	0.52	1.05	
D1142	S1142	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1142	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.66	0.89	
D1143	S1143	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1143	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.51	0.89	
D1144	S1144	AfUFGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1144	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.25	0.71	0.95	
D1145	S1145	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1145	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.74	0.98	
D1146	S1146	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1146	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.51	0.86	
D1147	S1147	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfccasUf	AS1147	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.52	0.83	
D1148	S1148	AfUFGfuAfacCfAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1148	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.63	0.98	
D1149	S1149	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1149	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.13	0.58	0.88	
D1150	S1150	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1150	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.62	0.94	
D1151	S1151	AfUFGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1151	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.73	0.94	
D1152	S1152	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfUfcCfasUf	AS1152	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.53	0.97	
D1153	S1153	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuUfccasUf	AS1153	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.13	0.53	0.98	
D1154	S1154	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1154	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.5	0.78	
D1155	S1155	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1155	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.13	0.62	0.89	
D1156	S1156	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1156	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.12	0.65	0.85	
D1157	S1157	UfgGfAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1157	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.11	0.54	0.85	

D1158	S1158	UfgGfgAfuuuCfaUfgUfAfaCfaAfgsAf	AS1158	uCfuUfgGfuuuAfaUfgUfAfaCfaCfasUfsc	0.13	0.53	0.8	
D1159	S1159	UfGfggAfUfuUfCfaGfuAfaCfaAfgsAf	AS1159	uCfuUfgGfuuuAfaUfgUfAfaCfaCfasUfsc	0.59	0.89	0.81	
D1160	S1160	UfGfggAfUfuUfCfaUfgUfAfaCfaAfgsAf	AS1160	uCfuUfgGfuuuAfaUfgUfAfaCfaCfasUfsc	0.16	0.72	0.9	
D1161	S1161	UfgGfgAfuUfucUfGfUfAfaCfaAfgsAf	AS1161	uCfuUfgGfUfacaUfgUfAfaCfaCfasUfsc	0.27	0.69	0.86	
D1162	S1162	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1162	aUfgGfaAfuacUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.12	0.6	0.95	
D1163	S1163	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1163	aUfgGfaaUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.05	0.56	1.02	
D1164	S1164	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1164	aUfgGfaAfuacUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.13	0.55	1	
D1165	S1165	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1165	aUfgGfaaUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.09	0.6	0.97	
D1166	S1166	AfuguAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1166	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.15	0.59	0.91	
D1167	S1167	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1167	aUfgGfaaUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.11	0.59	1	
D1168	S1168	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1168	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.13	0.57	0.94	
D1169	S1169	auGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1169	aUfgGfaaUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.08	0.5	0.9	
D1170	S1170	afuguAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1170	aUfgGfaaUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.06	0.53	0.91	
D1171	S1171	auGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1171	aUfggaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.07	0.56	0.89	
D1172	S1172	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1172	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.13	0.59	0.98	
D1173	S1173	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1173	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.2	0.65	1.03	
D1174	S1174	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1174	aUfgGfaaUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.07	0.51	0.95	
D1175	S1175	afuguAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1175	aUfggaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.2	0.53	0.76	
D1176	S1176	auGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1176	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.74	0.98	0.81	
D1177	S1177	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1177	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.43	0.64	0.88	
D1178	S1178	auguaaccAfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1178	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.17	0.49	0.81	
D1179	S1179	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1179	aUfggaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.22	0.65	0.73	
D1180	S1180	AfuguAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1180	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.6	1.09	0.8	
D1181	S1181	auGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1181	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.3	0.78	0.78	
D1182	S1182	auguaaccaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1182	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.35	0.73	0.84	
D1183	S1183	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1183	aUfggaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.19	0.6	0.94	
D1184	S1184	auGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1184	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.61	1.08	0.8	
D1185	S1185	auGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1185	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.16	0.52	0.72	
D1186	S1186	auguaaccaagaGfuUfUfCfasUf	AS1186	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.2	0.53	0.74	
D1187	S1187	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1187	aUfggaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.34	0.66	0.85	
D1188	S1188	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1188	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.61	0.98	1.02	
D1189	S1189	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1189	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.3	0.73	0.85	
D1190	S1190	auguaaccaagaguauccasu	AS1190	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.28	0.69	0.78	
D1191	S1191	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1191	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.33	0.88	0.64	
D1192	S1192	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1192	aUfggaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.31	0.64	0.83	
D1193	S1193	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1193	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.64	0.82	0.92	
D1194	S1194	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1194	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.21	0.62	0.77	
D1195	S1195	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1195	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.17	0.7	0.95	
D1196	S1196	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1196	aUfggaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.19	0.71	0.65	
D1197	S1197	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1197	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.64	0.82	0.93	
D1198	S1198	auguAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1198	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.19	0.65	0.72	
D1199	S1199	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1199	aUfggaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.15	0.52	0.64	
D1200	S1200	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1200	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.48	0.74	0.92	
D1201	S1201	auguAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1201	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.17	0.71	0.77	
D1202	S1202	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1202	augGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.43	0.69	0.85	
D1203	S1203	auguaaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1203	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.14	0.61	0.76	
D1204	S1204	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1204	adTdGdGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.16	0.56	0.89	
D1205	S1205	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1205	aUfgGfdAdAdTdAcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.13	0.57	0.9	
D1206	S1206	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1206	adTdGdGdAfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.29	0.73	0.89	
D1207	S1207	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1207	adTdGdGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.16	0.56	0.78	
D1208	S1208	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1208	aUfdGdGdAdAuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.22	0.67	0.89	
D1209	S1209	AfuguAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1209	aUfgGfaAfuAfcUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.14	0.55	0.78	
D1210	S1210	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1210	aUfgdGdAdAdTdfUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.14	0.5	0.84	
D1211	S1211	AfuGfuAfaCfaGfaGfuUfUfCfasUf	AS1211	aUfgGfadAdTdAdCUfCfUfUfgUfUfAfcAfcUfGfsa	0.14	0.59	0.72	

D1212	S1212	auguaaccaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1212	aUfgGfaAfuAfcUfcUfugdGudTadCadTsgsa	0.21	0.74	0.77	
D1213	S1213	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1213	adTdGdGdAAafuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.53	0.91	
D1214	S1214	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1214	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.71	0.87	
D1215	S1215	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1215	aUfgGdGdAdAuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.67	0.97	
D1216	S1216	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuUfcCfasUf	AS1216	aUfgGfaAfuacucuggUfuAfcAfusgsa	0.36	0.87	1.07	
D1217	S1217	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuUfcCfasUf	AS1217	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.37	0.73	1.03	
D1218	S1218	AfUfguAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcCfasUf	AS1218	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.23	0.42	0.84	
D1219	S1219	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuUfcCfasUf	AS1219	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.43	0.71	1.03	
D1220	S1220	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuUfcCfasUf	AS1220	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.37	0.63	0.99	
D1221	S1221	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuUfcCfasUf	AS1221	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.29	0.84	0.88	
D1222	S1222	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuUfcCfasUf	AS1222	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.31	0.8	0.99	
D1223	S1223	auGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcCfasUf	AS1223	aUfgGfaaUfaCfuUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.09	0.52	0.82	
D1224	S1224	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuUfcCfasUf	AS1224	aUfgGfaAfuadCudCudTgdGuuAfcAfusgsa	0.22	0.79	1	
D1225	S1225	auGfuAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcCfasUf	AS1225	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.31	0.76	0.84	
D1226	S1226	AfuGfuAfaCfaaagaguAfuUfcCfasUf	AS1226	aUfgGfaAfuadCufcdUfgdGuuAfcAfusgsa	0.26	0.64	0.87	
D1227	S1227	augUfaacCfaagAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1227	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.33	0.79	0.81	
D1228	S1228	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1228	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.464	0.932	0.978	
D1229	S1229	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1229	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.453	1.047	1.178	
D1230	S1230	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1230	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.831	0.967	1.151	
D1231	S1231	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1231	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.5	1.07	
D1232	S1232	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1232	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.54	1.1	
D1233	S1233	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1233	AfUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.61	0.74	
D1234	S1234	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1234	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAf	0.22	0.61	0.98	
D1235	S1235	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1235	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAf	0.27	0.69	0.92	
D1236	S1236	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1236	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAf	0.54	1.08	0.8	
D1237	S1237	augUfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1237	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.29	0.61	0.79	
D1238	S1238	AfugUfaAfaCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1238	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.31	0.6	0.88	
D1239	S1239	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1239	dAUdGGdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.2	0.67	0.85	
D1240	S1240	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1240	dAUdGGdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.23	0.58	0.68	
D1241	S1241	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1241	dAUdGGdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.25	0.65	0.78	
D1242	S1242	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1242	dAUdGGdAadTafUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.64	0.84	
D1243	S1243	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1243	dAUdGGdAAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.72	0.87	
D1244	S1244	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1244	dAUdGGdAadTafUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.55	0.8	
D1245	S1245	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1245	dAUdGGdAAuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.22	0.51	0.9	
D1246	S1246	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1246	dAUdGGdAadTafUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.27	0.78	0.66	
D1247	S1247	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1247	dAdTdGcGaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.57	0.97	
D1248	S1248	AfaCaFuguUfcUfuGfdCudCudAudAsa	AS1248	dTUDadAgdAGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.09	0.36	0.0047
D1249	S1249	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1249	UfUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.10	0.47	0.005
D1250	S1250	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1250	uUfaaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.55	0.005
D1251	S1251	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1251	uUfaaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.49	0.006
D1252	S1252	cAGuGuucuuGcucuAuAdTdT	AS1252	UuAuAGAGcAAGAcACUGdTdT				0.006
D1253	S1253	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1253	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.12	0.43	0.006
D1254	S1254	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1254	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.39	0.006
D1255	S1255	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1255	UfUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.48	0.007
D1256	S1256	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1256	UfUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.14	0.40	0.007
D1257	S1257	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1257	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.12	0.40	0.007
D1258	S1258	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1258	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.13	0.41	0.007
D1259	S1259	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1259	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.11	0.35	0.008
D1260	S1260	AfaCaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1260	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.40	0.008
D1261	S1261	AfaCaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1261	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.42	0.008
D1262	S1262	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1262	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.37	0.008
D1263	S1263	cAGuGuucuuGcucuAuAdTdT	AS1263	UuAuAGAGcAAGAcACUGdTdT				0.008
D1264	S1264	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1264	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.12	0.50	0.008
D1265	S1265	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1265	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.12	0.13	0.48	0.009

