

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292836 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.02

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.06

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ САЙЛЕНСИНГА ЭКСПРЕССИИ МУОС

(31) 63/005,735

(32) 2020.04.06

(33) US

(86) PCT/US2021/025928

(87) WO 2021/207167 2021.10.14

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

(72) Изобретатель:

Китинг Марк, Макайнинч Джеймс Д.
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК), нацеленной на МУОС, и к способам применения таких композиций дцРНК для изменения (например, ингибирования) экспрессии МУОС.

A1

202292836

202292836

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ САЙЛЕНСИНГА ЭКСПРЕССИИ MYOC**Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 63/005735, поданной 6 апреля 2020 г. Содержание вышеприведенной заявки в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 31 марта 2021 г., имеет название A2038-7237WO_SL.txt и имеет размер 1020574 байта.

Область техники

Изобретение относится к специфическому ингибированию экспрессии гена MYOC.

Уровень техники

Глаукома (например, первичная открытоугольная глаукома (POAG)) является основной причиной необратимой потери зрения в современной возрастной популяции. Неправильный фолдинг белка MYOC блокирует его секрецию из клеток трабекулярной сети, что приводит к повышенному главному давлению, которое, в свою очередь, сдавливает и повреждает зрительный нерв, снижая его способность передавать визуальную информацию в головной мозг, что приводит к потере зрения. Необходимы новые способы лечения глаукомы.

Сущность изобретения

В настоящем описании описаны способы и композиции иРНК для модуляции экспрессии MYOC. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MYOC снижается или ингибируется с использованием MYOC-специфической иРНК. Такое ингибирование может быть пригодным в лечении расстройств, связанных с экспрессией MYOC, таких как болезни глаз (например, глаукома, например, первичная открытоугольная глаукома (POAG)).

Следовательно, в настоящем документе описаны композиции и способы, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинговым комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена MYOC, например, в клетке или у субъекта (например, у млекопитающего, такого как человек). Также описаны композиции и способы лечения расстройства, связанного с экспрессией MYOC, такого как глаукома (например, первичная открытоугольная глаукома (POAG)).

иРНК (например, дцРНК), включенные в композиции, описанные здесь, включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую участок, например, область длиной 30 нуклеотидов или меньше, обычно длиной 19-24 нуклеотида, которая по существу комплементарна, по меньшей мере, участку мРНК-транскрипта MYOC (например, MYOC человека) (также именуемая в настоящем документе как «MYOC-специфическая иРНК»).

В некоторых вариантах осуществления мРНК-транскрипт МҮОС представляет собой мРНК-транскрипт МҮОС человека, например, SEQ ID NO: 1, показанная здесь.

В некоторых вариантах осуществления иРНК (например, дцРНК), описанная здесь, содержит антисмысловую цепь, имеющую область, которая по существу комплементарна области мРНК МҮОС человека. В некоторых вариантах осуществления мРНК МҮОС человека имеет последовательность NM_000261.2 (SEQ ID NO: 1). Последовательность NM_000261.2 также в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки. Обратный комплемент последовательности SEQ ID NO: 1 представлен здесь как SEQ ID NO: 2.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к агенту на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии миоцилина (МҮОС), где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка кодирующей цепи МҮОС человека, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка не кодирующей цепи МҮОС человека, так что смысловая цепь является комплементарной по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к агенту на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии МҮОС, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующую двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь является комплементарной, по меньшей мере, 15 последовательным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к клетке или ткани человека, имеющей пониженный уровень мРНК МҮОС или уровень белка МҮОС по сравнению с аналогичной необработанной клеткой или тканью, где необязательно, клетка или ткань не являются сконструированными (например, где клетка или ткань содержит одну или более мутаций естественного происхождения, например, мутации МҮОС), где необязательно уровень снижен, по меньшей мере, на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань человека представляет собой ткань трабекулярной сети, цилиарное тело, пигментный эпителий сетчатки (RPE), ткань сетчатки, астроцит, перицит, клетку Мюллера, ганглионарную клетку, эндотелиальную клетку, фоторецепторную клетку, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов) или ткань сосудистой оболочки глаза, например сосудистой оболочки.

Настоящее изобретение также относится, в некоторых аспектах, к клетке, содержащей дцРНК-агент, описанный в настоящем документе.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке глаза человека, например (клетке трабекулярной сети, клетке цилиарного тела, клетка RPE, клетка сетчатки, астроциту, перициту, клетке Мюллера, ганглионарной клетке, эндотелиальной клетке или фоторецепторной клетке), имеющей пониженный уровень мРНК MYOC или уровень белка MYOC по сравнению с аналогичной необработанной клеткой. В некоторых вариантах осуществления уровень снижен, по меньшей мере, на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

В некоторых аспектах настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для ингибирования экспрессии гена, кодирующего MYOC, содержащей дцРНК-агент, описанный в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится, в некоторых аспектах, к способу ингибирования экспрессии MYOC в клетке, включающему:

(a) приведение клетки в контакт с дцРНК-агентом, описанным здесь, или фармацевтической композицией, описанной здесь; и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для деградации мРНК-транскрипта MYOC, тем самым ингибируя экспрессию MYOC в клетке.

Настоящее изобретение также относится, в некоторых аспектах, к способу ингибирования экспрессии MYOC в клетке, включающему:

(a) приведение клетки в контакт с дцРНК-агентом, описанным здесь, или фармацевтической композицией, описанной здесь; и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК MYOC, белка MYOC или как мРНК, так и белка MYOC, тем самым ингибируя экспрессию MYOC в клетке.

Настоящее изобретение также относится, в некоторых аспектах, к способу ингибирования экспрессии MYOC в глазной клетке или ткани, включающему:

(a) приведение в контакт клетки или ткани с дцРНК-агентом, который связывает MYOC; и

(b) поддержание клетки или ткани, полученных на стадии (a), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК MYOC, белка MYOC или как мРНК, так и белка MYOC, тем самым ингибируя экспрессию MYOC в клетке или ткани.

Настоящее изобретение также относится, в некоторых аспектах, к способу лечения субъекта, у которого диагностировано расстройство, ассоциированное с MYOC, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента, описанного здесь, или фармацевтической композиции, описанной здесь, тем самым обеспечивая лечение расстройства.

В любом из аспектов, представленных в настоящем документе, например, в композициях и способах, указанных выше, может применяться любой из вариантов

осуществления настоящего изобретения (например, приведенный ниже).

В некоторых вариантах осуществления кодирующая цепь МҮОС человека имеет последовательность SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления не кодирующая цепь МҮОС человека имеет последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, или 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь комплементарна, по меньшей мере 17 последовательным нуклеотидам в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов с 0, или 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь является комплементарной, по меньшей мере, 19 последовательным нуклеотидам в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь является комплементарной, по меньшей мере, 21 последовательному нуклеотиду в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид с 0, или 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления участок смысловой цепи представляет собой участок смысловой цепи, представленной в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В.

В некоторых вариантах осуществления участок смысловой цепи представляет собой участок антисмысловой цепи, представленной в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В,

5A и 5B.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B, которая соответствует антисмысловой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления длина смысловой цепи дцРНК-агента составляет, по меньшей мере, 23 нуклеотида, например, 23-30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна из смысловой цепи

и антисмысловой цепи конъюгирована с одной или более липофильными группами. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с одним или более положениями в двухцепочечной области дцРНК-агента. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована через линкер или носитель. В некоторых вариантах осуществления липофильность липофильной группы, определенная по значению коэффициента распределения октанол/вода ($\log K_{ow}$), превышает 0.

В некоторых вариантах осуществления гидрофобность двухцепочечного РНКи-агента, определенная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы двухцепочечного РНКи-агента превышает 0,2. В некоторых вариантах осуществления анализ связывания с белками плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием сывороточного белка альбумина человека.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент содержит, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого нуклеотида дезокситимидина(dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, закрытого нуклеотида, незакрытого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2'-О-(N-метилацетамид)модифицированного нуклеотида; и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи включают модификации, отличные от 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксимодифицированного нуклеотида, незакрытых нуклеиновых кислот (UNA) или гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA).

В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит ненуклеотидный спейсер (где необязательно нуклеотидный спейсер содержит C3-C6 алкил) между двумя смежными

нуклеотидами смысловой цепи или между двумя смежными нуклеотидами антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет длину не более 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ из 2 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления длина двухцепочечной области составляет 15-30 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина двухцепочечной области составляет 17-23 пары нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина двухцепочечной области составляет 17-25 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина двухцепочечной области составляет 23-27 пар нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина двухцепочечной области составляет 19-21 пару нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина двухцепочечной области составляет 21-23 пары нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет 19-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет 19-23 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет 21-23 нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления агент содержит, по меньшей мере, одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи. В некоторых вариантах осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь. В некоторых вариантах осуществления нить представляет собой смысловую цепь.

В некоторых вариантах осуществления фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи. В некоторых вариантах осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь. В некоторых вариантах осуществления нить представляет собой смысловую цепь.

В некоторых вариантах осуществления каждый из 5'- и 3'-концов одной цепи содержит фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления цепь представляет собой антисмысловую цепь.

В некоторых вариантах осуществления пара оснований в положении 1 от 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

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

В некоторых вариантах осуществления одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, по меньшей мере, в одной цепи. В некоторых вариантах осуществления одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, по меньшей мере, в одной цепи через линкер или носитель.

В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением двух концевых положений от каждого конца, по меньшей мере, одной цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением трех концевых положений от каждого конца, по меньшей мере, одной цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения не включают область сайта расщепления смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, кроме положений 9-12, где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, кроме положений 11-13, где нумерация начинается от 3'-конца смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения не включают область сайта расщепления антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 12-14, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13 в смысловой цепи, где нумерация начинается от 3'-конца, и положений 12-14 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 в смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца каждой цепи. В некоторых вариантах осуществления одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 в смысловой цепи и положений 15 и 17 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца каждой цепи.

В некоторых вариантах осуществления положения в двухцепочечной области не включают область сайта расщепления смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, и липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с положением 20 или положением 15 смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с положением 16 антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с положением 6, где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа представляет собой

алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа выбрана из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, 1-пиренмасляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексанола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О-3-(олеоил)литохолевой кислоты, О-3-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азиды и алкина. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

В некоторых вариантах осуществления осуществления липофильная группа конъюгирована через носитель, который замещает один или более нуклеотидов во внутреннем положении(ях) или двухцепочечной области. В некоторых вариантах осуществления осуществления носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклическую группу, основанную на остове серинола или остове диэтаноламина.

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с двухцепочечным иРНК-агентом через линкер, содержащий эфирную, тиоэфирную, карбамидную, карбонатную связь, аминосвязь, амидную, малеимидтиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с азотистым основанием, группой сахара или межнуклеозидной связью.

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа или нацеливающий лиганд конъюгированы через биорасщепляемый линкер, выбранный из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов, галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

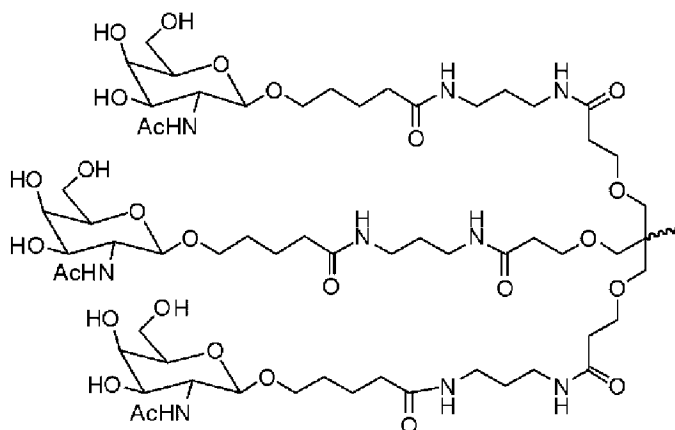
В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой цепи защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, где указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила,

изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

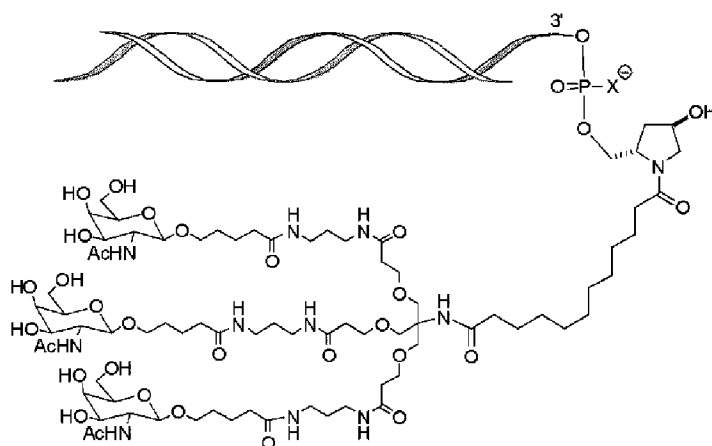
В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит нацеливающий лиганд, например, лиганд, нацеливающий на ткань глаза или ткань печени. В некоторых вариантах осуществления ткань глаза представляет собой ткань трабекулярной сети, цилиарное тело, ткань сетчатки, пигментный эпителий сетчатки (RPE) или ткань сосудистой оболочки глаза, например сосуд сосудистой оболочки.

В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован со смысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом или 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления лиганд включает N-ацетилгалактозамин (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд содержит один или более конъюгатов GalNAc или одно или несколько производных GalNAc. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой один или более конъюгатов GalNAc или одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через одновалентный линкер или двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный разветвленный линкер. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй

межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

В некоторых вариантах осуществления клетку, описанную в настоящем документе, например, клетку человека, получают способом, включающим приведение в контакт клетки человека с дцРНК-агентом, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная здесь, содержит дцРНК-агент и липидный состав.

В некоторых вариантах осуществления (например, в вариантах осуществления способов, описанных здесь) клетка находится в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления уровень мРНК MYOC ингибируется, по меньшей мере, на 50%. В некоторых вариантах осуществления уровень белка MYOC ингибируется, по меньшей мере, на 50%. В некоторых вариантах осуществления экспрессия MYOC ингибируется, по меньшей мере, на 50%. В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии MYOC приводит к снижению уровня белка MYOC в биологическом образце (например, образце глазной жидкости) субъекта, по меньшей мере, на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%. В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена MYOC снижает уровень мРНК MYOC в биологическом образце (например, образце глазной жидкости) субъекта, по меньшей мере на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта диагностировано заболевание, ассоциированное с MYOC. В некоторых вариантах осуществления субъект соответствует, по меньшей мере, одному диагностическому критерию заболевания, ассоциированного с MYOC. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с MYOC, представляет собой глаукому. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с MYOC, представляет собой первичную открытоугольную глаукому (POAG).

В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань глаза представляет собой ткань трабекулярной сети, цилиарное тело, RPE, клетку сетчатки, астроцит, перицит, клетку Мюллера, ганглионарную клетку, эндотелиальную клетку, фоторецепторную клетку, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов) или ткань сосудистой оболочки глаза, например сосуд сосудистой оболочки.

В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с MYOC, представляет собой глаукому. В некоторых вариантах осуществления глаукома вызвана или связана с повышенным внутриглазным давлением. В некоторых вариантах осуществления

глаукома представляет собой первичную открытоугольную глаукому (POAG)).

В некоторых вариантах осуществления лечение включает ослабление, по меньшей мере, одного признака или симптома заболевания. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один признак или симптом включает показатель одно или более из повреждений зрительного нерва, потери зрения, туннельного зрения, нечеткости зрения, боли в глазах или наличия, уровня или активности MYOC (например, гена MYOC, мРНК MYOC или белка MYOC).

В некоторых вариантах осуществления уровень MYOC, который выше референтного уровня, свидетельствует о наличии у субъекта глаукомы. В некоторых вариантах осуществления лечение включает предупреждение прогрессирования заболевания. В некоторых вариантах осуществления лечение включает одно или более из (a) ингибирования или снижения экспрессии или активности MYOC; (b) снижения уровня неправильно свернутого белка MYOC; (c) снижения гибели клеток трабекулярной сети; (d) снижения внутриглазного давления; или (e) повышения остроты зрения.

В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к среднему снижению мРНК MYOC, по меньшей мере, на 30% по сравнению с исходным уровнем в ткани трабекулярной сети, цилиарном теле, сетчатке, RPE, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов), или ткани сосудистой оболочки глаза, например, сосуде сосудистой оболочки. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к среднему снижению мРНК MYOC, по меньшей мере, на 60% по сравнению с исходным уровнем в ткани трабекулярной сети, цилиарном теле, сетчатке, RPE, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов), или ткани сосудистой оболочки глаза, например, сосуде сосудистой оболочки. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к среднему снижению уровня мРНК MYOC, по меньшей мере, на 90% по сравнению с исходным уровнем в ткани трабекулярной сети, цилиарном теле, сетчатке, RPE, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов), или ткани сосудистой оболочки глаза, например, сосуде сосудистой оболочки.

В некоторых вариантах осуществления после лечения у субъекта имеет место, по меньшей мере, нокдауну продолжительностью не менее 8 недель после введения однократной дозы дцРНК, что оценивается по белку MYOC в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к нокдауну продолжительностью, по меньшей мере, 12 недель после однократной дозы дцРНК, что оценивается по белку MYOC в сетчатке. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к нокдауну продолжительностью, по меньшей мере, 16 недель после однократной дозы дцРНК, что оценивается по белку MYOC в сетчатке.

В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент вводят в дозе примерно от 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент вводят субъекту внутриокулярно. В некоторых вариантах осуществления внутриокулярное введение включает интравитреальное введение, например, интравитреальную инъекцию; трансклеральное введение, например трансклеральную инъекцию; субконъюнктивальное введение, например, субконъюнктивальную инъекцию; ретробульбарное введение, например, ретробульбарную инъекцию; внутрикамерное введение, например внутрикамерную инъекцию, или субретиальное введение, например субретиальную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент вводят субъекту внутривенно. В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент вводят субъекту местно.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает измерение уровня МҮОС (например, гена МҮОС, мРНК МҮОС или белка МҮОС) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня МҮОС у субъекта включает измерение уровня белка МҮОС в биологическом образце субъекта (например, образце глазной жидкости). В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает проведение анализа крови, визуализирующего теста или биопсии внутриглазной жидкости (например, отвод водянистой влаги глаза).