D1266	S1266	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1266	uFuaaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.51	0.009
D1267	S1267	AfacaFugUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1267	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.48	0.0088
D1268	S1268	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1268	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.09	0.35	0.009
D1269	S1269	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1269	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.009
D1270	S1270	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1270	uFuaUfagaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.49	0.009
D1271	S1271	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1271	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.10	0.36	0.009
D1272	S1272	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1272	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.009
D1273	S1273	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1273	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.51	0.009
D1274	S1274	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1274	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.46	0.010
D1275	S1275	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1275	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.010
D1276	S1276	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1276	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.47	0.010
D1277	S1277	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1277	uFuaUfagaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.50	0.010
D1278	S1278	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1278	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.43	0.010
D1279	S1279	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1279	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.010
D1280	S1280	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1280	UfuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.45	0.010
D1281	S1281	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1281	UfuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.46	0.011
D1282	S1282	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1282	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.55	0.011
D1283	S1283	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1283	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.12	0.45	0.011
D1284	S1284	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1284	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.48	0.011
D1285	S1285	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1285	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.11	0.40	0.011
D1286	S1286	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1286	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.16	0.47	0.011
D1287	S1287	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1287	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.19	0.46	0.012
D1288	S1288	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1288	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.17	0.46	0.012
D1289	S1289	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1289	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.09	0.31	0.012
D1290	S1290	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1290	UfuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.16	0.49	0.013
D1291	S1291	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1291	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.11	0.32	0.013
D1292	S1292	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1292	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.44	0.013
D1293	S1293	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1293	UfuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.39	0.013
D1294	S1294	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1294	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.41	0.014
D1295	S1295	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1295	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.47	0.014
D1296	S1296	adAdCagdTdGuudCdTugdCdTcuadAdTasa	AS1296	dTdTaudAdGagCdAagdAdAcadCdTgudTsdTsu	0.12	0.21	0.68	0.0146
D1297	S1297	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1297	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.15	0.50	0.016
D1298	S1298	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1298	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.50	0.016
D1299	S1299	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1299	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.50	0.018
D1300	S1300	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1300	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.43	0.020
D1301	S1301	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1301	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.45	0.021
D1302	S1302	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1302	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.49	0.021
D1303	S1303	AfAfCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1303	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.24	0.51	0.022
D1304	S1304	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1304	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.27	0.47	0.033
D1305	S1305	aadCdAgudGdTucdTdTgcdTdcuadTdAsa	AS1305	udTadTdAgadGdCaadGdAacdAdCugdTdTsusu	0.19	0.36	0.86	0.045
D1306	S1306	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1306	dTudAudAgfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.22	0.61	
D1307	S1307	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1307	dTudAudAgfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.39	0.84	
D1308	S1308	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1308	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.13	0.48	
D1309	S1309	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1309	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.13	0.58	
D1310	S1310	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1310	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.55	
D1311	S1311	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1311	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.30	0.66	
D1312	S1312	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1312	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.13	0.48	
D1313	S1313	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1313	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.38	0.74	
D1314	S1314	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1314	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.19	0.54	
D1315	S1315	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1315	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.55	
D1316	S1316	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1316	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.53	
D1317	S1317	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1317	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.55	
D1318	S1318	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1318	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.32	0.61	
D1319	S1319	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1319	uFuaUfaGfaGfcAfaGfaAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.16	0.53	

D1320	S1320	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1320	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.08	0.16	0.61	
D1321	S1321	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1321	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.58	
D1322	S1322	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1322	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.15	0.49	0.84	
D1323	S1323	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1323	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.20	0.62	
D1324	S1324	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1324	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.08	0.25	0.78	
D1325	S1325	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1325	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.08	0.18	0.80	
D1326	S1326	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1326	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.21	0.66	
D1327	S1327	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1327	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.31	0.70	
D1328	S1328	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1328	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.07	0.15	0.55	
D1329	S1329	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1329	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.71	
D1330	S1330	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1330	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.27	0.76	
D1331	S1331	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1331	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.21	0.65	
D1332	S1332	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1332	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.07	0.17	0.53	
D1333	S1333	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1333	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.25	0.73	
D1334	S1334	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1334	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.54	
D1335	S1335	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1335	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.14	0.38	0.57	
D1336	S1336	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1336	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.50	0.96	
D1337	S1337	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1337	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.54	
D1338	S1338	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1338	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.08	0.20	0.69	
D1339	S1339	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1339	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.55	
D1340	S1340	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1340	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.57	
D1341	S1341	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1341	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.08	0.22	0.63	
D1342	S1342	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1342	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.21	0.56	0.86	
D1343	S1343	AfacagfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1343	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.37	0.73	
D1344	S1344	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1344	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.20	0.66	
D1345	S1345	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1345	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.12	0.34	0.73	
D1346	S1346	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1346	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.42	0.90	
D1347	S1347	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1347	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.17	0.43	0.85	
D1348	S1348	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1348	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.21	0.58	
D1349	S1349	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1349	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.21	0.39	0.88	
D1350	S1350	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1350	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.52	
D1351	S1351	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1351	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.21	0.58	
D1352	S1352	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1352	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.18	0.49	0.84	
D1353	S1353	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1353	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.25	0.68	
D1354	S1354	AfacagfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1354	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.52	
D1355	S1355	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1355	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.26	0.63	
D1356	S1356	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1356	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.33	0.79	
D1357	S1357	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1357	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.09	0.19	0.51	
D1358	S1358	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1358	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.22	0.48	0.71	
D1359	S1359	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1359	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.10	0.17	0.61	
D1360	S1360	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1360	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.40	0.87	
D1361	S1361	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1361	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.52	
D1362	S1362	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1362	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.28	0.81	
D1363	S1363	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1363	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.16	0.68	
D1364	S1364	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1364	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.26	0.67	
D1365	S1365	aacaguguuucugcuuaasaa	AS1365	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.20	0.59	0.95	
D1366	S1366	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1366	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.53	
D1367	S1367	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1367	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.08	0.16	0.53	
D1368	S1368	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1368	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.54	
D1369	S1369	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1369	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.23	0.56	0.89	
D1370	S1370	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1370	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.55	
D1371	S1371	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1371	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.58	
D1372	S1372	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1372	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.15	0.56	
D1373	S1373	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1373	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.21	0.51	0.89	