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный здесь, дополнительно измеряющий уровень МҮОС (например, гена МҮОС, мРНК МҮОС или белка МҮОС) у субъекта, проводят до лечения дцРНК-агентом или фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления при определении того, что у субъекта уровень МҮОС выше референтного уровня, то субъекту вводят дцРНК-агент или фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня МҮОС у субъекта проводят после лечения дцРНК-агентом или фармацевтической композицией.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный здесь, дополнительно включает лечение субъекта терапией, подходящей для лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с МҮОС, например, где терапия включает хирургическую лазерную трабекулопластику, хирургическую трабекулоэктомию, малоинвазивную хирургическую операцию при глаукоме или размещение дренажной трубки в глазу. В некоторых вариантах осуществления способ, описанный в настоящем документе, дополнительно включает введение субъекту дополнительного средства, подходящего для лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с МҮОС. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент включает ингибитор карбоангидразы, простагландин, бета-блокатор, агонист альфа-адренорецепторов, ингибитор карбоангидразы, ингибитор Rho-киназы или холинергический агент или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство представляет собой лекарственное средство для перорального введения или глазные капли.

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указанные здесь, в полном объеме включены здесь посредством ссылки.

Подробности различных вариантов осуществления раскрытия изложены в описании ниже. Другие признаки, цели и преимущества изобретения будут очевидны из описания и чертежей, а также из формулы изобретения.

Подробное описание изобретения

иРНК направляет последовательность-специфическую деградацию мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (РНКи). В настоящем документе описаны иРНК и способы их применения для модуляции (например, ингибирования) экспрессии МҮОС. Также настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения заболеваний, ассоциированных с экспрессией МҮОС, таких как глаукома (например, первичная открытоугольная глаукома (РОАG)).

МҮОС человека представляет собой секретируемый гликопротеин с молекулярной массой примерно 57 кДа, который регулирует активацию нескольких сигнальных путей в соседних клетках для контроля различных процессов, включая клеточную адгезию, адгезию клеточного матрикса, организацию цитоскелета и миграцию клеток. МҮОС обычно экспрессируется и секретируется различными тканями, включая сетчатку и структуры, участвующие в регуляции внутриглазной жидкости, такие как ткань трабекулярной сети и цилиарное тело. Аберрантный МҮОС ассоциируется с глаукомой, например, с первичной открытоугольной глаукомой (РОАG). Не желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, аберрантный МҮОС может усугубить патогенез глаукомы, например, препятствуя оттоку водянистой влаги глаза, что приводит к повышению внутриглазного давления.

Следующее описание раскрывает способы получения и применения композиций, содержащих иРНК, для модуляции (например, ингибирования) экспрессии МҮОС, а также композиции и способы лечения заболеваний, ассоциированных с экспрессией МҮОС.

В некоторых аспектах фармацевтические композиции, содержащие иРНК МҮОС и фармацевтически приемлемый носитель, способы применения композиций для ингибирования экспрессии МҮОС и способы применения фармацевтических композиций для лечения заболеваний, ассоциированных с экспрессией МҮОС (например, глаукомы, например, первичной открытой угловой глаукомы (РОАG)).

I. Определения

Для удобства ниже приведены значения некоторых терминов и фраз, используемых в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Если имеется очевидное несоответствие между использованием термина в других разделах данного описания и его определением, приведенным в этом разделе, то определение, данное в этом разделе, имеет преимущественную силу.

Термин «примерно» при упоминании числа или числового диапазона означает, что указанное число или числовой диапазон является приближением в пределах экспериментальной вариабельности (или в пределах статистической экспериментальной ошибки), и, таким образом, число или числовой диапазон могут варьироваться, например, между 1% и 15% от указанного числа или числового диапазона.

Термин «по меньшей мере» перед числом или рядом чисел понимается как

включающий число, соседнее с термином «по меньшей мере», и все последующие числа или целые числа, которые могут быть включены логически, как ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере» 17 нуклеотидов из 20-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов обладают указанным свойством. Когда выражение «по меньшей мере» стоит перед рядом чисел или диапазонов, то подразумевается, что «по меньшей мере» может изменить каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В рамках настоящего изобретения, термины «не более чем» или «или менее чем» понимаются как значение, смежное с выражением, и последовательные меньшие значения или целые числа, следующие из контекста, до нуля. Например, дуплекс с несовпадениями с сайтом-мишенью из «не более 2 нуклеотидов» имеет 2, 1 или 0 несовпадений. Когда выражение «не более чем» стоит перед рядом чисел или диапазоном, то подразумевается, что «не более чем» может изменить каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В рамках настоящего изобретения, термин «до» в значении «до 10» означает до 10 включительно, то есть 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Диапазоны, предусмотренные здесь, включают все отдельные целочисленные значения и все поддиапазоны в пределах диапазонов.

Термины «активировать», «усиливать», «положительно регулировать экспрессию», «повышать экспрессию» и т.п. в той мере, в какой они относятся к гену MYOC, в данном документе относятся, по меньшей мере, к частичной активации экспрессии гена MYOC, проявляющейся в увеличении количества мРНК MYOC, которая может быть выделена или детектирована в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибируется ген MYOC и которые были обработаны или были обработаны таким образом, что экспрессия гена MYOC повышается по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но подвергшихся или не подвергшихся такой обработке (контрольные клетки).

В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена MYOC активируется, по меньшей мере, примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% при введении иРНК, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ген MYOC активируется, по меньшей мере, примерно на 60%, 70% или 80% при введении иРНК, раскрытой в описании. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена MYOC активируется, по меньшей мере, примерно на 85%, 90% или 95% или более при введении иРНК, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена MYOC увеличивается, по меньшей мере, в 1 раз, по меньшей мере, в 2 раза, по меньшей мере, в 5 раз, по меньшей мере, в 10 раз, по меньшей мере, в 50 раз, по меньшей мере, в 100 раз, по меньшей мере, в 500 раз, по меньшей мере, в 1000 раз или более в клетках, обработанных иРНК, как описано в настоящем документе, по сравнению с экспрессией в необработанных клетках. Активация экспрессии малыми дцРНК описана,

например, в публикации Li et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:17337-42, в заявках на патента США US2007/0111963 и US2005/226848, каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

Термины «сайленсинг», «ингибировать экспрессию», «отрицательно регулировать экспрессию», «подавлять экспрессию» и т.п. в той мере, в какой они относятся к МҮОС, здесь относятся, по меньшей мере, к частичному подавлению экспрессии МҮОС при оценке, например, на основе экспрессии мРНК МҮОС, экспрессии белка МҮОС или другого параметра, функционально связанного с экспрессией МҮОС. Например, ингибирование экспрессии МҮОС может проявляться снижением количества мРНК МҮОС, которую можно выделить или детектировать в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибируется МҮОС и которые были обработаны или были обработаны таким образом, что экспрессия МҮОС ингибируется по сравнению с контролем. Контроль может представлять собой вторую клетку или группу клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, за исключением того, что вторая клетка или группа клеток не подвергались такой обработке (контрольные клетки). Степень ингибирования обычно выражается в процентах от контрольного уровня, например:

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

Альтернативно, степень ингибирования может быть указана с точки зрения уменьшения параметра, который функционально связан с экспрессией МҮОС, например, количества белка, кодированного геном МҮОС. Снижение параметра, функционально связанного с экспрессией МҮОС, может быть аналогичным образом выражено в процентах от контрольного уровня. В принципе, сайленсинг МҮОС можно определить в любой клетке, экспрессирующей МҮОС, либо конститутивно, либо с помощью геномной инженерии, а также с помощью любого подходящего анализа.

Например, в некоторых случаях экспрессия МҮОС подавляется, по меньшей мере, примерно на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% при введении иРНК, описанной здесь. В некоторых вариантах осуществления МҮОС подавляется, по меньшей мере, примерно на 60%, 65%, 70%, 75% или 80% при введении иРНК, описанной здесь. В некоторых вариантах осуществления МҮОС подавляется, по меньшей мере, примерно на 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или более при введении иРНК, описанной в настоящем документе.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи иРНК, например, двухцепочечной РНК, которая включает область, по существу комплементарную последовательности-мишени.

В рамках настоящего изобретения, термин «область комплементарности» относится к области антисмысловой цепи, которая по существу является комплементарной последовательности, например последовательности-мишени, как здесь определено. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени,

ир несовпадения могут находиться во внутренних или концевых областях молекулы. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит 0, 1 или 2 несовпадения.

Термин «смысловая цепь» или «цепь-пассажир», используемый здесь, относится к цепи иРНК, которая включает область, по существу комплементарную области антисмысловой цепи, как этот термин определен в настоящем документе.

Термины «тупой» или «тупой конец», используемые в данном документе по отношению к дцРНК, означают, что на данном терминальном конце дцРНК отсутствуют неспаренные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов, т. е. отсутствует нуклеотидный выступ. Один или оба конца дцРНК могут быть тупыми. Когда оба конца дцРНК являются тупыми, то говорят, что дцРНК имеет тупые концы. Для ясности, дцРНК с «тупыми концами» представляет собой дцРНК, которая является «тупой» на обоих концах, т. е. не имеет нуклеотидных выступов на обоих концах молекулы. Чаще всего такая молекула будет двухцепочечной по всей своей длине.

В рамках настоящего изобретения, и если не указано иное, то термин «комплементарная», используемый для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области техники. Такими условиями могут быть, например, «жесткие условия», где жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM ЭДТА, 50°C или 70°C в течение 12-16 ч с последующим промыванием. Могут применяться и другие условия, такие как физиологически релевантные условия, с которыми можно столкнуться внутри организма. Специалист в данной области может определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в иРНК, например, в дцРНК, как здесь описано, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут называться здесь «полностью комплементарными» по отношению друг к другу. Однако если первая последовательность упоминается здесь как «по существу комплементарная» по отношению ко второй последовательности, то две последовательности могут быть полностью комплементарными или могут образовывать одну или более, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований при гибридизации для дуплекса, состоящего 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее подходящих для их конечного применения, например, для ингибирования экспрессии генов

через путь RISC. Однако если два олигонуклеотида предназначены для образования при гибридизации одного или более одноцепочечных выступов, то такие выступы не должны рассматриваться в качестве несовпадений при определении комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все же может называться «полностью комплементарной» для целей, описанных здесь.

В рамках настоящего изобретения, «комплементарные» последовательности могут также включать или быть полностью образованными парами оснований, отличными от пар оснований Уотсона-Крика, или парами оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, при условии, что выполняются вышеуказанные требования в отношении их способности гибридизоваться. Такие пары оснований, отличные от Уотсона-Крика, включают, не ограничиваясь этим, неоднозначную пару оснований G:U, или Хугстиновское спаривание оснований.

Термины «комплементарная», «полностью комплементарная» и «по существу комплементарная» в настоящем описании можно использовать в отношении совпадения пар оснований смысловой цепи и антисмысловой цепи дцРНК или антисмысловой цепи дцРНК и последовательности-мишени, как будет понятно из контекста, в котором их используют.

В рамках настоящего изобретения, полинуклеотид, который «по существу является комплементарным, по меньшей мере, участку» матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывному участку представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей белок MYOC). Например, полинуклеотид является комплементарным, по меньшей мере, участку мРНК MYOC, если последовательность по существу комплементарна непрерывному участку мРНК, кодирующей MYOC. Термин «комплементарность» относится к способности образовывать пары между азотистыми основаниями первой нуклеиновой кислоты и второй нуклеиновой кислоты.

В рамках настоящего изобретения, термин «область комплементарности» относится к области одного агента на основе нуклеотидной последовательности, который по существу комплементарен другой последовательности, например, области смысловой последовательности и соответствующей антисмысловой последовательности дцРНК или антисмысловой цепи иРНК и последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности MYOC, как определено в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, то несовпадения могут находиться во внутренних или концевых областях антисмысловой цепи иРНК. Как правило, наиболее допустимые несовпадения находятся в концевых областях, например, в 5, 4, 3 или 2 нуклеотидах от 5'- или 3'-конца иРНК-агента.

В рамках настоящего изобретения, выражение «приведение в контакт» включает прямой контакт с клеткой, а также опосредованный контакт с клеткой. Например, с клеткой

субъекта можно контактировать, когда субъекту вводят композицию, содержащую иРНК (например, внутриокулярно, местно или внутривенно).

«Введение в клетку», по отношению к иРНК, означает облегчение или осуществление захвата или поглощения клеткой. Поглощение или захват иРНК может происходить через диффузионные или активные клеточные процессы независимо или с помощью вспомогательных агентов или устройств. Значение этого термина не ограничивается клетками *in vitro*; иРНК также может быть «введена в клетку», где клетка является частью живого организма. В таком случае введение в клетку будет включать доставку в организм. Например, для доставки *in vivo* иРНК можно инъектировать в участок ткани или ввести системно. Доставка *in vivo* также может осуществляться с помощью системы доставки с β -глюканом, такой как описанные в патентах США № 5032401 и 5607677, и публикации заявки на патент США № 2005/0281781, которые в полном объеме включены здесь посредством ссылки. Введение *in vitro* в клетку включает методы, известные в данной области, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны ниже или известны в данной области техники. В рамках настоящего изобретения, термин «расстройство, ассоциированное с экспрессией МҮОС», «заболевание, ассоциированное с экспрессией МҮОС», «патологический процесс, ассоциированный с экспрессией МҮОС», «МҮОС-ассоциированное расстройство», «МҮОС-ассоциированное заболевание» и т.п. включает любое состояние, расстройство или заболевание, при котором экспрессия МҮОС изменена (например, понижена или повышена относительно референтного уровня, например, уровня, характерного для здорового субъекта). В некоторых вариантах осуществления экспрессия МҮОС снижена. В некоторых вариантах осуществления экспрессия МҮОС повышена. В некоторых вариантах осуществления снижение или повышение экспрессии МҮОС можно обнаружить в образце ткани субъекта (например, в образце глазной жидкости). Снижение или увеличение можно оценить относительно уровня, наблюдаемого у того же субъекта до развития расстройства, или по сравнению с другим субъектом(ами), у которого расстройство отсутствует. Снижение или увеличение может быть ограничено конкретным органом, тканью или областью тела (например, глазом). Заболевания, ассоциированные с МҮОС, включают, не ограничиваясь этим, глаукому (например, первичную открытоугольную глаукому (РОАГ)).

В рамках настоящего изобретения, термин «глаукома» означает любое заболевание глаза, которое вызвано или связано с повреждением зрительного нерва. В некоторых вариантах осуществления глаукома связана с повышенным внутриглазным давлением. В некоторых вариантах осуществления глаукома протекает бессимптомно. В еще одних вариантах осуществления глаукома имеет один или более симптомов, например, потерю периферического зрения, туннельное зрение или слепые пятна. Неограничивающим примером глаукомы, которая поддается лечению с использованием способов, обеспеченных настоящим изобретением, является первичная открытоугольная глаукома (РОАГ).

В рамках настоящего изобретения, термин «двухцепочечная РНК», «дцРНК» или

«киРНК» относится к иРНК, которая включает молекулу РНК или комплекс молекул, имеющих гибридованную дуплексную область, которая содержит две антипараллельные и по существу комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, которые будут называться как имеющие «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию по отношению к РНК-мишени. Дуплексная область может иметь любую длину, которая обеспечивает специфическую деградацию требуемой РНК-мишени, например, через путь RISC, но обычно имеет длину от 9 до 36 пар оснований, например, 15-30 пар оснований. В отношении дуплекса с длиной 9 и 36 пар оснований, то дуплекс может быть любой длины в этом диапазоне, например, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 и любой поддиапазон между ними, включая, не ограничиваясь этим, 15-30 пар оснований, 15-26 пар оснований, 15-23 пар оснований, 15-22 пар оснований, 15-21 пар оснований, 15-20 пар оснований, 15-19 пар оснований, 15-18 пар оснований, 15-17 пар оснований, 18-30 пар оснований, 18-26 пар оснований, 18-23 пар оснований, 18-22 пар оснований, 18-21 пар оснований, 18-20 пар оснований, 19-30 пар оснований, 19-26 пар оснований, 19-23 пар оснований, 19-22 пары оснований, 19-21 пара оснований, 19-20 пар оснований, 20-30 пар оснований, 20-26 пар оснований, 20-25 пар оснований, 20-24 пар оснований, 20-23 пар оснований, 20-22 пары оснований, 20-21 пара оснований, 21-30 пар оснований, 21-26 пар оснований, 21-25 пар оснований, 21-24 пар оснований, 21-23 пар оснований или 21-22 пар оснований. дцРНК, генерируемые в клетке посредством процессинга Dicer и подобными ферментами, обычно имеют длину в диапазоне 19-22 пар оснований. Одна цепь дуплексной области двухцепочечной дцРНК содержит последовательность, которая по существу комплементарна области РНК-мишени. Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут происходить из одной молекулы РНК, имеющей, по меньшей мере, один самокомплементарный участок, или могут образоваться из двух или более отдельных молекул РНК. Когда дуплексная область образована из двух цепей одной молекулы, то молекула может иметь дуплексную область, разделенную одноцепочечной цепочкой нуклеотидов (в данном документе называемой «петлей-шпилькой») между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру. Петля-шпилька может содержать, по меньшей мере, один неспаренный нуклеотид; в некоторых вариантах осуществления петля-шпилька может содержать, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 9, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 23 или более неспаренных нуклеотидов. Когда две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, то эти молекулы не обязательно должны быть ковалентно связаны, но могут быть связаны. В некоторых вариантах осуществления две цепи соединены ковалентно с помощью других средств, помимо шпильки, и соединяющая структура представляет собой линкер.

В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент может представлять собой «одноцепочечную миРНК», которую вводят в клетку или организм для ингибирования мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечные РНК-агенты

могут связываться с эндонуклеазой RISC Argonaute 2, которая затем расщепляет мРНК-мишень. Одноцепочечные миРНК обычно состоят из 15-30 нуклеотидов и необязательно являются химически модифицированными. Дизайн и тестирование одноцепочечных миРНК описаны в патенте США № 8101348 и в публикации Lima et al., (2012) Cell, 150: 883-894, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Любая из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных здесь (например, последовательности, представленные в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В), может быть использована в качестве одноцепочечной миРНК, как здесь описано, и, необязательно в качестве химически модифицированной, например, как здесь описано, например, способами, описанными Lima et al., (2012) Cell, 150:883-894.

В некоторых вариантах осуществления агент для РНК-интерференции включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, направляя расщепление РНК-мишени. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, расщепляется на миРНК эндонуклеазой типа III, известной как Dicer (Sharp et al., Genes Dev., 2001, 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе-III, процессирует дцРНК в короткие интерферирующие РНК из 19-23 пар оснований с характерными двумя 3'-выступами (Bernstein, et al., (2001) Nature, 409:363). Затем миРНК включаются в РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс (RISC), где одна или более геликаз раскручивают дуплекс миРНК, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen et al., (2001) Cell, 107:309). При связывании с соответствующей мРНК-мишенью одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, обеспечивая сайленсинг (Elbashir, et al., (2001) Genes Dev., 15:188). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретение относится к одноцепочечной РНК, которая способствует образованию комплекса RISC для сайленсинга гена-мишени.

«G», «C», «A», «T» и «U» обычно обозначают нуклеотид, содержащий в качестве основания гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил соответственно. Однако следует понимать, что термин «дезоксирибонуклеотид», «рибонуклеотид» или «нуклеотид» может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или к группе заместителя-миметика. Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил могут быть заменены другими группами без существенного изменения способности к спариванию оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такую группу заместителя. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий в качестве основания инозин, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть замещены в нуклеотидных последовательностях дцРНК, представленных в описании, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В еще одном примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначной пары оснований G-U с мРНК-мишенью. Последовательности, содержащие

такие группы заместителя, подходят для композиций и способов, описанных здесь.

В рамках настоящего изобретения, термины «иРНК», «РНКи», «иРНК-агент» или «РНКи-агент» относятся к агенту, который содержит РНК, как этот термин определен в данном документе, и который опосредует целенаправленное расщепление РНК-транскрипта через путь РНК-индуцированного сайленсингового комплекса (RISC). В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, оказывает влияние на ингибирование экспрессии MYOC, например, в клетке или млекопитающем. Ингибирование экспрессии MYOC можно оценить на основании снижения уровня мРНК MYOC или снижения уровня белка MYOC.

Термин «линкер» или «линкерная группа» означает органическую группу, которая соединяет две части соединения, например, ковалентно связывает две части соединения.

Термин «липофильная» или «липофильная группа» в широком смысле относится к любому соединению или химической молекуле, обладающей сродством к липидам. Одним из способов характеристики липофильности липофильной группы является коэффициент распределения октанол-вода, $\log K_{ow}$, где K_{ow} представляет собой отношение концентрации химического соединения в октанольной фазе к его концентрации в водной фазе двухфазной системы в условиях равновесия. Коэффициент распределения октанол-вода представляет собой лабораторно измеряемый показатель соединения. Однако его также можно прогнозировать, используя коэффициенты, относящиеся к структурным компонентам химического вещества, которые рассчитываются с использованием неэмпирических или эмпирических методов (см., например, публикацию Tetko et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 41:1407-21 (2001), которая в полном объеме включена здесь посредством ссылки). Он обеспечивает термодинамический показатель тенденции соединения к преференции неводной или масляной среды, а не воды (т. е. его гидрофильный/липофильный баланс). В принципе, химическое соединение является липофильным по своей природе, если его значение $\log K_{ow}$ превышает 0. Как правило, липофильная группа имеет значение $\log K_{ow}$ выше 1, выше 1,5, выше 2, выше 3, выше 4, выше 5 или выше 10. Например, прогнозируется, что $\log K_{ow}$ для 6-аминогексанола составляет примерно 0,7. Используя аналогичный метод, прогнозируемое значение $\log K_{ow}$ холестерина N-(гексан-6-ол)карбамата равно 10,7.

Липофильность молекулы может меняться в зависимости от функциональной группы, которую она несет. Например, добавление гидроксильной группы или аминогруппы к концу липофильной молекулы может увеличить или уменьшить значение коэффициента распределения (например, $\log K_{ow}$) липофильной молекулы.

Альтернативно, гидрофобность двухцепочечного РНКи-агента, конъюгированного с одной или более липофильными молекулами, можно измерить по характеристикам его связывания с белком. Например, в некоторых вариантах осуществления можно определить, что несвязанная фракция в анализе связывания с белками плазмы двухцепочечного РНКи-агента положительно коррелирует с относительной гидрофобностью двухцепочечного РНКи-агента, которая затем может положительно коррелировать с сайленсинговой активностью двухцепочечного РНКи-агента.

В некоторых вариантах осуществления определенный анализ связывания с белками плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с использованием белка сывороточного альбумина человека. Иллюстративный протокол этого анализа связывания подробно описан, например, в PCT/US2019/031170. Гидрофобность двухцепочечного РНКи-агента, измеренная по фракции несвязанной миРНК в анализе связывания, превышает 0,15, превышает 0,2, превышает 0,25, превышает 0,3, превышает 0,35, превышает 0,4, превышает 0,45 или превышает 0,5 для обеспечения усиленной *in vivo* доставки миРНК.

Следовательно, конъюгирование липофильных групп с внутренним положением(ями) двухцепочечного РНКи-агента обеспечивает повышенную гидрофобность для усиленной доставки миРНК *in vivo*.

Термин «липидная наночастица» или «LNP» представляет собой везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, РНКи-агент или плазмиду, из которой транскрибируется РНКи-агент. LNP описаны, например, в патентах США № 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В рамках настоящего изобретения, термин «модулировать экспрессию» относится, по меньшей мере, к частичному «ингибированию» или частичной «активации» экспрессии гена (например, гена MYOC) в клетке, обработанной композицией иРНК, описанной здесь, по сравнению с экспрессией соответствующего гена в контрольной клетке. Контрольная клетка включает необработанную клетку или клетку, обработанную нецелевой контрольной иРНК.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что термин «молекула РНК» или «молекула рибонуклеиновой кислоты» охватывает не только молекулы РНК, экспрессированные или встречающиеся в природе, но также аналоги и производные РНК, содержащие один или несколько аналогов или производных рибонуклеотидов/рибонуклеозидов, как описано в настоящем документе или как известно в данной области техники. Строго говоря, «рибонуклеозид» включает нуклеозидное основание и рибозный сахар, а «рибонуклеотид» представляет собой рибонуклеозид с одной, двумя или тремя фосфатными группами или их аналоги (например, фосфотриоат). Однако термины «рибонуклеозид» и «рибонуклеотид» можно считать эквивалентными в контексте настоящего документа. РНК может быть модифицирована в структуре азотистого основания, в структуре рибозы или в структуре рибозо-фосфатного остова, например, как описано здесь ниже. Однако молекулы, включающие аналоги или производные рибонуклеозидов, должны сохранять способность образовывать дуплекс. В качестве неограничивающих примеров молекула РНК может также включать, по меньшей мере, один модифицированный рибонуклеозид, в том числе, помимо прочего, 2'-О-метилмодифицированный нуклеозид, нуклеозид, содержащий 5'-фосфотиоатную группу, концевой нуклеозид, связанный с производным холестерина или бисдециламидной группой

додекановой кислоты, закрытый нуклеозид, нуклеозид с удаленным азотистым основанием, ациклический нуклеозид, гликолевый нуклеотид, 2'-дезокси-2'-фтор-модифицированный нуклеозид, 2'-амино-модифицированный нуклеозид, 2'-алкил-модифицированный нуклеозид, морфолинонуклеозид, фосфорамидат или нуклеозид, содержащий неприродное основание, или любую их комбинацию. Альтернативно или в комбинации молекула РНК может содержать, по меньшей мере, два модифицированных рибонуклеозидов, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 9, по меньшей мере, 10, по меньшей мере, 15, по меньшей мере, 20 или более, вплоть до всей длины молекулы дцРНК. Модификации не обязательно должны быть одинаковыми для каждого из такого множества модифицированных рибонуклеозидов в молекуле РНК. В некоторых вариантах осуществления модифицированные РНК, предполагаемые для применения в способах и композициях, описанных в настоящем документе, представляют собой пептидные нуклеиновые кислоты (PNA), которые обладают способностью образовывать требуемую дуплексную структуру и которые обеспечивают или опосредуют специфическую деградацию РНК-мишени, например, через путь RISC. Для ясности следует понимать, что термин «иРНК» не охватывает природную двухцепочечную молекулу ДНК или молекулу ДНК, 100% дезоксинуклеозид-содержащую.

В некоторых аспектах модифицированный рибонуклеозид включает дезоксирибонуклеозид. В этом случае иРНК-агент может содержать один или более дезоксинуклеозидов, включая, например, дезоксинуклеозидный выступ(ы), или один или несколько дезоксинуклеозидов в двухцепочечной части дцДНК. В некоторых вариантах осуществления молекула РНК содержит процент дезоксирибонуклеозидов, по меньшей мере, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или выше (но не 100%) дезоксирибонуклеозидов, например, в одной или обеих цепях.

В рамках настоящего изобретения, термин «нуклеотидный выступ» относится, по меньшей мере, к одному неспаренному нуклеотиду, выступающему из дуплексной структуры РНКи-агента, например, дцРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи дцРНК выступает за пределы 5'-конца другой цепи или наоборот, то возникает нуклеотидный выступ. дцРНК может содержать выступ, по меньшей мере, из одного нуклеотида; альтернативно выступ может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может находиться в смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа могут находиться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи дцРНК.

В некоторых вариантах осуществления, антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидны-выступов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидных выступов на 3'-конце или 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления, смысловая цепь дцРНК

имеет 1-10 нуклеотидных выступов на 3'-конце или 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления, один или более нуклеотидов в выступе заменены нуклеозидтиофосфатом.

В рамках настоящего изобретения термин «фармацевтическая композиция» включает фармакологически эффективное количество терапевтического средства (например, иРНК) и фармацевтически приемлемый носитель. Используемые в настоящем документе термины «фармакологически эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или просто «эффективное количество» относятся к такому количеству агента (например, иРНК), которое эффективно для получения предполагаемого фармакологического, терапевтического или профилактического результата. Например, в способе лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией MYOC (например, глаукомы, например, первичной открытоугольной глаукомы (POAG)), эффективное количество включает количество, эффективное для ослабления одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием (например, количество, эффективное для: (a) ингибирования или снижения экспрессии или активности MYOC; (b) снижения уровня неправильно свернутого белка MYOC; (c) уменьшения гибели клеток трабекулярной сети; (d) снижения внутриглазного давления; или (e) повышения остроты зрения. Например, если данное клиническое лечение считается эффективным при ослаблении измеримого параметра, связанного с заболеванием или расстройством, по меньшей мере, на 10%, то терапевтически эффективное количество лекарственного средства для лечения этого заболевания или расстройства представляет собой количество, необходимое для получения, по меньшей мере, 10% ослабления этого параметра. Например, терапевтически эффективное количество иРНК, нацеленной на MYOC, может снизить уровень мРНК MYOC или уровень белка MYOC на любую измеримую величину, например, по меньшей мере, на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

Термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к носителю для введения терапевтического агента. Такие носители включают, не ограничиваясь эти, физиологический раствор, забуференный физиологический раствор, декстрозу, воду, глицерин, этанол и их комбинации. Термин специально исключает среду для культивирования клеток. Для лекарственных средств, вводимых перорально, фармацевтически приемлемые носители включают, не ограничиваясь этим, фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как инертные разбавители, дезинтегрирующие агенты, связывающие агенты, смазывающие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты. Подходящие инертные разбавители включают карбонат натрия и кальция, фосфат натрия и кальция и лактозу, тогда как кукурузный крахмал и альгиновая кислота являются подходящими разрыхлителями. Связующие агенты могут включать крахмал и желатин, тогда как смазывающий агент, если он присутствует, обычно представляет собой стеарат магния, стеариновую кислоту или тальк. При желании таблетки можно покрыть таким веществом, как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, для замедления всасывания в желудочно-кишечном тракте. Агенты,

включенные в лекарственные формы, дополнительно описаны ниже.

В рамках настоящего изобретения, термин «SNALP» относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. SNALP представляет собой везикулу из липидов, покрывающую восстановленную водную внутреннюю часть, содержащую нуклеиновую кислоту, такую как иРНК, или плазмиду, с которой транскрибируется иРНК. SNALP описаны, например, в публикациях патентных заявок США № 2006/0240093, 2007/0135372 и в международной заявке № WO 2009/082817. Эти документы включены здесь посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления SNALP представляет собой SPLP. В рамках настоящего изобретения, термин «SPLP» относится к частице нуклеиновая кислота-липид, содержащей плазмидную ДНК, инкапсулированную в липидную везикулу.

В рамках настоящего изобретения, термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, на которую ссылаются, с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

В рамках настоящего изобретения, термин «субъект», подлежащий лечению способами, описанными в настоящем документе, включает человека или животное, отличное от человека, например, млекопитающее. Млекопитающее может представлять собой, например, грызуна (например, крысу или мышь) или примата (например, обезьяну). В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

«Субъект, нуждающийся в этом» включает субъекта, страдающего, подозреваемого в наличии или подверженного риску развития заболевания, ассоциированного с экспрессией MYOC, например, сверхэкспрессией (например, глаукомы). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подозревается в наличии заболевания, ассоциированного с экспрессией или сверхэкспрессией MYOC. В некоторых вариантах осуществления субъект подвержен риску развития заболевания, ассоциированного с экспрессией или сверхэкспрессией MYOC.

В рамках настоящего изобретения, термин «последовательность-мишень» относится к непрерывному участку нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена MYOC, включая как продукт первичной транскрипции, так и мРНК, являющуюся продуктом процессинга РНК первичной транскрипции. В одном варианте осуществления участок-мишень последовательности должен быть, по меньшей мере, достаточно длинным, чтобы служить субстратом для РНКи-направленного расщепления на том участке нуклеотидной последовательности молекулы мРНК или рядом с ней. Например, последовательность-мишень обычно имеет длину от 9 до 36 нуклеотидов, например, от 15 до 30 нуклеотидов, включая все поддиапазоны между ними. В качестве неограничивающего примера, последовательность-мишень имеет длину 15-30 нуклеотидов. Например, последовательность-мишень может состоять примерно из 15-30 нуклеотидов, 15-26 нуклеотидов, 15-23 нуклеотидов, 15-22 нуклеотидов, 15-21 нуклеотидов, 15-20 нуклеотидов, 15-19 нуклеотидов, 15-18 нуклеотидов, 15-17

нуклеотидов, 18-30 нуклеотидов, 18-26 нуклеотидов, 18-23 нуклеотидов, 18-22
 нуклеотидов, 18-21 нуклеотидов, 18-20 нуклеотидов, 19-30 нуклеотидов, 19-26
 нуклеотидов, 19-23 нуклеотидов, 19-22 нуклеотидов, 19-21 нуклеотидов, 19-20
 нуклеотидов, 20-30 нуклеотидов, 20-26 нуклеотидов, 20-25 нуклеотидов, 20-24
 нуклеотидов, 20-23 нуклеотидов, 20-22 нуклеотидов, 20-21 нуклеотидов, 21-30
 нуклеотидов, 21-26 нуклеотидов, 21-25 нуклеотидов, 21-24 нуклеотидов, 21-23 нуклеотидов
 или 21-22 нуклеотида в длину.

В рамках настоящего изобретения, выражения «терапевтически эффективное количество» и «профилактически эффективное количество» и т.п. относятся к количеству, которое обеспечивает терапевтический эффект при лечении, предупреждении или контроле любого расстройства или патологического процесса, ассоциированного с экспрессией МҮОС (например, глаукома, например, первичная открытоугольная глаукома (РОАГ)). Конкретное количество, которое является терапевтически эффективным, может варьироваться в зависимости от факторов, известных в данной области, например, таких как тип расстройства или патологического процесса, история болезни и возраст пациента, стадия заболевания или патологического процесса и проведение других методов лечения.

В контексте настоящего описания термины «лечить», «лечение» и т.п. означают предотвращение, замедление, облегчение или ослабление, по меньшей мере, одного симптома, ассоциированного с заболеванием, ассоциированным с экспрессией МҮОС, или замедление или реверсирования прогрессирования или предполагаемого прогрессирования такого расстройства. Например, способы, описанные в настоящем документе, при применении для лечения глаукомы могут служить для снижения или предотвращения одного или более симптомов глаукомы, как здесь описано, или для снижения риска или тяжести сопутствующих состояний. Таким образом, если в контексте явно не указано иное, то термины «лечить», «лечение» и т.п. предназначены для охвата профилактики, например, предупреждения расстройств и/или симптомов расстройств, ассоциированных с экспрессией МҮОС. Лечение также может означать повышение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствии лечения.

Под выражением «более низкое» в контексте маркера или симптома заболевания подразумевается любое снижение, например, статистически или клинически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере, 10%, по меньшей мере, 20%, по меньшей мере, 30%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 40%, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 60%, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере, 80% или, по меньшей мере, 90%. Снижение может достигать до уровня, принятого за норму для субъекта, не страдающего таким расстройством.

В рамках настоящего изобретения, термин «МҮОС» относится к «миоцилину», соответствующей мРНК («мРНК МҮОС») или соответствующему белку («белку МҮОС»). Последовательность мРНК-транскрипта МҮОС человека показана в SEQ ID NO: 1.

II. иРНК-агенты

В настоящем документе описаны иРНК-агенты, которые модулируют (например,

ингибируют) экспрессию MYOC.

В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент активирует экспрессию MYOC в клетке или в организме млекопитающего.

В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии MYOC в клетке или у субъекта (например, у млекопитающего, например, у человека), где дцРНК включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая является комплементарной, по меньшей мере, участку мРНК, образованному при экспрессии MYOC, и где длина области комплементарности составляет 30 нуклеотидов или меньше, обычно 19-24 нуклеотидов в длину, и где дцРНК при контакте с клеткой, экспрессирующей MYOC, ингибирует экспрессию MYOC, например, по меньшей мере, на 10%, 20%, 30%, 40% или 50%.