D1374	S1374	AfacaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1374	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.21	0.64	
D1375	S1375	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1375	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.15	0.40	0.94	
D1376	S1376	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1376	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.13	0.40	0.96	
D1377	S1377	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1377	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.17	0.64	
D1378	S1378	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1378	uuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.18	0.50	0.97	
D1379	S1379	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1379	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.24	0.79	
D1380	S1380	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1380	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.07	0.14	0.58	
D1381	S1381	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1381	uuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.11	0.34	0.96	
D1382	S1382	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1382	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.18	0.69	
D1383	S1383	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1383	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.14	0.38	0.85	
D1384	S1384	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1384	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUf	0.07	0.16	0.54	
D1385	S1385	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1385	uuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.20	0.75	
D1386	S1386	aacaguguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1386	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.25	0.56	0.90	
D1387	S1387	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1387	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.19	0.70	
D1388	S1388	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1388	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.14	0.60	
D1389	S1389	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1389	uuUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.19	0.62	
D1390	S1390	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1390	uuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.27	0.76	
D1391	S1391	aacaguguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1391	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.18	0.36	0.81	
D1392	S1392	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1392	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.07	0.17	0.55	
D1393	S1393	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1393	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.07	0.15	0.57	
D1394	S1394	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1394	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.26	0.68	1.06	
D1395	S1395	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1395	uuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.06	0.18	0.58	
D1396	S1396	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1396	uuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUf	0.09	0.27	0.73	
D1397	S1397	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1397	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.20	0.51	0.73	
D1398	S1398	AfacaGfuguUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1398	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.13	0.34	0.86	
D1399	S1399	dAacAdGugUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1399	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.24	0.42	0.82	
D1400	S1400	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1400	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.49	0.85	0.78	
D1401	S1401	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1401	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.67	0.83	0.85	
D1402	S1402	aaCfAgfuGfuUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1402	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.18	0.47	0.80	
D1403	S1403	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1403	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.73	0.89	0.77	
D1404	S1404	aacAgugUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1404	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.12	0.39	0.79	
D1405	S1405	AaCaGuguUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1405	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.12	0.37	0.77	
D1406	S1406	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1406	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.59	0.93	0.89	
D1407	S1407	aACagUguUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1407	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.09	0.16	0.55	
D1408	S1408	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1408	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.22	0.64	0.86	
D1409	S1409	aaCaguGfuUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1409	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.13	0.31	0.76	
D1410	S1410	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1410	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.77	0.94	0.93	
D1411	S1411	aacAfugUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1411	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.23	0.53	1.04	
D1412	S1412	aacdAgugUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1412	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.30	0.64	0.90	
D1413	S1413	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1413	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.09	0.19	0.63	
D1414	S1414	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1414	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.11	0.28	0.66	
D1415	S1415	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1415	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.06	0.13	0.53	
D1416	S1416	aacaguguUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1416	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.20	0.53	0.99	
D1417	S1417	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1417	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.07	0.17	0.53	
D1418	S1418	aAfCfagUfcUfcUfcUfaUfasAf	AS1418	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUfsu	0.08	0.20	0.70	
D1419	S1419	AfaCfAgfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1419	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfufusUf	0.08	0.20	0.70	

Пример 3. Активность сайленсинга *in vitro* с различными химическими модификациями на ТТР миРНК.

IC₅₀ для каждой модифицированной миРНК определяют на клетках Нер3В стандартной обратимой трансфекцией с использованием липофектамина RNAiMAX. Коротко, обратимую трансфекцию осуществляют, добавляя 5 мкл Орті-МЕМ к 5 мкл миРНК-дуплекса на лунку в 96-луночном планшете вместе с 10 мкл Орті-МЕМ плюс 0,5 мкл липофектамина RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad, CA, кат. № 13778-150) и инкубируя при комнатной температуре в течение 15-20 мин. Затем после инкубации в каждую лунку добавляют 100 мкл полной среды для выращивания без антибиотиков, содержащей 12000-15000 клеток Нер3В. Клетки инкубируют в течение 24 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, затем анализируют и анализируют АроВ и GAPDH мРНК с помощью bDNA (Quantigene). Анализируют семь различных концентраций миРНК, колеблющихся от 10 нМ до 0,6 пМ, для определения IC₅₀, и АроВ/GAPDH для АроВ-трансфицированных клеток нормализуют к клеткам, трансфицированным 10 нМ миРНК Luc.

Аббревиатура	Нуклеотид (ы)
Af	2' - F-аденозин
Cf	2' - F-цитидин
Gf	2' - F-гуанозин
Uf	2' - F-уридин
A	аденозин
C	цитидин
G	гуанозин
U	уридин
a	2' - O-метиладенозин
c	2' - O-метилцитидин
g	2' - O-метилгуанозин
u	2' - O-метилуридин
dT	2' - дезокситимидин
s	фосфоротиоатная связь

Таблица 2

Модифицированный дуплекс ANGPTL3

Дуплекс ID	Смысловая ID	Последовательность SS	AS ID	Последовательность AS	RNAimax, Hep3b		
					10нМ	0.1 нМ	0.025 нМ
D2000	S2000	UfcAfcAfaUfuAfaFgfcUfcCfuUfuUf	A2000	aAfaGfaAfgGfaGfcuuAfaUfuGfuGfasAfc	0.036	0.274	0.233
D2001	S2001	UfuAfuUfgUfuCfcUfuUfaGfuUfaUfuUf	A2001	aAfaUfaAfcUfaGfaggAfaCfaAfaAfsa	0.044	0.278	0.247
D2002	S2002	GfcUfaUfgUfuAfgAfcGfaUfgUfaAfaAf	A2002	uUfuUfaCfaUfcGfucuAfaCfaUfaGfcsAfsa	0.062	0.474	0.449
D2003	S2003	GfgAfcAfuGfgUfcUfuAfaAfgAfcUfuUf	A2003	aAfaGfuCfuUfuAfaGfcAfcUfuCfcsCfsa	0.303	1.042	0.912
D2004	S2004	CfaAfaAfaCfuCfAfcAfuAfuUfuGfaUf	A2004	aUfcAfaAfuAfuGfuugAfgUfuUfuUfgsAfsa	0.102	0.623	0.499
D2005	S2005	AfcCfaGfuGfaAfaUfcAfaAfgAfaGfaAf	A2005	uUfcUfuCfuUfuGfauuUfcAfcUfgGfusUfsu	0.124	0.901	0.756
D2006	S2006	CfaCfaAfuUfaAfgAfcUfcUfuCfuUfuUf	A2006	aAfaAfgAfaGfgAfgcuUfaAfuUfgUfgsAfsa	0.069	0.269	0.244
D2007	S2007	CfuAfuGfuUfaGfAfcUfuGfuAfaAfaAf	A2007	uUfuUfuAfcAfuCfugucUfaAfcAfuAfgsCfsa	0.052	0.622	0.589
D2008	S2008	UfcAfaCfaUfaUfuUfgAfuCfaGfuCfuUf	A2008	aAfgAfcUfgAfuCfaaaUfaUfgUfuGfasGfsu	0.133	0.798	0.785
D2009	S2009	AfaCfuGfaGfaAfgAfcUfuAfaAfuAfuAf	A2009	uAfuAfuGfuAfgUfucuUfcUfcAfgUfusCfsc	0.097	0.671	0.528
D2010	S2010	AfcAfaUfuAfaGfcUfcUfuUfuUf	A2010	aAfaAfaGfaAfgGfagcUfuAfaUfuGfusGfsa	0.145	0.308	0.293
D2011	S2011	CfuCfcAfgAfcCfcAfaAfaUfcAfaGfaUf	A2011	aUfcUfuGfaUfuUfuggCfuCfuGfgAfgsAfsu	0.122	0.882	0.938
D2012	S2012	CfgAfuGfuAfaAfaUfuUfaGfcCfaAf	A2012	uUfgGfcUfaAfaAfuuuUfuAfcAfuCfcsUfsc	0.102	0.843	0.733
D2013	S2013	GfuCfuUfaAfaGfAfcUfuGfuCfcAfuAf	A2013	uAfuGfgAfcAfaAfgucUfuUfaAfgAfcCfsa	1.133	1.105	1.022
D2014	S2014	CfaAfcAfuAfuUfuGfaUfcAfgUfcUfuUf	A2014	aAfaGfaCfuGfaUfcaAfuAfuGfuUfgsAfsa	0.077	0.413	0.450
D2015	S2015	AfcUfgAfgAfaGfAfcUfaCfaUfaUfaAf	A2015	uUfaUfaUfgUfaGfuucUfuCfuCfaGfusUfsc	0.055	0.293	0.364
D2016	S2016	CfcAfgAfcCfcAfaUfcAfaGfaUfuUf	A2016	aAfaUfcUfuGfaUfuuuGfgCfuCfuGfcsAfsa	0.080	0.650	0.499
D2017	S2017	GfaUfgUfaAfaAfaUfuUfuAfgCfcAfaUf	A2017	aUfuGfgCfuAfaAfauuUfuUfaCfaUfcsGfsu	0.076	0.605	0.579
D2018	S2018	UfcUfuAfaAfgAfcUfuUfgUfcCfaUfaAf	A2018	uUfaUfgGfaCfaAfaAfuCfuUfuAfaGfasCfsc	1.326	1.098	0.927
D2019	S2019	AfaCfaUfaUfuUfgAfuCfaGfuCfuUfuUf	A2019	aAfaAfgAfcUfgAfucaAfaUfaUfgUfusGfsa	0.047	0.560	0.477
D2020	S2020	CfuGfaGfaAfaAfcUfuAfaAfuAfaAf	A2020	uUfuAfuAfuGfuAfguuCfuUfcUfcAfgsUfsu	0.066	0.690	0.681
D2021	S2021	AfaUfuAfaGfcUfcCfuUfuUfuUfaUf	A2021	aUfaAfaAfaGfaAfggaGfcUfuAfaUfusGfsu	0.041	0.611	0.251
D2022	S2022	AfaAfuCfaAfgAfuUfuGfcUfaUfgUfuAf	A2022	uAfaCfaUfaGfcAfaauCfuUfgAfuUfusUfsg	0.053	0.555	0.516
D2023	S2023	UfuCfaGfuUfgGfAfcAfuGfgUfcUfuAf	A2023	uAfaGfaCfcAfuGfuuccAfaAfcUfgAfasGfsg	0.779	1.045	0.963

D2024	S2024	GfgGfcCfaAfaUfUfAfaUfgAfcAfuAfuUf	A2024	aAfuAfuGfuCfaUfuuaUfuUfgGfcCfcsUfsu	1.487	0.949	0.883
D2025	S2025	AfcAfuAfuUfuGfAfuUfcAfgUfcUfuUfuUf	A2025	aAfaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusUfsg	0.043	0.432	0.477
D2026	S2026	AfgAfaCfuAfcUfUfAfuAfaAfcUfaCfaAf	A2026	uUfgUfaGfuUfuAfuuaGfuAfgUfuCfusUfsc	0.324	1.042	0.905
D2027	S2027	AfuUfaAfgCfuCfcUfuCfuUfuUfuAfuUf	A2027	aAfuAfaAfaAfgAfggAfgCfuUfaAfuUfsg	0.042	0.283	0.224
D2028	S2028	UfgAfuUfuGfUfAfuUfcAfgUfuAfgAfcGfaUf	A2028	aUfcGfuCfuAfaCfaaGfcAfaAfuCfusUfsg	0.349	0.936	0.896
D2029	S2029	UfaAfgUfuGfgGfAfcAfuUfgGfuCfuUfaAf	A2029	uUfaAfgAfcCfaUfgucCfcAfaCfuGfasAfsG	0.914	0.907	0.944
D2030	S2030	GfgCfcAfaAfuUfAfuAfuGfaCfaUfaUfuUf	A2030	aAfaUfaUfgUfcAfuuaAfuUfuGfgCfcsCfsu	0.047	0.353	0.326
D2031	S2031	CfaUfaUfuUfgAfuUfcAfuCfuUfuUfuUf	A2031	uAfaAfaAfgAfcUfgauCfaAfaUfaUfsgUfsu	0.110	0.867	0.842
D2032	S2032	UfaCfaUfaUfaAfaAfcUfaAfcAfaGfuCfaAf	A2032	uUfgAfcUfuGfuAfguuUfaUfaUfgUfasGfsu	0.200	0.699	0.656
D2033	S2033	UfuUfuAfuUfgUfUfcUfcUfcUfaGfuUfaUf	A2033	aUfaAfcUfaGfaGfgaaCfaAfaAfaAfsAfsG	0.050	0.218	0.192
D2034	S2034	UfuGfcUfaUfgUfUfAfgAfcGfaUfgUfaAf	A2034	uUfaCfaUfcGfuCfuuaCfaUfaGfcAfasAfsu	0.096	0.792	0.640
D2035	S2035	CfuGfuUfgUfgAfcAfcUfaGfgUfcUfuAfaAf	A2035	uUfuAfaGfaCfcAfcUfcCfaAfcUfgsAfsa	0.127	0.936	0.890
D2036	S2036	AfaAfuGfuCfuUfUfUfuAfuUfcAfaAf	A2036	uUfuGfaAfaUfaUfgucAfuUfaAfuUfusGfsG	0.061	0.683	0.668
D2037	S2037	GfaUfcAfgUfcUfUfUfuUfaUfgAfuCfuAf	A2037	uAfgAfuCfaUfaAfaaaGfaCfuGfaUfcsAfsa	0.157	1.010	0.723
D2038	S2038	AfcAfuAfuAfaAfcUfaCfaAfgUfcAfaAf	A2038	uUfuGfaCfuUfgUfaguUfuAfuAfuGfusAfsG	0.047	0.532	0.525
D2039	S2039	UfuUfaUfuGfuUfcUfcUfcUfaAfgUfuAfuUf	A2039	aAfuAfaCfuAfgAfgaaAfcAfaUfaAfasAfsa	0.031	0.505	0.238
D2040	S2040	UfgCfuAfuGfuUfAfaCfaAfuGfuAfaAf	A2040	uUfuAfcAfuCfuUfcuaAfcAfuAfgCfasAfsa	0.056	0.484	0.408
D2041	S2041	GfgGfaCfaUfgUfUfcUfaAfaGfaCfuUf	A2041	aAfgUfcUfuUfaAfgaaCfaUfgUfcCfcsAfsa	0.570	0.999	0.994
D2042	S2042	UfgAfcUfuUfuUfUfUfaAfaCfuCfaAf	A2042	uUfgAfgUfuUfuUfgaaAfuAfuGfuCfasUfsu	0.065	0.870	0.728
D2043	S2043	AfuCfaGfuCfuUfUfUfuAfuGfaUfcUfaUf	A2043	aUfaGfaUfcAfuAfaaaAfgAfcUfgAfuCfsa	0.048	0.362	0.282
D2044	S2044	CfaUfaUfaAfaCfuAfcAfaGfuCfaAfaAf	A2044	uUfuUfgAfcUfuGfuagUfuUfaUfaUfsgUfsa	0.314	0.904	0.937
D2045	S2045	CfuUfgAfaCfuCfaAfcUfcAfaAfaCfuUf	A2045	aAfgUfuUfuGfaGfuugAfgUfuCfaAfgsUfsg	0.060	0.295	0.251
D2046	S2046	CfuAfcUfuCfaAfcAfaAfaAfgUfgAfaAf	A2046	uUfuCfaCfuUfuUfuguUfgAfaGfuAfgsAfsa	0.052	0.570	0.599
D2047	S2047	AfaGfaGfcAfaCfuAfaCfuAfaCfuUfaAf	A2047	uUfaAfgUfuAfgUfuagUfuGfcUfcUfusCfsu	0.028	0.369	0.381
D2048	S2048	AfaAfcAfaAfuAfaAfuAfgCfaUfcAfaAf	A2048	uUfuGfaUfgCfuAfuuaUfcUfuGfuUfusUfsu	0.039	0.227	0.204
D2049	S2049	GfaAfuAfgUfcAfaAfuAfaGfaAfaUf	A2049	aUfuUfcUfuUfuAfuuuGfaCfuAfuGfcsUfsg	0.032	0.437	0.422
D2050	S2050	AfuAfuAfaAfcUfAfaAfgUfcAfaAfaAf	A2050	uUfuUfuGfaCfuUfguaGfuUfuAfuAfusGfsu	0.297	0.946	0.850
D2051	S2051	GfaAfcUfcAfaCfuUfcAfaAfcUfuGfaAf	A2051	uUfcAfaGfuUfuUfgagUfuGfaGfuUfcsAfsa	0.179	0.929	0.884
D2052	S2052	UfaCfuUfcAfaCfaAfaAfaGfuGfaAfaUf	A2052	aUfuUfcAfcUfuUfuugUfuGfaAfgUfasGfsa	0.091	0.536	0.524
D2053	S2053	AfgAfgCfaAfcUfAfaAfaAfcUfuAfaUf	A2053	aUfuAfaGfuUfaGfuuaGfuUfgCfuCfusUfsc	0.086	0.611	0.621
D2054	S2054	GfaUfaAfuAfgCfaAfuAfaAfcCfuUf	A2054	aAfgGfuCfuUfuGfaugCfuAfuUfaUfcsUfsu	0.058	0.676	0.591
D2055	S2055	CfaUfaGfuCfaAfaAfuAfaAfgAfaAfuAf	A2055	uAfuUfuCfuUfuUfaauUfgAfcUfaUfsgCfsu	0.048	0.630	0.674
D2056	S2056	UfaUfaAfaCfuAfcAfaGfuCfaAfaAfaUf	A2056	aUfuUfuUfgAfcUfuguUfgUfuUfaUfasUfsg	0.072	0.534	0.459
D2057	S2057	AfaCfuCfaAfcUfcAfaAfaCfuUfgAfaAf	A2057	uUfuCfaAfgUfuUfgaGfuUfgAfgUfusCfsa	0.161	0.864	0.775
D2058	S2058	AfcUfuCfaAfcUfAfaAfaAfgUfgAfaAfuAf	A2058	uAfuUfuCfaCfuUfuuaGfuUfgAfaGfusAfsG	0.198	0.969	0.865
D2059	S2059	GfaGfcAfaCfuAfaAfcUfaCfuUfaAfuUf	A2059	aAfuUfaAfgUfuAfguuAfgUfuGfcUfcsUfsu	0.031	0.253	0.210
D2060	S2060	AfaCfcAfaCfaGfCfaAfuUfgUfcAfaAfuAf	A2060	uAfuUfuGfaCfuAfuugCfuUfuGfgUfusUfsa	0.035	0.561	0.569
D2061	S2061	AfgUfcAfaAfuAfaAfaGfaAfaUfaGfaAf	A2061	uUfcUfaUfuUfcUfuuuAfuUfuGfaCfusAfsu	0.057	0.668	0.386
D2062	S2062	AfgUfcAfaAfaAfuUfgAfgAfgGfuAfaAf	A2062	uUfuAfcCfuCfuUfcuuUfuUfuGfaCfusUfsg	0.720	1.017	0.924
D2063	S2063	CfuUfgAfaAfgCfcUfcCfuAfgAfaGfaAf	A2063	uUfcUfuCfuAfgGfaggCfuUfuCfaAfgsUfsu	0.324	1.020	0.963
D2064	S2064	CfuUfcAfaCfaAfaAfaGfuGfaAfaUfaUf	A2064	aUfaUfuUfcAfcUfuuuUfgUfuGfaAfgsUfsa	0.048	0.549	0.531
D2065	S2065	CfaAfcUfaAfcUfAfaAfaAfuUfuCfaAf	A2065	uUfgAfaUfuAfaGfuuaGfuUfaGfuUfsgCfsu	0.046	0.739	0.649
D2066	S2066	AfcCfaAfcAfgCfaUfaGfuCfaAfaUfaAf	A2066	uUfaUfuUfgAfcUfaugCfuGfuUfgGfusUfsu	0.076	0.840	0.777
D2067	S2067	GfaAfcCfcAfcAfgAfaAfuUfuCfuCfuAf	A2067	uAfgAfgAfaAfuUfucuGfuGfgGfuUfcsUfsu	0.103	0.916	0.808
D2068	S2068	GfaAfuAfuGfuCfaAfcUfuAfaCfuCfaAf	A2068	uUfgAfgUfuCfaAfgugAfcAfuAfuUfcsUfsu	0.046	0.532	0.520
D2069	S2069	UfgAfaAfgCfcUfcCfuAfgAfaGfaAfaAf	A2069	uUfuUfcUfuCfuAfggaGfgCfuUfuCfasAfsG	0.067	0.894	0.822
D2070	S2070	UfuCfaAfcAfaAfaAfgUfgAfaAfuUf	A2070	aAfuAfuUfuCfaCfuuuUfuGfuUfgAfasGfsu	0.052	0.557	0.395
D2071	S2071	AfaCfuAfaCfuAfaAfcUfuAfuUfcAfaAf	A2071	uUfuGfaAfuUfaAfguuAfgUfuAfgUfusGfsc	0.025	0.220	0.232
D2072	S2072	CfcAfaCfaGfcAfuUfgUfcAfaAfaAfaAf	A2072	uUfuAfuUfuGfaCfuuaGfcUfgUfuGfsgUfsu	0.293	0.923	0.899
D2073	S2073	AfaCfcCfaCfaGfAfaAfuUfuUfcUfuUf	A2073	aUfaGfaGfaAfaUfuucUfgUfgGfgUfusCfsu	0.021	0.375	0.356
D2074	S2074	UfgUfcAfcUfuGfAfaAfcUfaAfaCfuCfaAf	A2074	uUfgAfgUfuGfaGfuucAfaGfuGfaCfasUfsa	0.052	0.402	0.513
D2075	S2075	GfaAfaGfcCfuCfcUfaGfaAfgAfaAfaAf	A2075	uUfuUfuCfuUfcUfaggAfgGfcUfuUfcsAfsa	0.171	0.904	0.893
D2076	S2076	AfaUfaUfuUfaGfAfaAfgCfaAfcUfaAf	A2076	uUfaGfuUfgCfuCfuucUfaAfaUfaUfusUfsc	0.142	0.614	0.688
D2077	S2077	AfcUfaAfcUfaAfcUfuAfuUfuCfaAfaAf	A2077	uUfuUfgAfaUfuAfgauUfaGfuUfaGfusUfsg	0.020	0.312	0.316