Модуляция (например, ингибирование) экспрессии MYOC можно определить, например, ПЦР или методом на основе разветвленной ДНК (вДНК) или методом на основе белков, таким как вестерн-блоттинг. Экспрессию MYOC в культуре клеток, например, в клетках COS, клетках ARPE-19, клетках hTERT RPE-1, клетках HeLa, первичных гепатоцитах, клетках HepG2, первично культивированных клетках или в биологическом образце от субъекта можно анализировать измерением уровней мРНК MYOC, например, с использованием анализа вДНК или TaqMan, или измерением уровней белка, например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа с использованием, например, методов вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

дцРНК включает две цепи РНК, которые являются в достаточной степени комплементарными и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет использоваться дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна или полностью комплементарна последовательности-мишени, полученной из последовательности мРНК, образованной во время экспрессии гена MYOC. Другая цепь (смысловая цепь), как правило, включает область, комплементарную антисмысловой цепи, так что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как правило, дуплексная структура имеет длину от 15 до 30 включительно, в более общем случае от 18 до 25 включительно, еще в более общем случае от 19 до 24 включительно и чаще всего от 19 до 21 пары оснований включительно. Аналогичным образом, область комплементарности последовательности-мишени имеет длину от 15 до 30 включительно, в более общем случае от 18 до 25 включительно, в еще более общем случае от 19 до 24 включительно и чаще всего от 19 до 21 нуклеотида включительно.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет длину от 15 до 20 нуклеотидов включительно, и в других вариантах осуществления дцРНК имеет длину от 25 до 30 нуклеотидов включительно. Как понятно специалисту в данной области, целевая область РНК, предназначенная для расщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях «часть» мРНК-мишени

представляет собой непрерывную последовательность мРНК-мишени достаточной длины, чтобы быть субстратом для РНК-направленного расщепления (т. е. расщепления через путь RISC). дцРНК, имеющие дуплексы длиной всего 9 пар оснований, в некоторых обстоятельствах могут опосредовать иРНК-направленное расщепление РНК. Чаще всего мишень имеет длину, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, например, 15-30 нуклеотидов.

Специалисту в данной области также будет понятно, что дуплексная область является основным функциональным участком дцРНК, например, дуплексная область от 9 до 36, например, 15-30 пар оснований. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, в той мере, в какой он становится процессированным до функционального дуплекса, например, из 15-30 пар оснований, который нацелен на желаемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющий дуплексный участок более 30 пар оснований представляет собой дцРНК. Таким образом, специалисту с обычной квалификацией в данной области будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления миРНК представляет собой дцРНК. В некоторых вариантах осуществления дцРНК не является встречающейся в природе миРНК. В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент, пригодный для нацеливания на экспрессию МҮОС, не образуется в клетке-мишени путем расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, описанная здесь, может дополнительно включать один или более одноцепочечных нуклеотидных выступов. дцРНК можно синтезировать стандартными способами, известными в данной области, как дополнительно обсуждается ниже, например, с использованием автоматического синтезатора ДНК, такого как коммерчески доступный, например, производства компании Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

В некоторых вариантах осуществления МҮОС представляет собой МҮОС человека.

В конкретных вариантах осуществления дцРНК содержит смысловую цепь, которая содержит или состоит из последовательности смысловой цепи, выбранной из смысловых последовательностей, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В, и антисмысловую цепь, которая содержит или состоит из последовательности антисмысловой цепи, выбранной из последовательностей антисмысловой цепи, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В.

В некоторых аспектах дцРНК будет включать, по меньшей мере, нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой цепи, где смысловая цепь выбрана из последовательностей, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В, и соответствующая антисмысловая цепь выбрана из последовательностей, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В.

В этих аспектах одна из двух последовательностей является комплементарной другой из двух последовательностей, где одна из последовательностей по существу является комплементарной последовательности мРНК, генерируемой при экспрессии МҮОС. Таким образом, дцРНК будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая цепь, и второй олигонуклеотид описывается как соответствующая антисмысловая цепь. Как описано в других местах настоящего

документа и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности дцРНК также могут находиться в виде самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не в виде отдельных олигонуклеотидов.

Специалисту в данной области техники хорошо известно, что дцРНК, имеющие дуплексную структуру, состоящую из 20-23, и конкретно 21, пар оснований, признаны особенно эффективными в индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO, 2001, 20:6877-6888). Однако другие авторы обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными.

В вариантах осуществления, описанных выше, в силу природы олигонуклеотидных последовательностей, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В, описанные здесь дцРНК могут включать, по меньшей мере, одну цепь длиной минимально 19 нуклеотидов. Можно разумно ожидать, что более короткие дуплексы, содержащие одну из последовательностей, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В, за вычетом всего нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, будут столь же эффективны по сравнению с дцРНК, описанной выше.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет неполную последовательность, по меньшей мере, из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более последовательных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет последовательность антисмысловой цепи, содержащей, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18 или 19 последовательных нуклеотидов последовательности антисмысловой цепи, представленной в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В, и последовательность смысловой цепи, содержащей, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18 или 19 последовательных нуклеотидов соответствующей последовательности смысловой цепи, представленной в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК содержит последовательность антисмысловой цепи, которая содержит, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 последовательных нуклеотидов последовательности антисмысловой цепи, представленной в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В, и последовательность смысловой цепи, содержащей, по меньшей мере, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 последовательных нуклеотидов соответствующей последовательности смысловой цепи, представленной в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В.

В некоторых таких вариантах осуществления дцРНК, несмотря на то, что содержит только фрагмент последовательностей, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В, одинаково эффективно ингибирует уровень экспрессии МУОС, как и дцРНК, которая содержит полноразмерные последовательности, представленные в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А или 5В. В некоторых вариантах осуществления дцРНК отличается в ингибировании уровня экспрессии МУОС не более чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% по сравнению с дцРНК, содержащей полную последовательность, раскрытую в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, содержит антисмысловую цепь, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, содержит смысловую цепь, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, или 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

мРНК MYOC человека может иметь последовательность SEQ ID NO: 1, представленную в настоящем документе.

мРНК миоцилина *Homo sapiens* (MYOC)

GAGCCAGCAAGGCCACCCATCCAGGCACCTCTCAGCACAGCAGAGCTTTCCA
GAGGAAGCCTCACCAAGCCTCTGCAATGAGGTTCTTCTGTGCACGTTGCTGCAGCTT
TGGGCCTGAGATGCCAGCTGTCCAGCTGCTGCTTCTGGCCTGCCTGGTGTGGGATGT
GGGGGCCAGGACAGCTCAGCTCAGGAAGGCCAATGACCAGAGTGGCCGATGCCAGT
ATACCTTCAGTGTGGCCAGTCCCAATGAATCCAGCTGCCCAGAGCAGAGCCAGGCC
ATGTCAGTCATCCATAACTTACAGAGAGACAGCAGCACCCAACGCTTAGACCTGGA
GGCCACCAAAGCTCGACTCAGCTCCCTGGAGAGCCTCCTCCACCAATTGACCTTGGA
CCAGGCTGCCAGGCCCCAGGAGACCCAGGAGGGGCTGCAGAGGGAGCTGGGCACC
CTGAGGCGGGAGCGGGACCAGCTGGAAACCCAAACCAGAGAGTTGGGAGACTGCCT
ACAGCAACCTCCTCCGAGACAAGTCAGTTCTGGAGGAAGAGAAGAAGCGACTAAGG
CAAGAAAATGAGAATCTGGCCAGGAGGTTGGAAAGCAGCAGCCAGGAGGTAGCAA
GGCTGAGAAGGGGCCAGTGTCCCCAGACCCGAGACACTGCTCGGGCTGTGCCACCA
GGCTCCAGAGAAGTTTCTACGTGGAATTTGGACACTTTGGCCTTCCAGGAAGTGAAG
TCCGAGCTAACTGAAGTTCCTGCTTCCCGAATTTTGAAGGAGAGCCCATCTGGCTAT
CTCAGGAGTGGAGAGGGAGACACCGGATGTGGAGAACTAGTTTGGGTAGGAGAGC
CTCTCACGCTGAGAACAGCAGAAACAATTACTGGCAAGTATGGTGTGTGGATGCGA
GACCCCAAGCCACCTACCCCTACACCCAGGAGACCACGTGGAGAATCGACACAGT
TGGCACGGATGTCCGCCAGGTTTTTTGAGTATGACCTCATCAGCCAGTTTATGCAGGG
CTACCCTTCTAAGGTTACATACTGCCTAGGCCACTGGAAAGCACGGGTGCTGTGGT
GTA CT CGGGGAGCCTCTATTTCCAGGGCGCTGAGTCCAGAACTGTCATAAGATATGA
GCTGAATACCGAGACAGTGAAGGCTGAGAAGGAAATCCCTGGAGCTGGCTACCACG
GACAGTTCCCGTATTCTTGGGGTGGCTACACGGACATTGACTTGGCTGTGGATGAAG
CAGGCCTCTGGGTCATTTACAGCACCGATGAGGCCAAAGGTGCCATTGTCCTCTCCA
AACTGAACCCAGAGAATCTGGAACTCGAACAACCTGGGAGACAAACATCCGTAAG
CAGTCAGTCGCCAATGCCTTCATCATCTGTGGCACCTTGTACACCGTCAGCAGCTAC
ACCTCAGCAGATGCTACCGTCAACTTTGCTTATGACACAGGCACAGGTATCAGCAAG
ACCCTGACCATCCCATTCAGAACCCTGCTATAAGTACAGCAGCATGATTGACTACAAC
CCCCTGGAGAAGAAGCTCTTTGCCTGGGACAACCTTGAACATGGTCACTTATGACATC
AAGCTCTCCAAGATGTGAAAAGCCTCCAAGCTGTACAGGCAATGGCAGAAGGAGAT
GCTCAGGGCTCCTGGGGGGAGCAGGCTGAAGGGAGAGCCAGCCAGCCAGGGCCCA

GGCAGCTTTGACTGCTTTCCAAGTTTTTCATTAATCCAGAAGGATGAACATGGTCACC
 ATCTAACTATTCAGGAATTGTAGTCTGAGGGCGTAGACAATTTTCATATAATAAATAT
 CCTTTATCTTCTGTGTCAGCATTTATGGGATGTTTAATGACATAGTTCAAGTTTTCTTGT
 GATTTGGGGCAAAGCTGTAAGGCATAATAGTTTCTTCCTGAAAACCATTGCTCTTG
 CATGTTACATGGTTACCACAAGCCACAATAAAAAGCATAACTTCTAAAGGAAGCAG
 AATAGCTCCTCTGGCCAGCATCGAATATAAGTAAGATGCATTTACTACAGTTGGCTT
 CTAATGCTTCAGATAGAATACAGTTGGGTCTCACATAACCCTTTACATTGTGAAATA
 AAATTTTCTTACCCAA (SEQ ID NO: 1)

Обратный комплемент SEQ ID NO: 1 представлен здесь как SEQ ID NO: 2:

TTGGGTAAGAAAATTTTATTTTACAAATGTAAAGGGTTATGTGAGACCCAACT
 GTATTCTATCTGAAGCATTAGAAGCCAACTGTAGTAAATGCATCTTACTTATATTCG
 ATGCTGGCCAGAGGAGCTATTCTGCTTCCTTTAGAAGTTATGCTTTTTATTGTGGCTT
 GTGGTAACCATGTAACATGCAAGAGCAATGGTTTTTCAGGAAGAACTATTATGCCTT
 ACAGCTTTTGCCCCAAATCACAAGAAAACCTTGAACATATGTCATTAAACATCCCATAA
 ATGCTGACAGAAGATAAAGGATATTTATTATATGAAATTGTCTACGCCCTCAGACTA
 CAATTCCTGAATAGTTAGATGGTGACCATGTTTCATCCTTCTGGATTAATGAAAACCTT
 GGAAAGCAGTCAAAGCTGCCTGGGCCCTGGCTGGCTGGCTCTCCCTTCAGCCTGCTC
 CCCCCAGGAGCCCTGAGCATCTCCTTCTGCCATTGCCTGTACAGCTTGGAGGCTTTTC
 ACATCTTGGAGAGCTTGATGTCATAAGTGACCATGTTCAAGTTGTCCCAGGCAAAGA
 GCTTCTTCTCCAGGGGGTTGTAGTCAATCATGCTGCTGTACTTATAGCGGTTCTTGAA
 TGGGATGGTCAGGGTCTTGCTGATACCTGTGCCTGTGTCATAAGCAAAGTTGACGGT
 AGCATCTGCTGAGGTGTAGCTGCTGACGGTGTACAAGGTGCCACAGATGATGAAGG
 CATTGGCGACTGACTGCTTACGGATGTTTGTCTCCCAGGTTTGTTTCGAGTTCCAGATT
 CTCTGGGTTCAGTTTGGAGAGGACAATGGCACCTTTGGCCTCATCGGTGCTGTAAAT
 GACCCAGAGGCCTGCTTCATCCACAGCCAAGTCAATGTCCGTGTAGCCACCCCAAG
 AATACGGGAACTGTCCGTGGTAGCCAGCTCCAGGGATTTCTTCTCAGCCTTCACTG
 TCTCGGTATTTCAGCTCATATCTTATGACAGTTCTGGACTCAGCGCCCTGGAAATAGA
 GGCTCCCCGAGTACACCACAGCACCCGTGCTTTCCAGTGGCCTAGGCAGTATGTGAA
 CCTTAGAAGGGTAGCCCTGCATAAACTGGCTGATGAGGTCATACTCAAAAACCTGG
 CGGACATCCGTGCCAACTGTGTCGATTCTCCACGTGGTCTCCTGGGTGTAGGGGTAG
 GTGGGCTTGGGGTCTCGCATCCACACACCATACTTGCCAGTAATTGTTTCTGCTGTTT
 TCAGCGTGAGAGGCTCTCCTACCCAACTAGTTCTCCACATCCGGTGTCTCCCTCTCC
 ACTCCTGAGATAGCCAGATGGGCTCTCCTTCAAAATTCGGGAAGCAGGAACCTCAGT
 TAGCTCGGACTTCAGTTCCTGGAAGGCCAAAGTGTCCAAATTCACGTAGAACTTC
 TCTGGAGCCTGGTGGCACAGCCCGAGCAGTGTCTCGGGTCTGGGGACACTGGCCCCCT
 TCTCAGCCTTGCTACCTCCTGGCTGCTGCTTTCCAACCTCCTGGCCAGATTCTCATTT
 TCTTGCCTTAGTCGCTTCTTCTCTTCCAGAACTGACTTGTCTCGGAGGAGGTTGC
 TGTAGGCAGTCTCCAACTCTCTGGTTTGGGTTTCCAGCTGGTCCCGCTCCCGCCTCAG
 GGTGCCCAGCTCCCTCTGCAGCCCCTCCTGGGTCTCCTGGGGCCTGGCAGCCTGGTC
 CAAGGTCAATTGGTGGAGGAGGCTCTCCAGGGAGCTGAGTCGAGCTTTGGTGGCCT

CCAGGTCTAAGCGTTGGGTGCTGCTGTCTCTCTGTAAGTTATGGATGACTGACATGG
 CCTGGCTCTGCTCTGGGCAGCTGGATTCATTGGGACTGGCCACACTGAAGGTATACT
 GGCATCGGCCACTCTGGTCATTGGCCTTCCTGAGCTGAGCTGTCCTGGCCCCCACAT
 CCCACACCAGGCAGGCCAGAAGCAGCAGCTGGACAGCTGGCATCTCAGGCCCAAAG
 CTGCAGCAACGTGCACAGAAGAACCTCATTGCAGAGGCTTGGTGAGGCTTCCTCTG
 GAAAGCTCTGCTGTGCTGAGAGGTGCCTGGATGGGTGGCCTTGCTGGCTC (SEQ ID
 NO: 2)

В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, включает, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В, и необязательно может быть соединена с дополнительными последовательностями нуклеотидов, взятыми из области, примыкающей к выбранной последовательности в МУОС.

Несмотря на то, что последовательность-мишень обычно имеет длину 15-30 нуклеотидов, существуют широкие различия в пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для направления расщеплением любой заданной РНК-мишени. Различные программные пакеты и рекомендации, изложенные в настоящем документе, обеспечивают руководство по идентификации оптимальных последовательностей-мишеней для любого заданного гена-мишени, но также можно использовать эмпирический подход, в котором «окно» или «маска» заданного размера (в качестве неограничивающего примера, 21 нуклеотид) в прямом или переносном смысле (включая, например, *in silico*) помещают на последовательность-мишень РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить целевыми последовательностями. Путем последовательного перемещения «окна» последовательности на один нуклеотид вверх или вниз от исходного местоположения последовательности-мишени можно идентифицировать следующую потенциальную последовательность-мишень до тех пор, пока не будет идентифицирован полный набор возможных последовательностей для любого заданного выбранного размера мишени. Этот процесс в сочетании с систематическим синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с использованием анализов, описанных в настоящем документе или известных в данной области) для идентификации тех последовательностей, которые работают оптимально, может идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании с помощью агента иРНК опосредуют наилучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, предполагается, что дальнейшая оптимизация эффективности ингибирования может быть достигнута за счет постепенного «перемещения окна» на один нуклеотид выше или ниже данных последовательностей для идентификации последовательностей с равными или лучшими характеристиками ингибирования.

Кроме того, полагается, что для любой последовательности, идентифицированной, например, в Таблицах 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В, дальнейшая оптимизация может быть достигнута путем систематического добавления или удаления нуклеотидов для

создания более длинных или более коротких последовательностей и их тестирования и последовательностей, полученных перемещением окна более длинного или более короткого размера вверх или вниз по целевой РНК из этой точки. Вновь, объединение этого подхода для создания новых потенциальных мишеней с проверкой эффективности иРНК на основе этих последовательностей-мишеней в анализе ингибирования, как известно в данной области или как описано в настоящем документе, может привести к дальнейшему повышению эффективности ингибирования. Более того, такие оптимизированные последовательности можно регулировать, например, введением модифицированных нуклеотидов, как описано в настоящем документе или как известно в данной области, добавлением или изменением выступающего конца или другими модификациями, известными в данной области и/или обсуждаемыми в настоящем документе, для дальнейшей оптимизации молекулы (например, повышение стабильности в сыворотке или периода полураспада в кровотоке, повышение термостабильности, усиление трансмембранной доставки, нацеливание на определенное место или тип клеток, усиление взаимодействия с ферментами пути молчания, усиление высвобождения из эндосом и т. д.) в качестве ингибитора экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления в описании представлена немодифицированная или неконъюгированная иРНК из любой из Таблиц 2В, 3В, 4В или 5В. В некоторых вариантах осуществления ИРНК-агент по настоящему изобретению имеет нуклеотидную последовательность, представленную в любой из Таблиц 2А, 3А, 4А и 5А, но не содержит одного или более лигандов или групп, показанных в Таблице. Лиганд или группа (например, липофильный лиганд или липофильная группа) могут быть включены в любое из положений, предусмотренных в настоящей заявке.