D2078	S2078	CfaAfcAfgCfaUfAfGfUfCfaAfaUfaAfaAf	A2078	uUfuUfaUfuUfgAfcuaUfgCfuGfuUfGfsGfsu	0.026	0.313	0.393
D2079	S2079	CfcAfcAfgAfaAfUfUfuCfuCfuAfuCfuUf	A2079	aAfgAfuAfgAfgAfaauUfuCfuGfuGfGfsGfsu	0.012	0.596	0.345
D2080	S2080	GfuCfaCfuUfgAfAfCfuCfaAfcUfaAfaAf	A2080	uUfuGfaGfuUfgAfguuCfaAfgUfgAfcAfsu	0.054	0.503	0.456
D2081	S2081	CfuCfcUfaAfgAfGfAfaAfaAfaUfuCfuUf	A2081	uAfgAfaUfuUfuUfucuUfuUfaGfgAfcGfsGfsc	0.050	0.596	0.531
D2082	S2082	AfuUfuAfgAfaGfAfGfCfaCfuAfaCfuAf	A2082	uAfgUfuAfgUfuGfcucUfuCfuAfaAfsuAfsu	0.064	0.806	0.928
D2083	S2083	CfuAfaCfuAfaCfUfUfaAfaUfaAfaAfaUf	A2083	aUfuUfuGfaAfuUfaagUfuAfgUfuAfgUfsu	0.056	0.844	0.761
D2084	S2084	CfaGfcAfuAfgUfCfAfaAfaAfaGfaAf	A2084	uUfcUfuUfuAfuUfugaCfuAfuGfcUfGfsUfsu	0.046	0.859	0.756
D2085	S2085	GfaAfaUfaAfgAfAfAfuGfuAfaAfaCfaUf	A2085	aUfgUfuUfuAfcAfuuuCfuUfaUfuUfcsAfsu	0.039	0.615	0.612
D2086	S2086	UfcAfcUfuGfaAfcUfaAfaCfuCfaAfaAf	A2086	uUfuUfgAfgUfuGfaguUfcAfaGfuGfasCfsa	0.057	0.724	0.663
D2087	S2087	UfcUfaCfuUfcAfAfCfaAfaAfaGfuGfaAf	A2087	uUfcAfcUfuUfuUfguuGfaAfgUfaGfasAfsu	0.732	1.028	0.915
D2088	S2088	UfuUfaGfaAfgAfGfCfaAfcUfaAfcUfaAf	A2088	uUfaGfuUfaGfuUfgcuCfuUfcUfaAfasUfsa	0.061	0.795	0.785
D2089	S2089	AfaAfaCfaAfgAfAfCfaUfaGfcAfuCfaAf	A2089	uUfgAfuGfcUfaUfuauCfuUfgUfuUfcsUfsc	0.330	1.017	0.865
D2090	S2090	AfgCfaCfaGfcAfAfCfaUfaAfaAfgAfaAf	A2090	uUfuCfuUfuUfaUfuuuAfcUfaUfgCfusGfsu	0.038	0.606	0.589
D2091	S2091	AfgAfcCfcAfcGfAfAfCfuUfcAfaGfuUf	A2091	aAfcUfuGfaGfaGfuugCfuGfgGfuCfusGfsa	0.301	0.850	0.753
D2092	S2092	AfgUfcCfaUfgGfAfCfaUfuAfaUfuCfaAf	A2092	uUfgAfaUfuAfaUfgucCfaUfgGfaCfusAfcsc	0.407	0.791	0.726
D2093	S2093	GfaUfgGfaUfaAfcUfaAfaCfuUfaAfaUf	A2093	aUfuGfaAfgUfuUfuguGfaUfcCfaUfcsUfsa	0.120	0.658	0.654
D2094	S2094	CfuAfgAfgAfaGfAfUfaUfaCfuCfaAfuAf	A2094	uAfuGfgAfgUfaUfaucUfuCfuAfcGfsGfsc	0.071	0.610	0.645
D2095	S2095	AfaAfgAfcAfaCfaAfaCfaUfuAfuAfuUf	A2095	aAfuAfuAfaUfgUfuugUfuGfuCfuUfcsCfsc	0.029	0.306	0.461
D2096	S2096	CfaUfuAfuAfuUfgAfaUfaUfuCfuUfuUf	A2096	aAfaAfgAfaUfaUfucaAfuAfaUfgUfsu	0.031	0.510	0.595
D2097	S2097	GfaCfaCfaGfcAfAfCfuCfaAfgUfuUf	A2097	aAfaCfuUfgAfgAfguuGfcUfgGfgUfcsUfsc	0.075	0.697	0.845
D2098	S2098	GfgAfuCfaCfaAfAfCfuUfuCfaAfuGfaAf	A2098	uUfcAfuUfgAfaGfuuuUfgUfgAfuCfcsAfsu	0.130	0.831	0.951
D2099	S2099	GfaAfgAfuAfuAfcUfcCfaUfaGfuGfaAf	A2099	uUfcAfcUfaUfgGfaguAfuAfuCfuUfcsUfsc	0.058	0.828	0.938
D2100	S2100	GfaCfaAfcAfaAfcUfaUfaUfuGfaAf	A2100	uUfcAfaUfaUfaUfuguUfuGfuUfgUfcsUfsu	0.026	0.564	0.856
D2101	S2101	GfgGfaAfaUfcAfCfGfaAfaCfcAfaCfuAf	A2101	uAfgUfuGfgUfuUfcguGfaUfuUfcCfcsAfsa	0.314	0.948	1.033
D2102	S2102	AfcCfcAfcGfAfcAfcUfcUfaAfuUfuUf	A2102	aAfaAfcUfuGfaGfaguUfgCfuGfgGfusCfsu	0.033	0.448	0.675
D2103	S2103	GfgAfcAfuAfuUfuUfaAfaCfaUfcGfaAf	A2103	uUfcGfaUfgUfuGfaauUfaAfuGfuCfcsAfsu	0.156	0.897	0.912
D2104	S2104	GfaUfcAfcAfaAfcUfaUfaUfgAfaAf	A2104	uUfuCfaUfuGfaAfguuUfuGfuGfaUfcsCfsa	0.056	0.619	0.769