иРНК, описанная в настоящем документе, может содержать одно или более несовпадений с последовательностью-мишенью. В некоторых вариантах осуществления иРНК, описанная в настоящем документе, содержит не более 3 несовпадений. В некоторых вариантах осуществления, когда антисмысловая цепь иРНК содержит несовпадения с последовательностью-мишенью, область несовпадения расположена не в центре области комплементарности. В некоторых вариантах осуществления, когда антисмысловая цепь иРНК содержит несовпадения с последовательностью-мишенью, несовпадение ограничивается последними 5 нуклеотидами либо из 5'-, либо из 3'-конца области комплементарности. Например, для цепи РНК ИРНК-агента из 23 нуклеотидов, которая комплементарна участку МУОС, цепь РНК обычно не содержит какого-либо несовпадения в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области, могут быть использованы для определения того, насколько эффективна иРНК, содержащая несовпадение с последовательностью-мишенью, для ингибирования экспрессии МУОС. Рассмотрение эффективности иРНК с несовпадениями в ингибировании экспрессии МУОС важно, особенно если известно, что конкретная область комплементарности в гене МУОС имеет полиморфную вариабельность последовательности в пределах популяции.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один конец дцРНК имеет одноцепочечный нуклеотидный выступ из 1-4, обычно 1 или 2 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления дцРНК, имеющие, по меньшей мере, один нуклеотидный выступ, обладают высокими ингибиторными свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. В некоторых вариантах осуществления РНК в иРНК (например, дцРНК) химически модифицируют для повышения стабильности или других полезных характеристик. Нуклеиновые кислоты, описанные в раскрытии, можно синтезировать и/или модифицировать способами, хорошо разработанными в данной области, такими как способы, описанные в монографии «Current protocols in nucleic acid chemistry», Beaucage, S.L. et al. (Edr.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, USA, которая включена здесь посредством ссылки. Модификации включают, например, (а) концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгация, связывание инвертированных повторов и т.д.), 3'-концевые модификации (конъюгация, ДНК-нуклеотиды, связывание инвертированных повторов и т.д.); (b) модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары оснований с более широким репертуаром партнеров, удаление оснований (нуклеотиды с удаленным азотистым основанием) или конъюгированные основания; (с) модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении, наличие ациклического сахара) или замену сахара; а также (d) модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений РНК, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природных межнуклеозидных связей. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают среди прочего, остовы, которые не имеют атома фосфора в остове. Для целей настоящего описания и как иногда указывается в данной области, модифицированные РНК, которые не имеют атома фосфора в своем межнуклеозидном остове, также рассматриваются в качестве олигонуклеозидов. В конкретных вариантах осуществления модифицированная РНК может иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном остове.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метил- и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боранофосфаты, имеющие нормальные 3'-5'-связи, их аналоги с 2'-5'-связями, а также соединения с обратной полярностью, в которых соседние пары нуклеозидных звеньев связаны от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 5'-2'. Также включаются различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение вышеуказанных фосфорсодержащих соединений, включают, не ограничиваясь эти, патенты США № 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302;

5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029; и патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

Модифицированные РНК-остовы, которые не содержат атома фосфора, имеют остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероматомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Такие остовы включают остовы, имеющие морфолиновые связи (образованные частично из группы сахара нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; содержащие алкен остовы; сульфаматные остовы; метиленимино- и метиленигидразино-остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, имеющие смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

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

В других миметиках РНК, подходящих или предусмотренных для применения в иРНК, как сахар и межнуклеозидные связи, т.е. остов из нуклеотидных единиц, замещены новыми группами. Единицы, представленные основаниями, сохраняют для гибридизации с соответствующим соединением-мишенью в виде нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, которое, как было показано, обладает превосходными свойствами в отношении гибридизации, называют пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA сахарный остов РНК заменяется остовом, содержащим амиды, в частности, аминоксилотным остовом. Азотистые основания сохраняются, и они связаны прямо или опосредованно с атомами азота аза-группы в амидной части остова. Соответствующие патенты США, в которых содержатся руководства по получению соединений PNA, включают без ограничения, патенты США № 5539082, 5714331 и 5719262, каждый из которых включен здесь посредством ссылки. Описание дополнительных соединений PNA, можно найти, например, в публикации Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, описанные здесь, включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с остовами, содержащими гетероатомы,

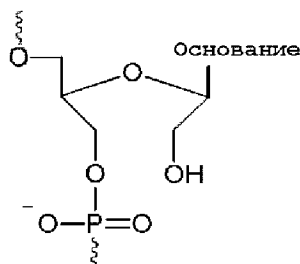
и в частности $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [известный как метилен(метилямино)- или ММІ-остов], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ и $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [где нативный фосфодиэфирный остов представлен в виде $--O--P--O--CH_2--$], описанные в вышеуказанном патенте США № 5489677, и амидные остовы, описанные в вышеуказанном патенте США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, описанные здесь, имеют структуры морфолино-остова, описанные в вышеуказанном патенте США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать одну или более замещенных групп сахара. иРНК, например, дцРНК, описанные здесь, могут содержать одну из следующих групп в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил представляют собой замещенный или незамещенный C_1-C_{10} алкил или C_2-C_{10} алкенил и C_2-C_{10} алкинил. Примеры подходящих модификаций включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m равны от 1 до примерно 10. В других вариантах дцРНК содержат одну из следующих групп в 2'-положении: C_1-C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкиларил, аминокламино, полиамин, замещенный силлил, РНК-расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических параметров иРНК или группу для улучшения фармакодинамических свойств иРНК и другие заместители, обладающие сходными свойствами. В некоторых вариантах модификация включает 2'-метоксиэтоксигруппу (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известную как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78: 486-504) т.е., алкокси-алкоксигруппу. Еще одним примером модификации является 2'-диметиламинооксиэтоксигруппа, т.е., группа $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, также известная как 2'-DMAOE, и 2'-диметиламиноэтоксигруппа (также известная в данной области как 2'-диметиламиноэтоксигруппа или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₃)₂.

В еще одних вариантах осуществления иРНК-агент содержит один или более (например, примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) ациклических нуклеотидов (или нуклеозидов). В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь или антисмысловая цепь, или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь содержат менее пяти ациклических нуклеотидов на цепь (например, четыре, три, два или один ациклический нуклеотид на цепь). Один или более ациклических нуклеотидов могут находиться, например, в двухцепочечной области смысловой или антисмысловой цепи или в обеих цепях; на 5'-конце, 3'-конце, обоих 5'- и 3'-концах смысловой или антисмысловой цепи или обеих цепях иРНК-агента. В некоторых вариантах осуществления один или более ациклических нуклеотидов присутствуют в положениях с 1 по 8 смысловой или антисмысловой цепи или в обоих положениях. В некоторых вариантах осуществления один или более ациклических нуклеотидов находятся в антисмысловой цепи в положениях с 4 по 10 (например, в положениях 6-8) от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых

вариантах осуществления один или более ациклических нуклеотидов находятся на одном или обоих 3'-концевых выступах иРНК-агента.

Термин «ациклический нуклеотид» относится к любому нуклеотиду или нуклеозиду, содержащему ациклический сахар рибозу, например, ациклическую рибозу. Иллюстративный ациклический нуклеотид или нуклеозид может включать азотистое основание, например, встречающееся в природе или модифицированное азотистое основание (например, азотистое основание, описанное в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления связь между любым из атомов углерода рибозы (C1, C2, C3, C4 или C5) независимо или в комбинации отсутствует в нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления связь между атомами углерода C2-C3 рибозного кольца отсутствует, например, ациклический 2'-3'-секо-нуклеотидный мономер. В других вариантах осуществления связь между C1-C2, C3-C4 или C4-C5 отсутствует (например, 1'-2', 3'-4' или 4'-5'-секо-нуклеотидный мономер). Примеры ациклических нуклеотидов раскрыты в патенте США № 8314227, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки. Например, ациклический нуклеотид может включать любой из мономеров D-J, представленных на фиг. 1-2 патента США № 8314227. В некоторых вариантах осуществления ациклический нуклеотид включает следующий мономер:



где основание представляет собой азотистое основание, например, встречающееся в природе или модифицированное азотистое основание (например, азотистое основание, описанное в настоящем документе).

В некоторых вариантах осуществления ациклический нуклеотид может быть модифицирован или дериватизирован, например, путем связывания ациклического нуклеотида с другой группой, например, лигандом (например, GalNAc, холестеринным лигандом), алкилом, полиамином, сахаром, полипептидом, среди прочего.

В еще одних вариантах осуществления иРНК-агент включает один или более ациклических нуклеотидов и одну или более LNA (например, LNA, как описано в настоящем документе). Например, один или более ациклических нуклеотидов и/или одна или более LNA могут присутствовать в смысловой цепи, антисмысловой цепи или в обеих. Количество ациклических нуклеотидов в одной цепи может быть таким же или отличным от количества LNA в противоположной цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и/или антисмысловая цепь содержит менее пяти LNA (например, четыре, три, две или одну LNA), расположенных в двухцепочечной области или 3'-выступе. В других вариантах осуществления одна или две LNA расположены в двухцепочечной области или в 3'-выступе смысловой цепи. Альтернативно или в сочетании смысловая цепь

и/или антисмысловая цепь содержит менее пяти ациклических нуклеотидов (например, четыре, три, два или один ациклический нуклеотид) в двухцепочечной области или 3'-выступе. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь иРНК-агента содержит одну или две LNA в 3'-выступе смысловой цепи и один или два ациклических нуклеотида в двухцепочечной области антисмысловой цепи (например, в положениях 4-10 (например, в положениях 6-8) от 5'-конца антисмысловой цепи) иРНК-агента.

В еще одних вариантах осуществления включение одного или более ациклических нуклеотидов (отдельно или в дополнение к одной или более LNA) в иРНК-агенте приводит к одному или более (или всем) из: (i) снижения нецелевого эффекта; (ii) снижения участия цепи-пассажира в иРНК; (iii) повышения специфичности направляющей цепи к ее мРНК-мишени; (iv) снижения нецелевого эффекта микроРНК; (v) повышения стабильности; или (vi) повышения устойчивости к деградации молекулы иРНК.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Сходные модификации также могут быть получены в других положениях РНК в иРНК, в частности в 3'-положении сахара в 3'-концевом нуклеотиде или в 2'-5'-связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. иРНК также могут содержать миметики сахара, такие как циклобутильные группы, вместо сахара пентофуранозила. Репрезентативные патенты США, в которых описывается получение таких структур модифицированного сахара, включают, не ограничиваясь этим, патенты США № 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633 и 5700920, авторы некоторых из которых также являются авторами настоящей заявки, и содержание каждого из указанных патентов в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

иРНК по настоящему изобретению также может содержать модификации или замещения азотистых оснований (часто называемых в данной области просто «основаниями»). В рамках настоящего изобретения, «немодифицированные» или «природные» азотистые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные азотистые основания включают другие синтетические и природные азотистые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-дезааденин и 3-деазагуанин и 3-дезааденин.

Дополнительные азотистые основания включают основания, описанные в патенте

США № 3687808, основания, раскрытые в публикации «Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine», Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; основания, раскрытые в публикации «The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, pages 858-859, Kroschwitz J. L, ed. John Wiley and Sons, 1990, основания, раскрытые в публикации Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, и основания, раскрытые в публикации Sanghvi Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke S. T. and Lebleu B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из таких азотистых оснований являются особенно пригодными для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, описанных здесь. Такие основания включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и 0-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Было показано, что замены 5-метилцитозином повышают стабильность дуплексов нуклеиновых кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi Y. S., Crooke S. T. and Lebleu B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), и являются примером замен оснований, еще более предпочтительно в сочетании с 2'-О-метоксиэтил-модификациями сахара.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение некоторых из вышеуказанных модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований, включают, не ограничиваясь этим, упомянутые выше патенты США № 3687808, 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672 и 7495088, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

РНК в иРНК по настоящему изобретению также можно модифицировать, включив в нее одну или более групп бициклического сахара. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное мостиковым соединением из двух атомов. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, имеющий группу сахара, содержащую мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, тем самым образуя бициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления агент по настоящему изобретению может включать одну или более закрытых нуклеиновых кислот (LNA) (также относится здесь к «закрытым нуклеотидам»). В некоторых вариантах осуществления закрытая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированную группу рибозы, в которой группа рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Эта структура эффективно «запирает» рибозу в структурной 3'-эндо-конформации. Было показано, что добавление закрытых нуклеиновых кислот к миРНК повышает стабильность миРНК в сыворотке и снижает нецелевые побочные эффекты (Elmen J. et al. (2005) *Nucleic Acids Research*, 33(1):439-447; Mook O.R. et al. (2007) *Mol. Canc. Ther.*, 6(3):833-843, Grunweller A. et al. (2003) *Nucleic Acids Research*, 31(12):3185-3193).

Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах по настоящему изобретению включают, без ограничения, нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотидные агенты по настоящему изобретению включают один или более бициклических нуклеозидов, содержащих 4' к 2' мостик. Примеры таких бициклических нуклеозидов, соединенных 4' к 2' мостиком, включают, не ограничиваясь этим, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (LNA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также обозначенный как «ограниченный этилом» или «cEt») и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и их аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию заявки на патент США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C₁-C₁₂ алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Содержание каждого из вышеперечисленных документов включено здесь посредством ссылки. Дополнительные репрезентативные патенты США и публикации патентов США, в которых описано получение закрытых нуклеиновых кислот, включают, не ограничиваясь этим, следующие: патенты США № 6268490; 6670461; 6794499; 6998484; 7053207; 7084125; 7399845 и 8314227, каждый из которых в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки. Иллюстративные LNA включают, не ограничиваясь этим, 2', 4'-С метиленбициклонуклеотид (см., например, Wengel et al., PCT 5 публикация международной заявки WO 00/66604 и WO 99/14226).

Любой из вышеуказанных бициклических нуклеозидов может быть получен с одной или более стереохимическими конфигурациями сахаров, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНКи-агент по настоящему изобретению также можно модифицировать для включения одного или более конформационно ограниченных этилом нуклеотидов. В рамках настоящего изобретения, термин «конформационно ограниченный этилом нуклеотид» или «cEt» представляет собой закрытую нуклеиновую кислоту, содержащую группу бициклического сахара, включающую мостик 4'-CH(CH₃)-O-2'. В одном варианте осуществления конформационно ограниченный этилом нуклеотид находится в S-конформации, именуемой здесь «S-cEt».

РНКи-агент по настоящему изобретению также может включать один или более «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2' и C4' атомы углерода рибозы или C3' и C5' атомы углерода рибозы. CRN «запирает» кольцо рибозы в стабильной конформации и увеличивает аффинность гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину, чтобы поместить кислород в оптимальное положение для обеспечения стабильности и сродства, что приводит к меньшему искривлению рибозного кольца.

Репрезентативные публикации, в которых описано получение некоторых из вышеуказанных CRN, включают, не ограничиваясь этим, US 2013/0190383; и WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых включено здесь посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления РНК-агент по настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (незакрытая нуклеиновая кислота). UNA представляет собой незакрытую ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой любая из связей сахара удалена, образуя незакрытый «сахарный» остаток. В одном примере UNA также включает мономер с удаленными связями между C1'-C4' (т.е. ковалентная связь углерод-кислород-углеродная связь между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере удалена связь C2'-C3' (т.е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') сахара (см. публикации Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) и Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039).

Репрезентативные публикации патентных документов США, в которых описано получение UNA, включают, помимо прочего, патент США № 8314227; и публикации заявок на патент США 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых настоящим включено сюда посредством ссылки.

В еще одних вариантах осуществления средства иРНК-агенты включают один или более (например, примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) нуклеотидов G-скользящего «зажима». Нуклеотид G-скользящего «зажима» представляет собой модифицированный аналог цитозина, в котором модификации придают способность связывать водородными связями обе стороны Уотсона-Крика и Хугстина комплементарного гуанина внутри дуплекса, см., например, Lin and Matteucci, 1998, J. Am. Chem. Soc., 120, 8531-8532. Замена одного аналога G-«зажима» в олигонуклеотиде может привести к существенному повышению термостабильности спирали и различению несовпадений при гибридизации с комплементарными олигонуклеотидами. Включение таких нуклеотидов в молекулы иРНК может привести к повышенной аффинности и специфичности к нуклеиновым кислотам-мишеням, комплементарным последовательностям или матричным цепям.

Потенциально стабилизирующие модификации концов молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-NHAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-NHAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (простой эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и другие. Описание этой модификации можно найти в WO 2011/005861.

Другие модификации РНК-агента по настоящему изобретению включают 5'-фосфат или 5'-миметик фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата в антисмысловой цепи РНК-агента. Подходящие миметики фосфата описаны, например, в заявке на патент США 2012/0157511, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

Мотивы иРНК

В некоторых аспектах изобретения двухцепочечные РНК-агенты по изобретению

включают агенты с химическими модификациями, как описано, например, в WO 2013/075035, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки. Как здесь показано и в WO 2013/075035, один или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах могут быть введены в смысловую цепь или антисмысловую цепь РНК-агента, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь РНК-агента могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает паттерн модификации, если он присутствует, смысловой или антисмысловой цепи. РНК-агент можно необязательно конъюгировать с липофильной группой или лигандом, например C16 группой или лигандом, например, в смысловой цепи. РНК-агент может быть необязательно модифицирован модификацией (S)-гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA), например, в одном или более остатках антисмысловой цепи. Полученные РНК-агенты могут обладать повышенной активностью в сайленсинге генов.

В некоторых вариантах осуществления последовательность смысловой цепи может быть представлена формулой (I):



где:

каждый из i и j независимо равен 0 или 1;

каждый из p и q независимо равен 0-6;

каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному 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;

где N_b и Y не имеют одинаковых модификаций; и

XXX , YYY и ZZZ , каждый независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. В некоторых вариантах осуществления все YYY представляет собой 2'-F- модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления N_a и/или N_b содержат модификации в чередующемся паттерне.

В некоторых вариантах осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или рядом с ним. Например, когда РНК-агент имеет дуплексную область длиной 17-23 нуклеотида, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или рядом с ним (например, может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) смысловой цепи, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца; или, необязательно нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца.

В еще одних вариантах осуществления i равен 1, и j равен 0, или i равен 0, и j равен

1, или оба i и j равны 1. Таким образом, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

$5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' (Ib);$

$5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3' (Ic);$ или

$5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' (Id).$

Когда смысловая цепь представлена формулой (Ib), то N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 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 смысловая цепь представлена формулой (Ic), то 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 независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

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

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

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

$5' n_p-N_a-YYY-N_a-n_q 3' (Ia).$

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

В некоторых вариантах осуществления последовательность антисмысловой цепи РНКи может быть представлена формулой (II):

$5' n_q'-N_a'-(Z'Z'Z')k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(X'X'X')l-N_a'-n_p' 3'(II)$

где:

k и l каждый независимо равен 0 или 1;

p' и q' каждый независимо равен 0-6;

каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит, по меньшей мере, два по-разному 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;
 где N_b' и Y' не имеют одинаковых модификаций;
 и $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$, каждый независимо, представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах.

В некоторых вариантах осуществления Na' и/или Nb' содержат модификации в чередующемся паттерне.

Мотив $Y'Y'Y'$ находится в сайте расщепления антисмысловой цепи или рядом с ним. Например, когда РНК-агент имеет дуплексную область длиной 17-23 нуклеотида, то мотив $Y'Y'Y'$ может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; или 13, 14, 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца. Предпочтительно мотив $Y'Y'Y'$ находится в положениях 11, 12, 13.

В некоторых вариантах осуществления мотив $Y'Y'Y'$ представляет собой все 2'-ОМe-модифицированные нуклеотиды.

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

Таким образом, антисмысловую цепь можно представить следующими формулами:

$5'-n_q'-Na'-Z'Z'Z'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-n_p' 3'$ (IIb);

$5' n_q'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-X'X'X'-n_p' 3'$ (IIc); или

$5' n_q'-Na'-Z'Z'Z'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-X'X'X'-Na'-n_p' 3'$ (IId).

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

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIc), то Nb' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления Nb' представляет собой 0; 1; 2; 3; 4; 5 или 6.

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

$5' n_p'-Na'-Y'Y'Y'-Na'-n_q' 3'$ (Ia).

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

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

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, GNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом,

2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. В частности, каждый X, Y, Z, X', Y' и Z' может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь РНКи-агента может содержать мотив YYY, находящийся в положениях 9, 10 и 11 цепи, когда дуплексная область составляет 21 нуклеотид, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве крыльевых модификаций на противоположном конце дуплексной области; и XXX и ZZZ, каждый независимо, представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь может содержать мотив Y'Y'Y', находящийся в положениях 11, 12, 13 цепи, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области 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' в качестве крыльевых модификаций на противоположном конце дуплексной области; и X'X'X' и Z'Z'Z', каждый независимо представляет собой 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию.

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

Следовательно, РНКи-агенты для применения в способах по настоящему изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых содержит от 14 до 30 нуклеотидов, где дуплекс РНКи представлен формулой (III):

смысловая цепь: $5' \text{ } n_p\text{-}N_a\text{-(XXX)}_i\text{-}N_b\text{-}YYY\text{-}N_b\text{-(ZZZ)}_j\text{-}N_a\text{-}n_q\text{ } 3'$

антисмысловая цепь: $3' \text{ } n_{p'}\text{-}N_{a'}\text{-(X'X'X')}_{k'}\text{-}N_{b'}\text{-}Y'Y'Y'\text{-}N_{b'}\text{-(Z'Z'Z')}_{l'}\text{-}N_{a'}\text{-}n_{q'}\text{ } 5'$ (III)

где:

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

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

каждый N_a и $N_{a'}$ независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит, по меньшей мере, два по-разному модифицированных нуклеотида;

каждый N_b и $N_{b'}$ независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

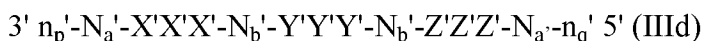
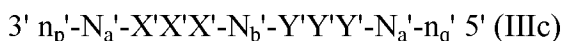
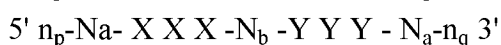
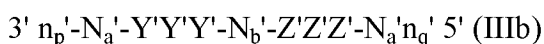
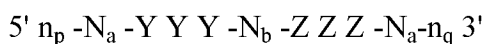
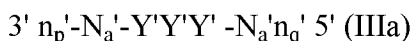
где:

каждый n_p , $n_{p'}$, n_q и $n_{q'}$, каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, и независимо представляет собой нуклеотидный выступ; и

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

В некоторых вариантах осуществления i равен 0, и j равен 0; или i равен 1 и j равен 0; или i равен 0, и j равен 1; или оба i и j равны 0; или оба i и j равны 1. В другом варианте осуществления k равен 0, и l равен 0; или k равен 1, и l равен 0; k равен 0, и l равен 1; или оба k и l равны 0; или оба k и l равны 1.

Примеры комбинаций смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс РНКи, включают следующие формулы:



Когда РНКи-агент представлен формулой (IIIa), то каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНКи-агент представлен формулой (IIIb), то каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНКи-агент представлен формулой (IIIc), то каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНКи-агент представлен формулой (IIId), то каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации в чередующемся паттерне.

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

Когда РНКи-агент представлен формулами (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), то, по меньшей мере, один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. Альтернативно, по меньшей мере, два нуклеотида Y образуют пары

оснований с соответствующими нуклеотидами Y' ; или все три нуклеотида Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y' .

Когда РНК-агент представлен формулой (IIIb) или (IIIc), то, по меньшей мере, один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z' . Альтернативно, по меньшей мере, два нуклеотида Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z' ; или все три нуклеотида Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z' .

Когда РНК-агент представлен формулой (IIIc) или (IIIe), то, по меньшей мере, один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X' . Альтернативно, по меньшей мере, два нуклеотида X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X' ; или все три нуклеотида X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X' .

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

В некоторых вариантах осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (IIIe), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию. В некоторых вариантах осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (IIIe), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, и $n_p' > 0$, и, по меньшей мере, один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (IIIe), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, $n_p' > 0$, и, по меньшей мере, один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одной или более группами или лигандами (например, с одной или более липофильными группами или одной или более C16 группами, или одной или более GalNa-группами), присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. В некоторых вариантах осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (IIIe), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, $n_p' > 0$, и, по меньшей мере, один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь, смысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одной или более группами или лигандами (например, с одной или более липофильными группами или одной или более C16 группами, или одной или более GalNa-группами), присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В некоторых вариантах осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (IIIa), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, $n_p' > 0$, и, по меньшей мере, один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь, смысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну

фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одной или более группами или лигандами (например, с одной или более липофильными группами или одной или более C16 группами, или одной или более GalNa-группами), присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В некоторых вариантах осуществления, РНКи-агент представляет собой мультимер, содержащий, по меньшей мере, два дуплекса, представленных формулами (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулами (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В некоторых вариантах осуществления два РНКи-агента, представленные формулами (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), связаны друг с другом на 5'-конце, и один или оба на 3'-конце и необязательно конъюгированы с лигандом. Каждый из агентов может быть нацелен на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из агентов может быть нацелен на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В различных патентных публикациях описываются мультимерные РНКи-агенты, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520; и патент США № 7858769, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

Как более подробно описано ниже, РНКи-агент, который содержит конъюгации одной или более углеводных групп с РНКи-агентом, может иметь оптимизированные одно или более свойств РНКи-агента. Во многих случаях углеводная группа будет присоединена к модифицированной субъединице РНКи-агента. Например, сахар рибозу одной или более рибонуклеотидных субъединиц дцРНК-агента можно заместить другими группами, например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой сахар рибоза субъединицы замещен таким образом, относится в настоящем описании к субъединице модификации замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую систему, т.е. все атомы кольца представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую систему, т.е. один или более атомов кольца могут представлять собой гетероатом, например, азот, кислород, серу. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую систему или может содержать два или более колец, например,

конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную циклическую систему, или он может содержать одну или более двойных связей.

Лиганд может быть связан с полинуклеотидом через носитель. Носители содержат (i) по меньшей мере, одну «точку присоединения в остове», например, две «точки присоединения в остове» и (ii) по меньшей мере, одну «связывающую точку присоединения». В рамках настоящего изобретения, «точка присоединения в остове» относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или, как правило, доступной связи, и которая является подходящей для введения носителя в остов, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, серусодержащий остов рибонуклеиновой кислоты. «Связывающая точка присоединения» (ТАР) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в состав кольца атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который представляет собой точку присоединения в остове), которая соединяет выбранную группу. Группа может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранная группа соединена посредством промежуточной связи с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто содержит функциональную группу, например, аминогруппу или, как правило, обеспечивает связь, которая является подходящей для введения или связывания другой химической структуры, например, лиганда с компонентом кольца.

РНКи-агенты можно конъюгировать с лигандом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу. Циклическая группа может быть выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина. Ациклическая группа может быть выбрана из остова серинола или остова диэтаноламина.

В некоторых конкретных вариантах осуществления РНКи-агент для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой агент, выбранный из группы агентов, приведенных в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 4В. Эти агенты могут дополнительно содержать лиганд. Лиганд может быть присоединен к смысловой цепи, антисмысловой цепи или обоим цепям, на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах. Например, лиганд может быть конъюгирован со смысловой цепью, в частности, с 3'-концом смысловой цепи.

Конъюгаты иРНК

иРНК-агенты, раскрытые в настоящем документе, могут находиться в форме конъюгатов. Конъюгат может быть присоединен в любом подходящем месте молекулы иРНК, например, на 3'-конце или 5'-конце смысловой или антисмысловой цепи. Конъюгаты необязательно присоединены через линкер.

В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент, описанный в настоящем

документе, химически связан с одним или несколькими лигандами, группами или конъюгатами, которые могут придавать функциональные свойства, например, посредством воздействия (например, усиления) на активность, клеточное распределение или поглощение иРНК клетками. Такие группы включают, без ограничения, липидные группы, такие как группа холестерина (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), хелевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4: 1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-тримитилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3: 2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 533-538), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651-3654; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777-3783), полиамин или цепь полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides and Nucleotides*, 1995, 14: 969-973) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651-3654), группу пальмитила (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229-237) или группу октадециламина или группу гексиламинокарбонилноксистерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277: 923-937).

В некоторых вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или период полураспада иРНК-агента, в который он включен. В некоторых вариантах лиганд обеспечивает повышенную аффинность по отношению к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клеточному или органному компартменту, ткани, органу или области тела, например, по сравнению с молекулами, в которых такой лиганд отсутствует. Типичные лиганды не будут принимать участия в спаривании дуплекса в образующей дуплекс нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающиеся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола-ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли(L-лактид-глицерид), сополимер дивиниловый эфир-малеиновый ангидрид, сополимер N-(2-гидроксипропил)метакриламид (НМРА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, полиаминовый псевдопептид, полиаминовый пептидомиметик, дендримерный полиамин, аргинин,

амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или α -спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например агент, нацеленный на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркаляторы (например, акридины), поперечные линкеры (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилосигексильную 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 конъюгаты пептидов (например, пептида antennapedia, пептида Tat), алкилирующие агенты, фосфат, amino-, меркапто-, ПЭГ (например, ПЭГ-40K), MPEG, [MPEG]₂, полиамино-, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, облегчающие транспорт/всасывание (например, аспирин, витамин Е, фолиевая кислота), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридина-имидазола, комплексы Eu(3+) тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеиды, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфичной аффинностью по отношению к колиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с конкретным типом клеток, таким как клетка глаза. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Лиганды также могут включать непептидные молекулы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Лигандом может быть, например, липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF- κ B.

Лигандом может быть соединение, например, лекарственное средство, которое может увеличивать захват иРНК-агента в клетку, например, за счет разрушения клеточного цитоскелета, например, за счет разрушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов

и/или промежуточных филаментов. Лекарственным средством может быть, например, таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джаплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, присоединенный к иРНК, которая здесь описана, функционирует в качестве фармакокинетического модулятора (РК-модулятора). РК-модуляторы включают липофильные вещества, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие агенты, ПЭГ, витамины и т.д. Примеры РК-модуляторов включают, без ограничения, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат многочисленные фосфоротиоатные связи, связываются с сывороточным белком, так, что короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды длиной примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие многочисленные фосфоротиоатные связи в остове, также подходят для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, сывороточные белки) также подходят для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в вариантах осуществления, описанных здесь.

Конъюгированные с лигандом иРНК по изобретению можно синтезировать с использованием олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, такую как функциональная группа, полученная в результате связывания линкерной молекулы с олигонуклеотидом (описанным ниже). Такой реакционноспособный олигонуклеотид можно подвергнуть непосредственному взаимодействию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы, как несущие любую из различных защитных групп, или лигандами, которые имеют присоединенную к ним линкерную группу.

Олигонуклеотиды, используемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получить удобным и обычным образом с применением хорошо известных способов твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза является коммерчески доступным от нескольких поставщиков, включая, например, Applied Biosystems® (Foster City, Calif.). Дополнительно или альтернативно можно использовать любые другие способы такого синтеза, известные в данной области. Также известно применение аналогичных методов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

В случае олигонуклеотидов, конъюгированных с лигандами, и нуклеозидов, связанных с лигандом и молекулой, несущей специфическую последовательность по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем ДНК-синтезаторе с использованием стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут линкерную группу, предшественников лиганд-

нуклеотидов или нуклеозид-конъюгатов, которые уже несут молекулу лиганда, или строительных блоков, несущих ненуклеозидный лиганд.

В случае использования предшественников нуклеотидных конъюгатов, которые уже несут линкерную группу, обычно проводят синтез связанных в специфичную последовательность нуклеозидов и затем молекулу лиганда подвергают взаимодействию с линкерной группой с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. В некоторых вариантах олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора, используя фосфорамидиты, полученные из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и которые обычно используют для синтеза олигонуклеотидов.

А. Липофильные группы

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа представляет собой алифатическое, циклическое, такое как алициклическое, или полициклическое, такое как полиалициклическое соединение, такое как стероид (например, стерол) или линейный или разветвленный алифатический углеводород. Липофильная группа обычно может включать углеводородную цепь, которая может быть циклической или ациклической. Углеводородная цепь может содержать различные заместители или один или более гетероатомов, таких как атом кислорода или азота. Такие липофильные алифатические группы включают, без ограничения, насыщенный или ненасыщенный C_4 - C_{30} углеводород (например, C_6 - C_{18} углеводород), насыщенные или ненасыщенные жирные кислоты, парафины (например, сложные эфиры одноатомных спиртов жирных кислот и диамида жирных кислот), терпены (например, терпены C_{10} , сесквитерпены C_{15} , дитерпены C_{20} , тритерпены C_{30} и тетратерпены C_{40}) и другие полиалициклические углеводороды. Например, липофильная группа может содержать C_4 - C_{30} углеводородную цепь (например, C_4 - C_{30} алкил или C_4 - C_{30} алкенил). В некоторых вариантах осуществления липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C_6 - C_{18} углеводородную цепь (например, линейный C_6 - C_{18} алкил или C_6 - C_{18} алкенил). В некоторых вариантах осуществления липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C_{16} углеводородную цепь (например, линейный C_{16} алкил или C_{16} алкенил).

Липофильная группа может быть присоединена к РНК-агенту любым способом, известным в данной области, включая через функциональную группу, уже присутствующую в липофильной группе или введенную в РНК-агент, такую как гидроксильная группа (например, $-CO-CH_2-OH$). Функциональные группы, уже присутствующие в липофильной группе или введенные в РНК-агент, включают, не ограничиваясь этим, гидроксил, амин, карбоновую кислоту, сульфонат, фосфат, тиол, азид и алкин.

Конъюгация РНК-агента и липофильной группы может происходить, например, посредством образования простой эфирной или карбоксильной или карбамоилэфирной связи между гидроксильной и алкильной группой $R-$, алканоильной группой $RCO-$ или

замещенной карбамоильной группой RNHCO- . Алкильная группа R может быть циклической (например, циклогексил) или ациклической (например, с прямой или разветвленной цепью, насыщенной или ненасыщенной). Алкильная группа R может представлять собой бутильную, пентильную, гексильную, гептильную, октильную, нонильную, децильную, ундецильную, додецильную, тридецильную, тетрадецильную, пентадецильную, гексадецильную, гептадецильную или октадецильную группу и т.п.

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с двухцепочечным РНК-агентом через линкер, содержащий простую эфирную, тиоэфирную, карбамидную, карбонатную, аминоксвязь, амидную, малеимид-тиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол из азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат.

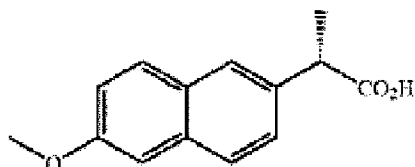
В еще одном варианте осуществления липофильная группа представляет собой стероид, такой как стерол. Стероиды представляют собой полициклические соединения, содержащие кольцевую пергидро-1,2-циклопентанофенантроновую систему. Стероиды включают, без ограничения, желчные кислоты (например, холевая кислота, дезоксихолевая кислота и дегидрохолевая кислота), кортизон, дигоксигенин, тестостерон, холестерин и катионные стероиды, такие как кортизон. «Производное холестерина» относится к соединению, полученному из холестерина, например, заменой, добавлением или удалением заместителей.