D2105	S2105	AfcUfcCfaUfaGfUfgAfgCfaAfuCfuAf	A2105	uAfgAfuUfgCfuUfcacUfaUfgGfaGfusAfsu	0.100	0.823	0.925
D2106	S2106	AfcAfaCfaAfaCfaUfuAfuAfuUfgAfaUf	A2106	aUfuCfaAfuAfaUfaugUfuUfgUfuGfusCfsu	0.035	0.565	0.843
D2107	S2107	GfgAfaAfuCfaCfGfAfaAfcCfaAfcUfaUf	A2107	aUfaGfuUfgGfuUfucgUfgAfuUfuCfcsCfsa	0.076	0.701	0.890
D2108	S2108	CfcCfaGfaAfaCfuUfcUfaAfgUfuUfuUf	A2108	aAfaAfcUfuUfgAfgaaUfuGfcUfgGfGfsUfsc	0.057	0.626	0.884
D2109	S2109	GfaCfaUfuAfuUfUfcAfaAfuCfaAfaUf	A2109	aUfuCfaAfuGfuUfgaaUfuAfuUfgUfcsCfsa	0.160	0.873	1.012
D2110	S2110	AfaCfcUfgGfAfgAfAfaCfuAfaAfaUf	A2110	uAfuUfuGfuAfgUfucCfcCfaCfGfUfcsUfsc	0.101	0.881	0.981
D2111	S2111	CfaAfcAfaAfcUfUfaUfaUfuGfaAfuAf	A2111	uUfaGfaUfuGfcUfucaCfuAfuGfgAfcGfsUfsa	0.026	0.435	0.691
D2112	S2112	CfaAfcAfaAfcUfUfaUfaUfuGfaAfuAf	A2112	uAfuUfaAfaUfaUfaauGfuUfuGfuUfGfsUfsc	0.154	0.882	1.091
D2113	S2113	GfaAfaUfcAfcGfAfaAfaCfaCfuAfuAf	A2113	uAfuAfgUfuGfgUfuucGfuGfaUfuUfcsCfsc	0.045	0.764	1.004
D2114	S2114	CfuCfuCfaAfgUfUfuUfuUfaAfuGfuCfuAf	A2114	uAfgAfcAfuGfaAfaaaCfuUfgAfgAfcGfsUfsu	0.105	0.925	0.988
D2115	S2115	AfcAfuUfaAfuUfcAfaCfaUfcGfaAfuAf	A2115	uAfuUfcGfaUfgUfugaAfuUfaAfuGfusCfsc	0.114	0.919	0.905
D2116	S2116	GfgGfaGfaAfcUfAfCfaAfaUfaUfgGfuUf	A2116	aAfcCfaUfaUfaUfguaGfuUfcUfcCfcsAfcsc	0.234	1.023	0.951
D2117	S2117	UfcCfaUfaGfaGfAfAfgCfaAfuCfuAfaUf	A2117	aUfuAfgAfuUfgCfuucAfcUfaUfgGfasGfsu	0.033	0.566	0.778
D2118	S2118	AfaCfaAfaCfaUfUfaUfaUfuUfgAfaUfaUf	A2118	aUfaUfuCfaAfuAfuuaUfgUfuUfgUfcsGfsu	0.031	0.535	0.785
D2119	S2119	UfgGfcAfaUfgUfcCfCfaAfuGfcAfaUf	A2119	aUfuGfcAfuUfgGfggaCfaUfuGfcCfasGfsu	0.065	0.815	0.967
D2120	S2120	UfcAfgGfuAfgUfcCfaUfgGfaCfaUfuAf	A2120	uAfaUfgUfcCfaUfggaCfuAfcCfuGfasUfsa	0.223	0.825	0.924
D2121	S2121	UfuAfaUfuCfaAfcAfaCfaUfaUfaGfaUf	A2121	aUfcUfaUfuCfGafuguUfgAfaUfuAfasUfsg	0.083	0.781	0.915
D2122	S2122	GfgAfgAfaCfuAfcAfaAfuAfuGfgUfuUf	A2122	aAfaCfaAfuUfuguAfgUfuCfuCfcsCfsa	0.079	0.680	0.767
D2123	S2123	CfcAfuAfgUfgAfAfGfcAfaUfcUfaAfuUf	A2123	aAfuUfaGfaUfuGfcuuCfaCfuAfuGfGfsAfcsc	0.026	0.537	0.793
D2124	S2124	AfaAfaAfcAfuUfaUfaUfuGfaAfuAfuUf	A2124	aAfuAfuUfcAfaUfaaaAfuGfuUfuGfusUfsg	0.044	0.680	0.828
D2125	S2125	AfaUfgCfaAfuCfcCfGfGfaAfaAfcAfaAf	A2125	uUfuGfuUfuUfcCfGfgAfuUfgCfaUfcsGfsg	0.349	0.971	1.005
D2126	S2126	CfaGfgUfaGfuCfcAfaGfgAfcAfuUfaAf	A2126	uUfaAfuGfuCfcAfuuggAfcUfaCfcUfGfsAfsu	0.070	0.548	0.546
D2127	S2127	UfuCfaAfcAfuCfGfAfaUfaGfaUfgGfaUf	A2127	aUfcCfaUfcUfuUfcuAfuGfuUfgAfasUfsu	0.225	0.958	0.967
D2128	S2128	GfuUfgGfgCfcUfAfGfAfaAfgAfuAfuAf	A2128	uAfuAfuCfuUfcUfaGfgCfcCfaAfcCfsa	0.765	0.969	0.922
D2129	S2129	CfaUfaGfuGfaAfcGfAfaAfuCfuAfuUf	A2129	uAfaUfaAfgAfuUfguUfcAfaUfgGfsGfsa	0.028	0.583	0.777
D2130	S2130	AfaCfaUfuAfuUfUfgAfaUfaUfuCfuUf	A2130	aAfgAfaUfaUfaaaAfuAfaUfgUfcsUfsg	0.249	0.916	0.981
D2131	S2131	GfcAfaUfcCfcGfGfAfaAfaCfaAfaGfaUf	A2131	aUfcUfuUfgUfuUfuccGfgGfaUfuGfcsAfsu	0.435	1.002	1.019