В еще одном варианте осуществления липофильная группа представляет собой ароматическую группу. В данном контексте термин «ароматическая» в широком смысле относится к моно- и полиароматическим углеводородам. Ароматические группы включают, без ограничения, $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ арильные группы, содержащие от одного до трех ароматических колец, которые могут быть необязательно замещенными; «аралкильные» или «арилалкильные» группы, содержащие арильную группу, ковалентно связанную с алкильной группой, любая из которых может быть независимо необязательно замещенной или незамещенной; и «гетероарильные» группы. В рамках настоящего изобретения, термин «гетероарил» относится к группам, имеющим от 5 до 14 атомов в кольце, предпочтительно 5, 6, 9 или 10 атомов в кольце; имеющим 6, 10 или 14 π -электронов, общих в циклическом массиве, и имеющим, в дополнение к атомам углерода, от одного до примерно трех гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из азота (N), кислорода (O) и серы (S).

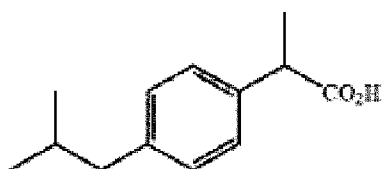
В рамках настоящего изобретения, термин «замещенный» алкил, циклоалкил, арил, гетероарил или гетероцикл представляет собой группу, содержащую от одного до примерно четырех, предпочтительно от одного до примерно трех, более предпочтительно один или два неводородных заместителя. Подходящие заместители включают, без ограничения, галоген, гидроксильный, нитро, галогеналкил, алкил, алкарил, арил, аралкил, алкокси, арилокси, амино, ациламино, алкилкарбамоил, арилкарбамоил, аминоалкил, алкоксикарбонил, карбокси, гидроксильный алкил, алкансульфонил, аренсульфонил, алкансульфонамидо, аренсульфонамидо, аралкилсульфонамидо, алкилкарбонил, ацилокси, циано и уреидогруппы.

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа представляет собой аралкильную группу, например, 2-арилпропаноил. Структурные свойства аралкильной группы выбраны таким образом, чтобы липофильная группа связывалась, по меньшей мере, с одним белком *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления структурные свойства аралкильной группы выбраны таким образом, чтобы липофильная группа связывалась с сывороточными, сосудистыми или клеточными белками. В некоторых вариантах осуществления структурные свойства аралкильной группы способствуют связыванию с альбумином, иммуноглобулином, липопротеином, α -2-макроглобулином или α -1-гликопротеином.

В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой напроксен или структурное производное напроксена. Способы синтеза напроксена можно найти в патенте США № 3904682 и патенте США № 4009197, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Напроксен имеет химическое название (S)-6-метокси- α -метил-2-нафталинуксусная кислота и имеет структуру:



В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой ибупрофен или структурное производное ибупрофена. Процедуры синтеза ибупрофена можно найти в патенте США № 3228831, который включен в настоящий документ посредством ссылки для описания способов, представленных в нем. Структура ибупрофена представляет собой



Дополнительные иллюстративные аралкильные группы описаны в патенте США № 7626014, который включен здесь посредством ссылки для описания способов, представленных в нем.

В одном варианте осуществления липофильная группа выбрана из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, 1-пиренмасляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексанола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О-3-(олеоил)литохолевой кислоты, О-3-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

В некоторых вариантах осуществления в двухцепочечный РНК-агент может быть включено более одной липофильной группы, в частности, когда липофильная группа имеет

низкую липофильность или гидрофобность. В некоторых вариантах осуществления две или более липофильных группы включены в одну и ту же цепь двухцепочечного РНКи-агента. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь двухцепочечного РНКи-агента включает одну или более липофильных групп. В некоторых вариантах осуществления две или более липофильных группы включены в одно и то же положение (т. е. одно и то же азотистое основание, одну и ту же группу сахара или одну и ту же межнуклеозидную связь) двухцепочечной РНКи-агента. Это может быть достигнуто, например, конъюгированием двух или более липофильных групп через носитель или конъюгированием двух или более липофильных групп через разветвленный линкер, или конъюгированием двух или более липофильных групп через один или более линкеров, с одним или более линкерами, последовательно связывающими липофильные группы.

Липофильную группу можно конъюгировать с РНКи-агентом посредством прямого присоединения к сахару рибозе РНКи-агента. Альтернативно липофильная группа может быть конъюгирована с двухцепочечным РНКи-агентом через линкер или носитель.

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа может быть конъюгирована с РНКи-агентом через один или более линкеров (привязей).

В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с двухцепочечным РНКи-агентом через линкер, содержащий простую эфирную, тиоэфирную, карбамидную, карбонатную, аминоксвязь, амидную, малеимид-тиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции (например, триазол из азид-алкинового циклоприсоединения) или карбамат.

В. Конъюгаты с липидами

В некоторых вариантах осуществления лиганд является липидом или основанной на липиде молекулой. Такой липид или основанная на липиде молекула обычно может связываться с сывороточным белком, таким как сывороточный альбумин человека (HSA). Лиганд, связывающий HSA, обеспечивает возможность распределения конъюгата в ткани-мишени. Например, тканью-мишенью может быть глаз. В качестве лигандов также можно использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать непроксин или аспирин. Липид или лиганд на основе липида могут (а) повысить устойчивость конъюгата к деградации, (б) повысить нацеленность или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану, и/или (с) можно использовать для регуляции связывания с белком сыворотки, например, HSA.

Лиганд на основе липидов можно использовать для того, чтобы модулировать, например, контролировать (например, ингибировать) связывание конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или лиганд на основе липидов, который связывается с HSA более прочно, будет с меньшей вероятностью целенаправленно поступать в почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липид или лиганд на основе липидов, который связывается с HSA менее прочно, можно использовать для того, чтобы целенаправленно направить конъюгат в почки.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, основанный на липиде, связывается

с HSA. Например, лиганд может связываться с HSA с аффинностью, достаточной для того, чтобы усилить распределение конъюгата в ткань, отличную от ткани почки. Однако обычно аффинность не настолько высокая, чтобы связывание HAS с лигандом не могло быть обратимым.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, основанный на липиде, связывается с HSA слабо или совсем не связывается, так что распределение конъюгата в почки усиливается. Другие группы, которые нацелены на почечные клетки, также можно использовать вместо или дополнительно к лиганду, основанному на липиде.

В еще одном аспекте лиганд представляет собой молекулу, например, витамин, которая захватывается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Такие лиганды особенно применимы для лечения расстройств, характеризующихся нежелательной клеточной пролиферацией, например, злокачественного или доброкачественного типа, например опухолевых клеток. Примеры витаминов включают витамин А, Е и К. Другие примеры витаминов включают витамин В, например фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, которые захватываются опухолевыми клетками. Также включаются HSA и липопротеин низкой плотности (LDL).

Агенты для проникновения в клетки

В еще одном аспекте лиганд представляет собой агент для проникновения в клетку, предпочтительно спиральный агент для проникновения в клетку. В одном варианте агент является амфипатическим. Примером агента является пептид, такой как tat или antennopodia. Если агент представляет собой пептид, то он может быть модифицирован, включая пептидилмиметики, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральный агент предпочтительно представляет собой агент в форме α -спирали и он может иметь липофильную и липофобную фазу.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем описании олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, сходную со структурой природного пептида. Связывание пептида и пептидомиметиков с иРНК-агентами может оказывать влияние на фармакокинетическое распределение иРНК, например, за счет усиления клеточного распознавания и всасывания. Группа пептида или пептидомиметика может иметь длину примерно 5-50 аминокислот, например, длиной примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептидом или пептидомиметиком может быть, например, пептид, проникающий в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий, главным образом, из Tyr, Trp или Phe). Пептидная группа может представлять собой дендримерный пептид, конформационно ограниченный пептид или поперечно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидная группа может содержать гидрофобную последовательность транслокации через мембрану (MTS). Примером пептида, содержащего гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную

последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 3438). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 3439)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающей группой к мишени. Пептидная группа может представлять собой пептид «для доставки», который может нести крупные полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 3440)) и белка *Drosophila antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 3441)) способны функционировать в качестве пептидов для доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться произвольной последовательностью ДНК, например, как пептид, идентифицированный из библиотеки в фаговом дисплее или комбинаторной библиотеки «один шарик-одно соединение» (OBOC) (Lam et al., Nature, 354: 82-84, 1991). Обычно пептид или пептидомиметик, связанный с дцРНК-агентом через включенную мономерную единицу, является направляющим в клетку-мишень пептидом, таким как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Пептидная группа может иметь длину в диапазоне примерно от 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Пептидные остатки могут иметь структурную модификацию, в частности для повышения стабильности или прямых конформационных свойств. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже.

Пептид RGD для применения в композициях и способах по изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, чтобы облегчить нацеливание на конкретную ткань (ткани). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут содержать D-аминокислоты, а также синтетические миметики RGD. В дополнении к RGD можно использовать другие остатки, мишенью которых является лиганд интегрин. Предпочтительные конъюгаты такого лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

Пептидную группу RGD можно использовать для целенаправленного действия на конкретный тип клеток, например, опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или клетка злокачественной опухоли молочной железы (Zitzmann et al., Cancer Res., 62: 5139-43, 2002). Пептид RGD может способствовать нацеливанию дцРНК-агента на опухоли из различных других тканей, включая легкие, почки, селезенку или печень (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8: 783-787, 2001). Обычно пептид RGD может способствовать нацеливанию иРНК-агента 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 иРНК-агент в опухолевую клетку, экспрессирующую $\alpha\beta 3$ (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42: 326-336, 2001).

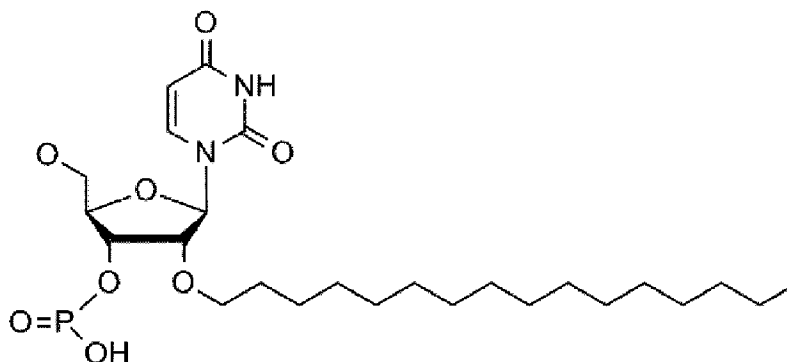
«Пептид для проникновения в клетку» способен обеспечивать проникновение в клетку, например, клетку микроорганизма, такую как бактериальная клетка или клетка гриба, или клетки млекопитающего, такой как клетка человека. Пептид для проникновения в клетки микроорганизмов может представлять собой, например, α -спиральный линейный

пептид (например, LL-37 или церопин P1), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефензин, β -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид для проникновения в клетку также может содержать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид для проникновения в клетку может представлять собой амфипатический пептид, состоящий из двух частей, такой как MPG, который получен из слитого пептидного домена gp41 ВИЧ-1 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31: 2717-2724, 2003).

Углеводные конъюгаты и лиганды

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по изобретению олигонуклеотид иРНК дополнительно содержит углеводов. Конъюгированные с углеводами иРНК являются предпочтительными для доставки *in vivo* нуклеиновых кислот, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, которые описаны здесь. В рамках настоящего изобретения, термин «углевод» относится к соединению, которое является либо углеводом как таковым, состоящим из одной или более моносахаридных единиц, имеющих, по меньшей мере, 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим), при этом с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы; либо относится к соединению, имеющему в качестве его части группу углевода, состоящего из одной или более моносахаридных единиц, каждая из которых имеет, по меньшей мере, шесть атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим), при этом с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы. Репрезентативные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных единиц), и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают C5-сахара и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара, имеющие две или три моносахаридных единицы (например, C5, C6, C7 или C8).

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению включают лиганд C16. В типичных вариантах осуществления лиганд C16 по настоящему изобретению имеет следующую структуру (проиллюстрировано здесь ниже для урацилового основания, однако присоединение лиганда C16 предполагается для нуклеотида, представляющего любое основание (C, G, A и т. д.) или обладающего любым другая модификация, как представлено в настоящем документе, при условии, что 2'-присоединение рибозы сохранено и присоединяется во 2'-положении рибозы в остатке, который модифицирован таким образом:



Химическая формула : $C_{25}H_{43}N_2O_8P$

Точная масса : 530,2757

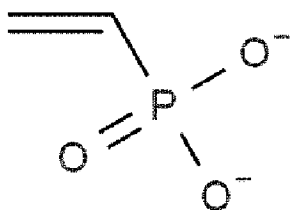
Молекулярная масса : 530,5913

Как показано выше, C16 лиганд-модифицированный остаток представляет собой алкил с прямой цепью в положении 2'-рибозы примерного остатка (в данном случае, урацила), который модифицирован таким образом.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат РНК-агента по настоящему изобретению дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, как описано выше, таких как, не ограничиваясь этим, модулятор РК или проникающий в клетку пептид.

Дополнительные углеводные конъюгаты (и линкеры), подходящие для использования в настоящем изобретении, включают конъюгаты, описанные в WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

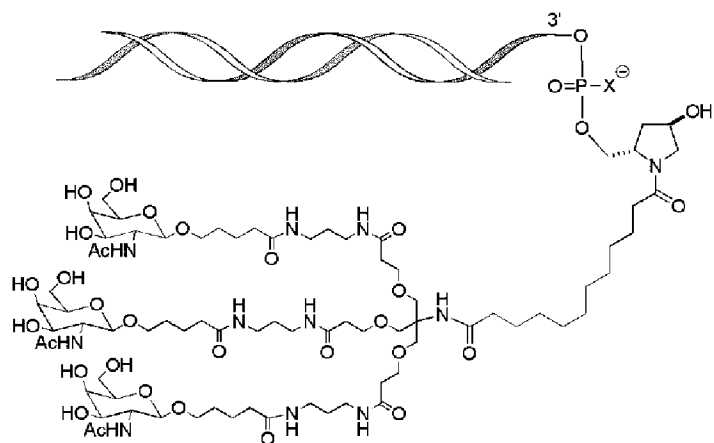
В некоторых вариантах осуществления композиции и способа по настоящему изобретению включают винилфосфонатную (VP) модификацию РНК-агента, описанного в настоящем документе. В примерных вариантах осуществления винилфосфонат по настоящему изобретению имеет следующую структуру:



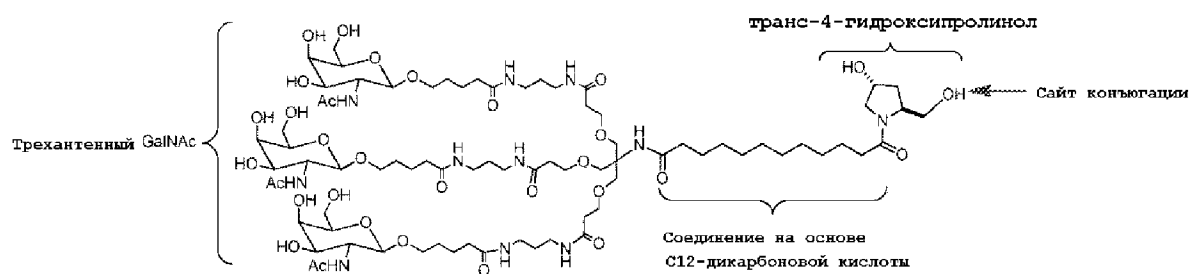
Винилфосфонат по настоящему изобретению может быть присоединен либо к антисмысловой, либо к смысловой цепи дцРНК по настоящему изобретению. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления винилфосфонат по настоящему описанию присоединен к антисмысловой цепи дцРНК, необязательно на 5'-конце антисмысловой цепи дцРНК.

Винилфосфонат по настоящему изобретению может быть присоединен либо к

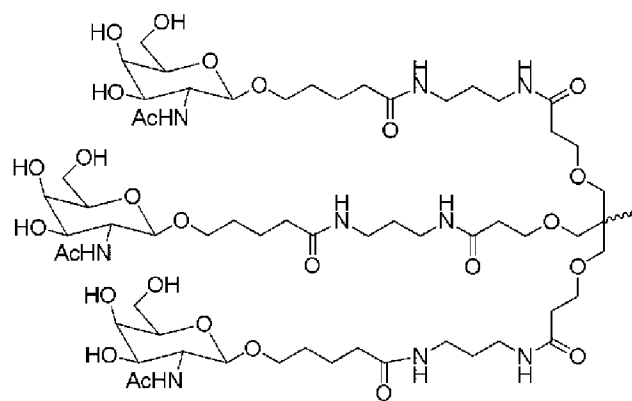
или S.