D2132	S2132	GfgUfaGfuCfcAfUfGfgAfcAfuUfaAfuUf	A2132	aAfuUfaAfuGfuCfcAuGfgAfcUfaCfcsUfsg	0.427	0.988	0.918
D2133	S2133	AfuCfGfaUfaGfAfUfGfAfuUfcAfaAf	A2133	uUfuGfuGfaUfcCfauUfaUfuCfGfAfuGfsu	0.170	0.706	0.890
D2134	S2134	CfuUfaGfaGfAfGfAfuAfuUfcCfaUf	A2134	aUfgGfaGfuAfuAfuUfcUfaGfGsc	0.033	0.543	0.733
D2135	S2135	GfuUfgGfaAfgAfCfUfgGfaAfaGfaCfaAf	A2135	uUfgUfcUfuUfcCfaguCfuUfcCfaAfcUfsc	0.137	0.975	0.944
D2136	S2136	AfaAfuUfaUfaUfUfGfaAfuAfuUfcUfuUf	A2136	aAfaGfaAfuAfuUfcaaUfaUfaUfuGfsUfsu	0.114	0.882	0.940
D2137	S2137	CfaAfuCfcGfgAfUfCfaAfaAfgAfuUf	A2137	aAfuCfuUfuGfuUfuucCfGfgAfuUfGfsa	0.155	0.755	0.686
D2138	S2138	CfuAfcUfuGfgGfAfuAfcAfaAfgCfaAf	A2138	uUfgCfuUfuGfuGfaucCfcAfaGfuAfgsAfsa	0.196	0.825	0.658
D2139	S2139	AfaAfaCfcUfaAfaUfUfGfAfuAfuAfuUf	A2139	uAfuAfuUfuAfcCfauUfaGfgUfuGfusUfsu	0.133	0.704	0.671
D2140	S2140	AfuCfcAfuCfcAfaAfaGfaUfuCfaGfaAf	A2140	uUfcUfgAfaUfcUfguuGfgAfuGfgAfuCfsa	0.184	0.775	0.658
D2141	S2141	AfaCfuGfaGfgCfAfAfaUfuUfaAfaAfgAf	A2141	uCfuUfuUfaAfaUfuucCfcUfcAfgUfsc	0.076	0.682	0.777
D2142	S2142	AfgAfgUfaUfgUfGfUfaAfaAfuUfUfgUf	A2142	aCfaGfaUfuUfuUfacaCfaUfaCfuCfusGfsu	0.448	0.659	0.761
D2143	S2143	AfaAfuCfcGfgAfaAfaCfaAfaGfaUfuUf	A2143	aAfaUfcUfuUfgUfuuuCfcGfgAfuUfGfsc	0.097	0.844	0.924
D2144	S2144	UfaCfuUfgGfgAfuUfCfaAfaGfcAfaAf	A2144	uAfuGfcUfuUfgUfgauCfAfaAfgUfasGfsa	0.084	0.875	0.947
D2145	S2145	CfaAfcCfuAfaAfuUfGfgUfaAfaUfaUf	A2145	uUfaUfaUfuUfaCfauUfuAfgGfuUfGfsUfsu	0.104	0.811	0.814
D2146	S2146	UfuGfaAfuGfaAfcUfUfgAfgGfcAfaAfuUf	A2146	aAfuUfuGfcCfcCfaguUfcAfuUfcAfasAfg	0.046	0.549	0.680
D2147	S2147	AfcUfgAfgGfcAfaAfaUfuUfaAfaGfgAf	A2147	uCfcUfuUfuAfaAfuuuGfcCfuCfaGfusUfsc	0.079	0.890	1.005
D2148	S2148	GfaGfuAfuGfuGfUfaAfaAfuCfuGfuAf	A2148	uAfaAfgAfuUfuUfuucAfcAfuAfcUfscUfsg	0.497	0.676	0.783
D2149	S2149	AfcUfuGfgGfaUfCfAfaAfaAfgCfaAfaAf	A2149	uUfuUfgCfuUfuGfugaUfcCfaAfaGfusAfg	0.049	0.699	0.907
D2150	S2150	UfaGfgUfaAfaUfAfaAfaAfcAfaAfcCfaAf	A2150	uUfgGfuUfuGfuUfaaaUfuUfaCfaAfuUfsu	0.093	0.928	0.941
D2151	S2151	UfgAfaUfgGfgAfuUfGfgGfcAfaAfuUf	A2151	aAfaUfuUfgCfcUfcauUfuCfaUfuCfasAfsa	0.201	0.736	0.885
D2152	S2152	CfuGfaGfgCfaAfaUfuUfaAfaAfgGfcAf	A2152	uGfcCfuUfuUfaAfauuUfgCfcUfcAfgsUfsu	0.071	0.938	0.872
D2153	S2153	AfgUfaUfgUfgUfAfaAfaUfcUfgUfaAf	A2153	uUfaCfaGfaUfuUfuuaCfaCfaUfaCfusCfsu	0.504	0.816	0.689
D2154	S2154	GfaAfaAfcAfaAfgAfaUfuGfgUfgUfuUf	A2154	aAfaCfaCfaAfaAfuucUfuGfuUfuUfscCfsg	0.061	0.723	0.922
D2155	S2155	AfgUfgUfgGfaGfAfaAfaAfcCfaUfaAf	A2155	uUfaGfgUfuGfuUfuucCfaCfaCfusCfsa	0.071	0.689	0.869
D2156	S2156	GfuCfuCfaAfaUfUfGfgAfaGfgUfuAfuAf	A2156	uAfuAfaCfcUfuCfauUfuUfgAfgAfcUfsu	0.133	0.643	0.974
D2157	S2157	UfaAfuGfaAfuUfGfAfgGfcAfaAfuUfuAf	A2157	uAfaAfuUfuGfcCfuaGfuUfcAfuUfscAfsa	0.204	0.751	1.008
D2158	S2158	AfgAfgGfcAfaAfuUfuUfaAfaGfgCfaAf	A2158	uUfgCfuUfuUfuAfaUfuGfcCfuCfasGfsu	0.089	0.820	0.937
D2159	S2159	GfuAfuGfuGfuAfaAfaAfuCfuGfuAfuUf	A2159	aUfuAfcAfgAfuUfuuuAfcAfaAfcUfsc	0.535	0.697	0.788
D2160	S2160	AfaAfaCfaAfaGfAfUfuUfgGfuGfuUfuUf	A2160	aAfaAfcAfcCfaAfaucUfuUfgUfuUfscCfsc	0.297	0.954	1.004
D2161	S2161	GfuGfuGfgAfgAfaAfaCfaAfcCfuAfaAf	A2161	uUfuAfgGfuUfgUfuuuCfuCfaAfcUfsc	0.178	0.872	0.918
D2162	S2162	AfuGfgAfaGfgUfUfAfuAfuUfcUfaUfaAf	A2162	uUfaUfaGfaGfuAfuuaCfcUfuCfaAfuUfsu	0.026	0.489	0.890
D2163	S2163	AfaUfgAfaCfuGfAfgCfaAfaUfuUfaAf	A2163	uUfaAfaUfuUfgCfcucAfgUfuCfaUfscCfsa	0.111	0.789	0.859
D2164	S2164	GfaGfgCfaAfaUfUfAfaAfaAfgGfcAfaUf	A2164	aUfuGfcCfuUfuUfaaaUfuUfgCfcUfscAfg	0.241	0.956	0.869
D2165	S2165	UfaUfgUfgUfgUfAfaAfaUfcUfgUfaAfuUf	A2165	uAfuUfaCfaGfaUfuuuUfaCfaCfaUfasCfsu	0.571	0.762	0.931
D2166	S2166	AfaAfaAfgAfuUfUfGfgUfgUfuUfuCfuAf	A2166	uAfgAfaAfaCfaCfcauAfuCfuUfuGfusUfsu	0.106	0.981	0.924
D2167	S2167	UfgUfgGfaGfaAfaAfaAfcAfaCfcUfaAfuUf	A2167	aUfuUfaGfgUfuGfuuuUfcUfcCfaCfasCfsu	0.064	0.765	0.902
D2168	S2168	UfgGfaAfgGfuUfAfaAfaCfuCfuAfaAfuUf	A2168	uUfuAfuAfgAfgUfauaAfcCfuUfcCfasUfsu	0.029	0.675	0.859
D2169	S2169	AfuGfaAfcUfgAfgGfcAfaAfuUfuAfaAf	A2169	uUfuAfaAfuUfuGfccuAfaGfuUfcAfuUfsc	0.054	0.733	0.843
D2170	S2170	AfgGfcAfaAfuUfUfaAfaGfgCfaAfuUf	A2170	uAfuUfgCfcUfuUfuuaAfuUfuGfcCfusCfsa	0.075	0.754	0.881
D2171	S2171	AfaGfaUfuUfgGfUfgUfuUfcUfaCfuUf	A2171	aAfgUfaGfaAfaAfcacCfaAfaUfcUfscUfsg	0.303	1.065	0.977
D2172	S2172	AfaAfcAfaCfcUfAfaAfaUfgGfuAfaAfuUf	A2172	uAfuUfuAfcCfaUfuuaGfgUfuGfuUfsc	0.101	0.855	0.880
D2173	S2173	AfaAfaUfcUfaUfUfAfaAfaAfcCfaAf	A2173	uAfgAfaAfaCfaCfcauAfuCfuUfuGfusUfsa	0.107	0.961	0.960
D2174	S2174	UfgAfaCfuGfaGfgCfaAfaUfuUfaAfaAf	A2174	uUfuUfaAfaUfuUfgccUfcAfgUfuCfasUfsu	0.078	0.714	0.878
D2175	S2175	GfgCfaAfaUfuUfAfaAfaAfgGfcAfaUfaAf	A2175	uUfaUfuGfcCfuUfuuaAfaUfuUfgCfscUfsc	0.054	0.767	0.918
D2176	S2176	UfuUfuCfuAfcUfUfGfgGfaUfcAfaAfaAf	A2176	uUfuGfuGfaUfcCfcauAfgAfaAfasCfsa	0.915	1.030	0.916
D2177	S2177	AfaCfaAfcCfuAfaAfaGfgUfaAfaUfuUf	A2177	aUfaUfuUfaCfaAfuuuAfgGfuUfgUfscUfsu	0.042	0.260	0.448
D2178	S2178	UfaCfuCfuAfuAfaAfaUfcAfaCfcAfaAf	A2178	uUfuGfgUfuGfaUfuuuAfaAfgAfgUfasUfsa	0.063	0.897	0.869
D2179	S2179	GfaAfcUfgAfgGfcAfaAfaUfuUfaAfaAf	A2179	uUfuUfaAfaAfuUfugCfuCfaGfuUfscAfsu	0.178	0.858	0.869
D2180	S2180	CfaGfaGfuAfuGfUfgGfuAfaAfuCfuUf	A2180	aAfgAfuUfuUfuAfcacAfuAfcUfcUfGfsUfsg	0.436	0.677	0.813

Пример 4. Активность сайленсинга *in vitro* с различными химическими модификациями на ANGPTL3 миРНК.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки Hep3В (ATCC, Manassas, VA) выращивают почти до слияния при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в RPMI (ATCC) с добавлением 10% FBS, стрептомицина и глутамина (ATCC) и затем извлекают из чашки трипсинизацией. Трансфекцию выполняют, добавляя к 5 мкл миРНК-дуплексов на лунку в 96-луночном планшете 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл липофектамина RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad, CA, кат. № 13788-150), и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляют 80 мкл полной среды для выращивания без антибиотиков, содержащей ~2×10⁴ клеток Hep3В. Клетки инкубируют или 24 или 120 ч и затем очищают РНК. Эксперименты с однократной дозой выполняют при конечной концентрации дуплексов 10 и 0,1 нМ, и эксперименты по зависимости реакции от дозы выполняют с использованием конечной концентрации дуплексов 10, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 и 0,00001 нМ, если не указано иное.

Синтез кДНК с использованием высокопроизводительного набора для обратной транскрипции кДНК ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, кат. № 4368813).

К 10 мкл полной РНК добавляют основную смесь из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реак-

цию. Генерируют кДНК с использованием термоячейки Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, CA) через следующие стадии: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 с, 4°C выдержка.

ПЦР в реальном времени.

К основной смеси, содержащей 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan (Applied Biosystems, кат. № 4236317E), 0,5 мкл зонда ANGPTL TaqMan (Applied Biosystems, кат. № Hs00205581 ml) и 5 мкл основной смеси зонда Lightcycler 480 (Roche, кат. № 04887301001) на лунку в 50 384-луночных планшетах (Roche, кат. № 04887301001), добавляют 2 мкл кДНК. ПЦР в реальном времени проводят в системе для ПЦР в реальном времени ABI 7900HT (Applied Biosystems) с использованием анализа методом $\Delta\Delta C_t$ (RQ). Каждый дуплекс испытывают при двух независимых трансфекциях, и каждую трансфекцию анализируют двукратно, если в сводных таблицах не указано иное.

Для того чтобы вычислить относительное кратное изменение, данные в реальном времени анализируют с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и нормализуют к анализам, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или мнимотрансфицированными клетками. IC_{50} вычисляют с использованием 4-параметрической модели соответствия с использованием XLFit и нормализуют к клеткам, трансфицированным 10 нМ AD-1955, или наивным клеткам в одном и том же интервале доз или к их собственной наименьшей дозе. Последовательность AD-1955, используемая в качестве отрицательного контроля, нацелена на люциферазу и имеет следующую последовательность:

смысловая: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT,

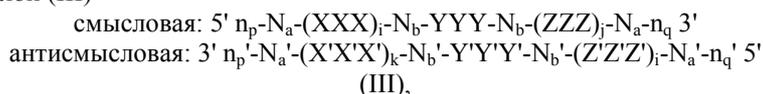
антисмысловая: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT

Различные варианты осуществления, описанные выше, можно комбинировать и получить другие варианты осуществления. Все патенты США, публикации заявок на патент США, патенты других стран, заявки на патенты других стран и непатентные публикации, упоминаемые в настоящем описании, включены в него в качестве ссылок. Аспекты вариантов осуществления могут быть модифицированы, если необходимо использовать концепции различных патентов, заявок и публикаций для предоставления дополнительных вариантов осуществления.

Такие и другие изменения могут быть осуществлены в вариантах осуществления в свете вышеуказанного подробного описания. В целом в приведенной далее формуле изобретения используемые термины не должны истолковываться как ограничение формулы изобретения конкретными вариантами осуществления, раскрытыми в описании и пунктах формулы, но должны истолковываться как включающие все возможные варианты осуществления наряду с полным объемом эквивалентов, на которые такие пункты дают право. Соответственно формула изобретения не ограничивается раскрытием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечное средство РНКи, способное ингибировать экспрессию гена-мишени, содержащее смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь имеет от 14 до 30 нуклеотидов, где дуплекс представлен формулой (III)



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

каждый p и q независимо равен 0-6;

каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида, каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый n_p , n_p' , n_q и n_q' независимо представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность, содержащую 0-6 нуклеотидов; и

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

где модификация в N_b отличается от модификации в Y , и модификация в N_b' отличается от модификации в Y' ;

где мотив Y'Y'Y' находится в положениях 11, 12 и 13, отсчитывая с первой пары нуклеотидов в области дуплекса с 5'-конца антисмысловой цепи; и

где Y' представляет собой 2'-F и Y представляет собой 2'-OMe, где каждый нуклеотид Y образует пару оснований с нуклеотидом Y' ;

где антисмысловая цепь содержит два блока из двух фосфоротиоатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 фосфатными межнуклеотидными связями.

2. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где i равен 1, j равен 1 или оба i и j равны 1.

3. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где k равен 1, l равен 1 или оба k и l равны 1.

4. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где длина дуплексного участка составляет 17-30 пар нук-

леотидов.

5. Двухцепочечное средство РНКи по п.4, где длина дуплексного участка составляет 17-19 пар нуклеотидов.

6. Двухцепочечное средство РНКи по п.4, где длина дуплексного участка составляет 27-30 пар нуклеотидов.

7. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где каждая цепь имеет 17-30 нуклеотидов.

8. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где модификации в нуклеотидах выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксиды и их комбинаций.

9. Двухцепочечное средство РНКи по п.8, где нуклеотиды модифицированы либо 2'-ОСН₃, либо 2'-F.

10. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, дополнительно содержащее по меньшей мере один лиганд.

11. Двухцепочечное средство РНКи по п.10, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через бивалентный или тривалентный разветвленный линкер.

12. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где модификации в нуклеотидах выбраны из группы, состоящей из 2'-О-метилнуклеотида, 2'-дезоксифторнуклеотида, 2'-О-N-метилацетида (2'-О-NMA) нуклеотида, 2'-О-диметиламиноэтоксидил (2'-О-DMAEOE) нуклеотида, 2'-О-аминопропил (2'-О-AP) нуклеотида, 2'-ага-F и их комбинаций.

13. Двухцепочечное средство РНКи по п.11, где лиганд присоединен к 3'-концу смысловой цепи.

14. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где пара оснований в положении 1 5'-конца дуплекса представляет собой пару оснований AU.

15. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где каждая цепь имеет 17-23 нуклеотида.

16. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где формула (III) представлена как

смысловая цепь: 5' N_a-(XXX)_i-N_b-YYY-N_b-(ZZZ)_j-N_a 3'

антисмысловая цепь: 3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_i-N_a' 5'

17. Двухцепочечное средство РНКи по п.16, где каждая модификация нуклеотида независимо выбрана из группы, состоящей из 2'-фтор и 2'-О-метила.

18. Двухцепочечное средство РНКи по п.16, дополнительно содержащее по меньшей мере один лиганд.

19. Двухцепочечное средство РНКи по п.18, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или тривалентный разветвленный линкер.

20. Двухцепочечное средство РНКи по п.19, где лиганд присоединен к 3'-концу смысловой цепи.

21. Двухцепочечное средство РНКи по п.16, где каждая цепь имеет 17-30 нуклеотидов.

22. Двухцепочечное средство РНКи по п.16, где каждая цепь имеет 17-23 нуклеотида.