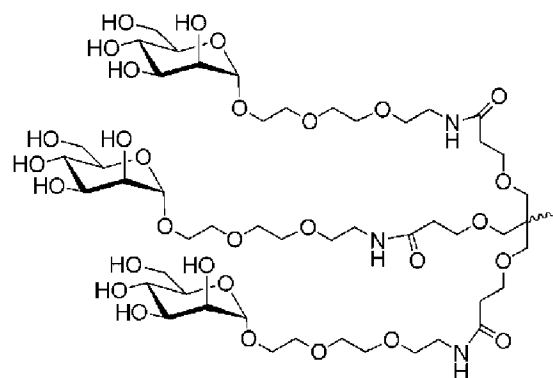
В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент конъюгирован с L96, приведенным в Таблице 2, и показан ниже:



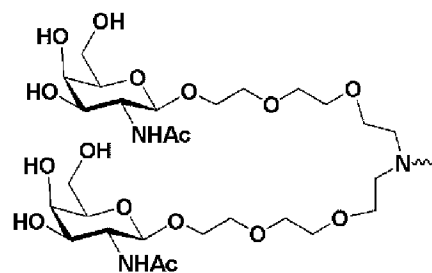
В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по изобретению выбран из группы, состоящей из:



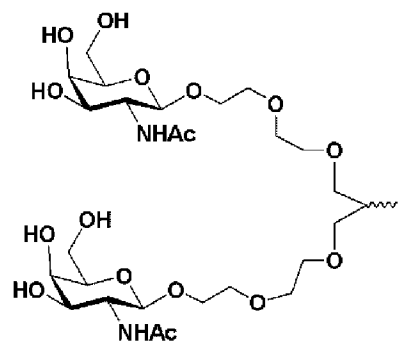
Формула II,



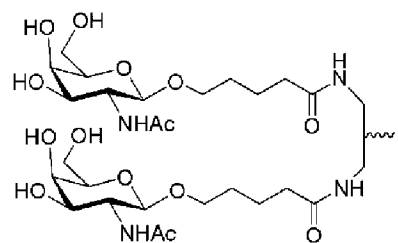
Формула III,



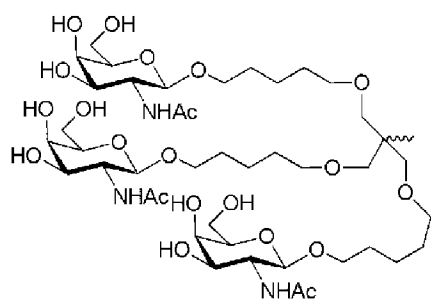
Формула IV,



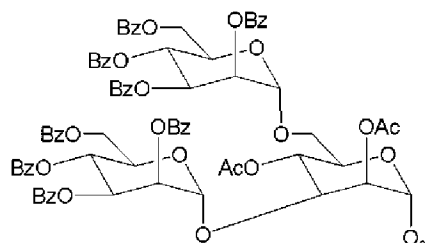
Формула V,



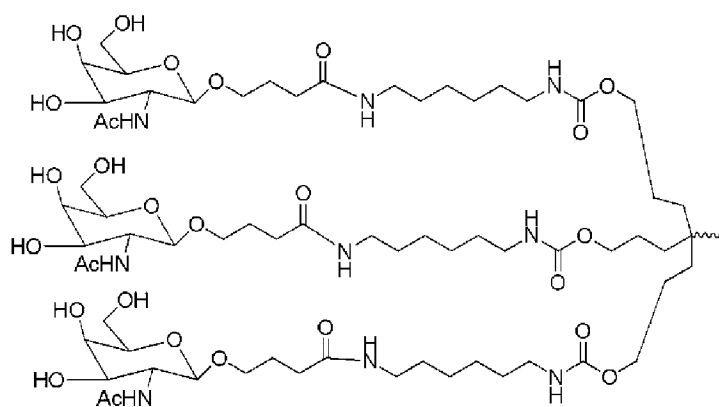
Формула VI,



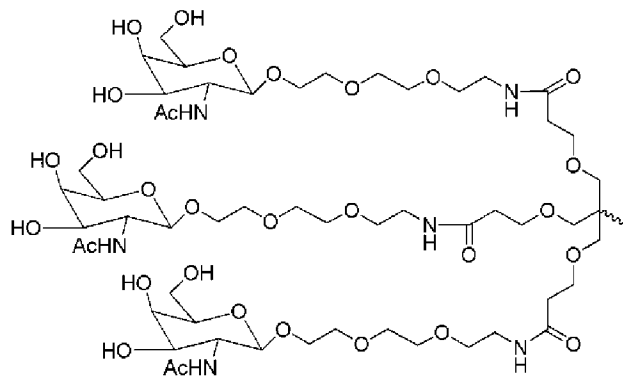
Формула VII,



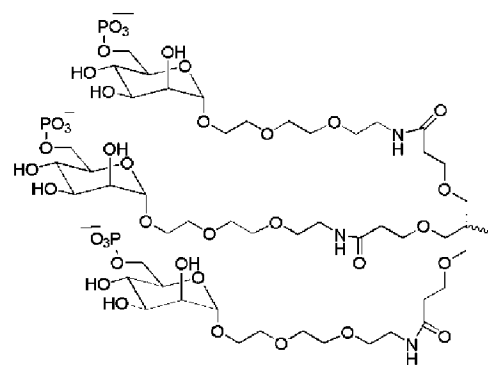
Формула VIII,



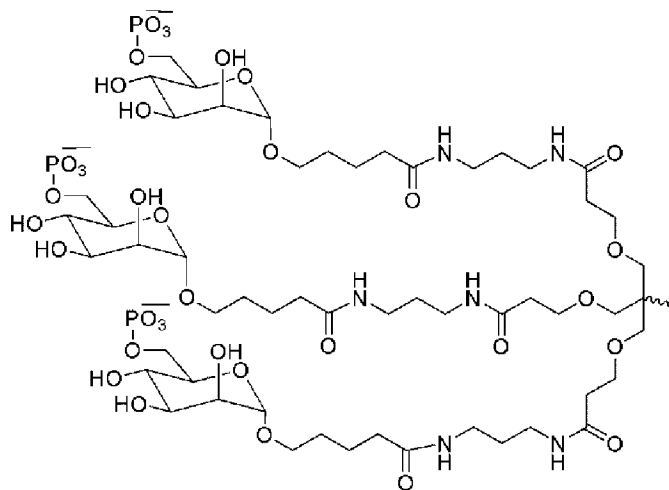
Формула IX,



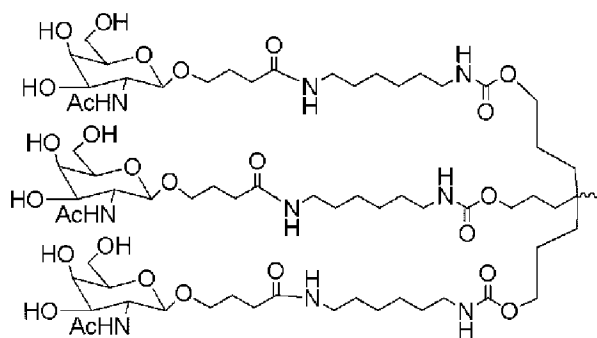
Формула X,



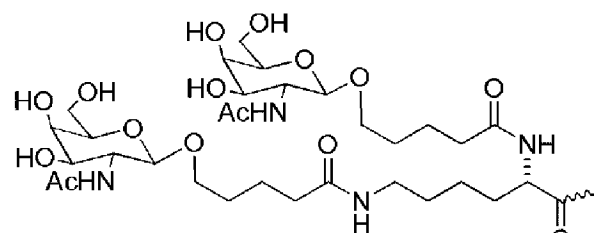
Формула XI,



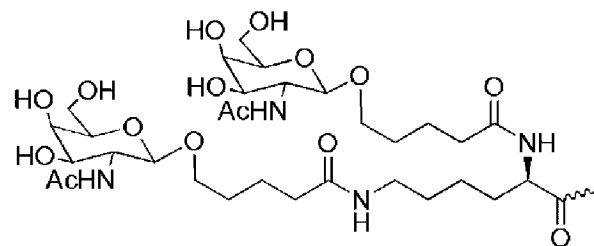
Формула XII,



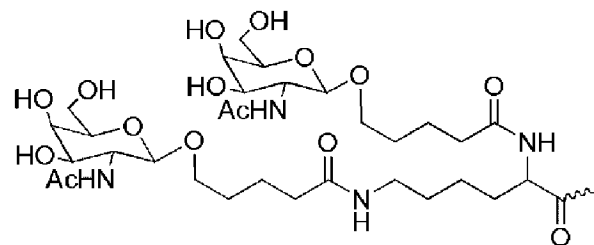
Формула XIII,



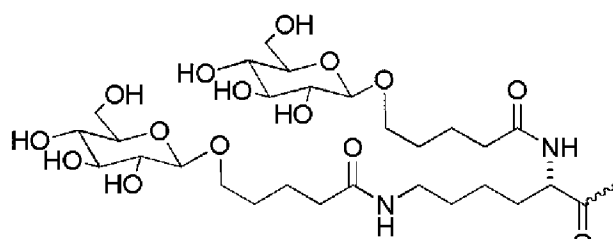
Формула XIV,



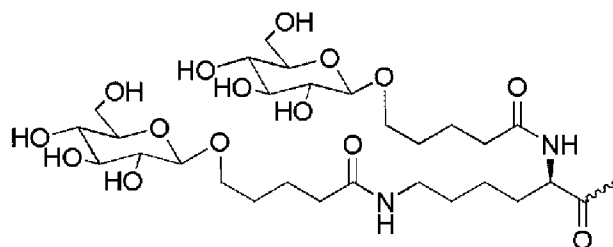
Формула XV,



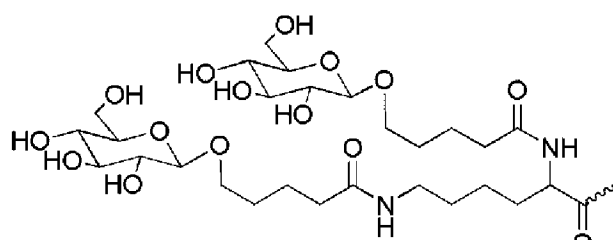
Формула XVI,



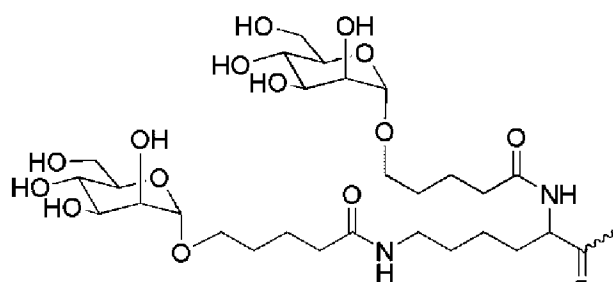
Формула XVII,



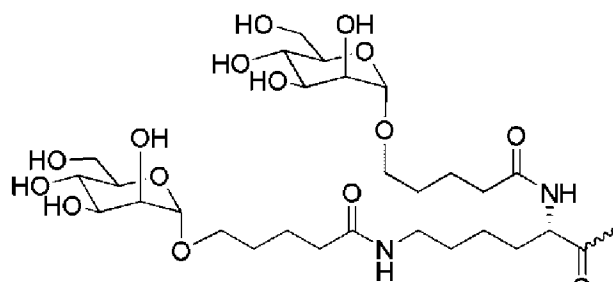
Формула XVIII,



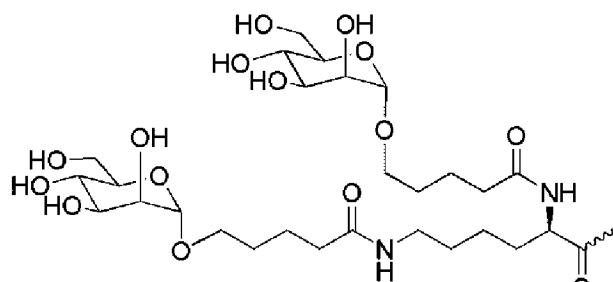
Формула XIX,



Формула XX,

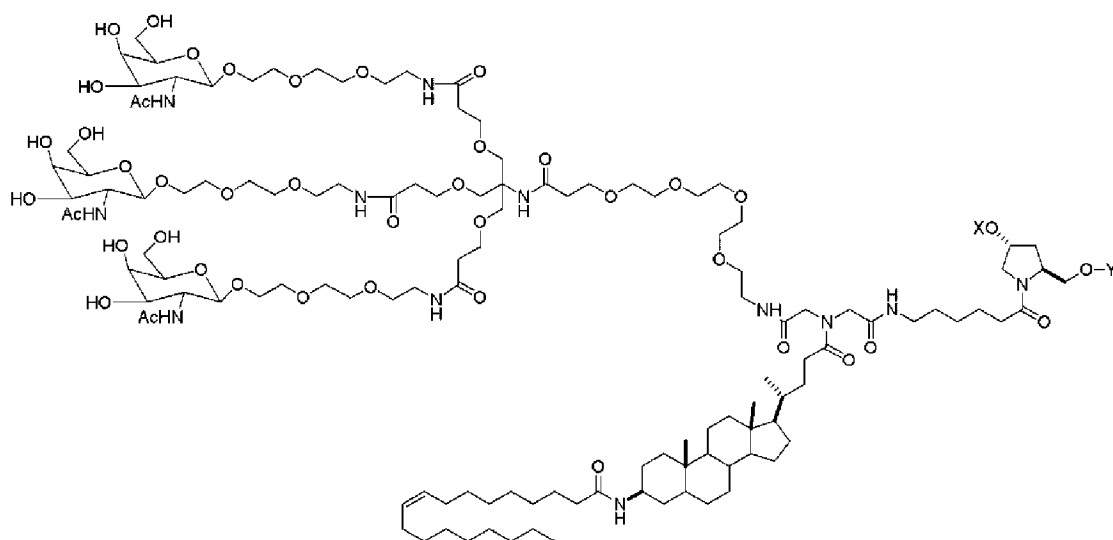


Формула XXI,



Формула XXII.

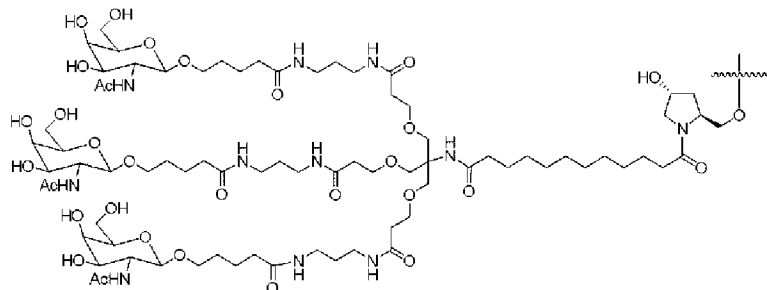
Другой репрезентативный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включает, но не ограничивается этим,



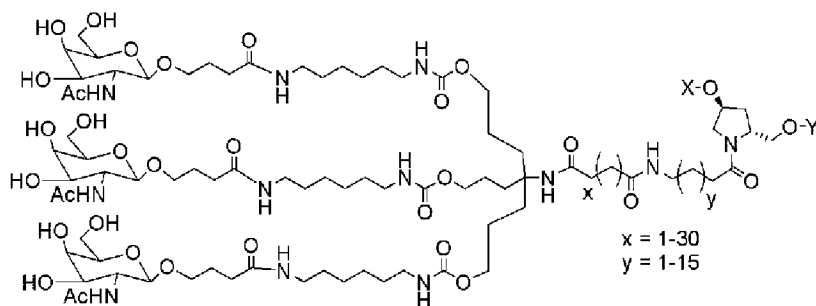
(формула XXIII), когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой атом водорода.

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

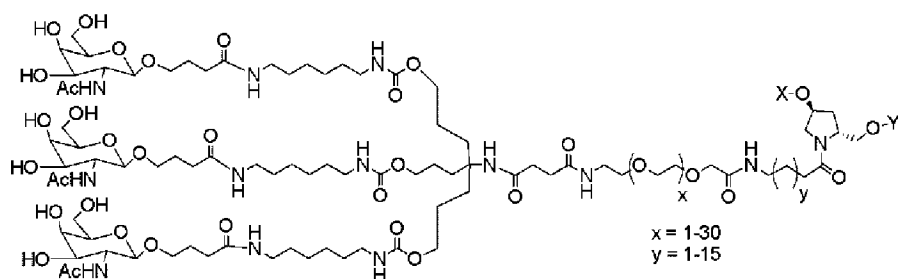
В некоторых вариантах осуществления иРНК по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов иРНК с линкерами композиций и способов по настоящему изобретению включают, не ограничиваясь этим,



(Формула XXIV),

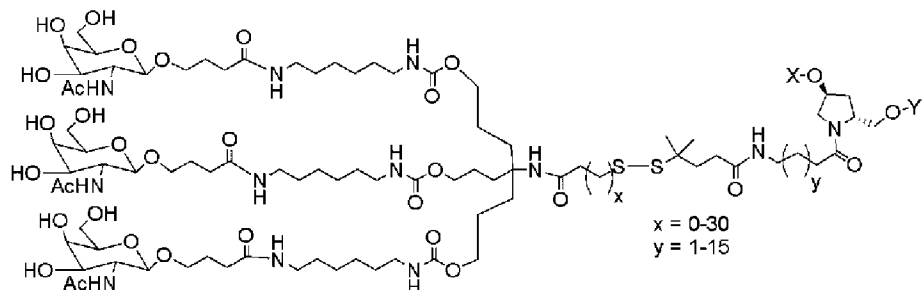


Формула XXV



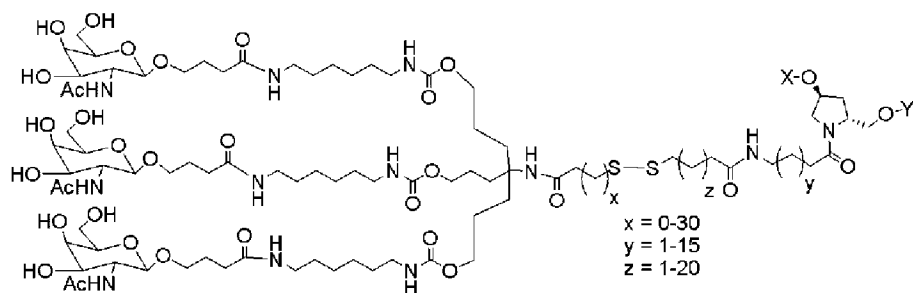
(Формула

XXVI),



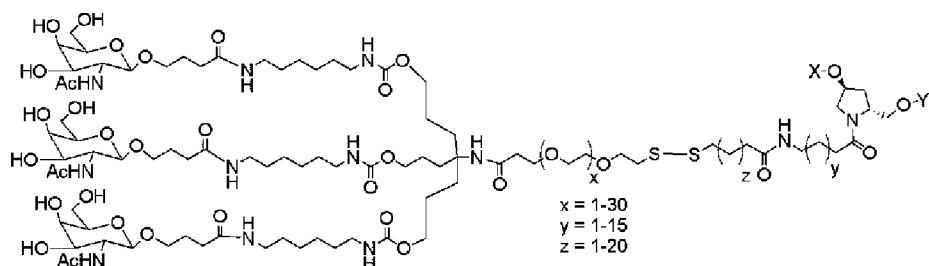
(Формула

XXVII),



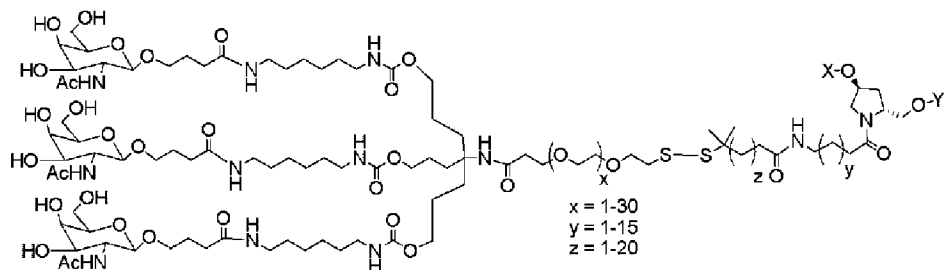
(Формула

XXVIII),



(Формула

XXIX), и



(Формула

XXX),

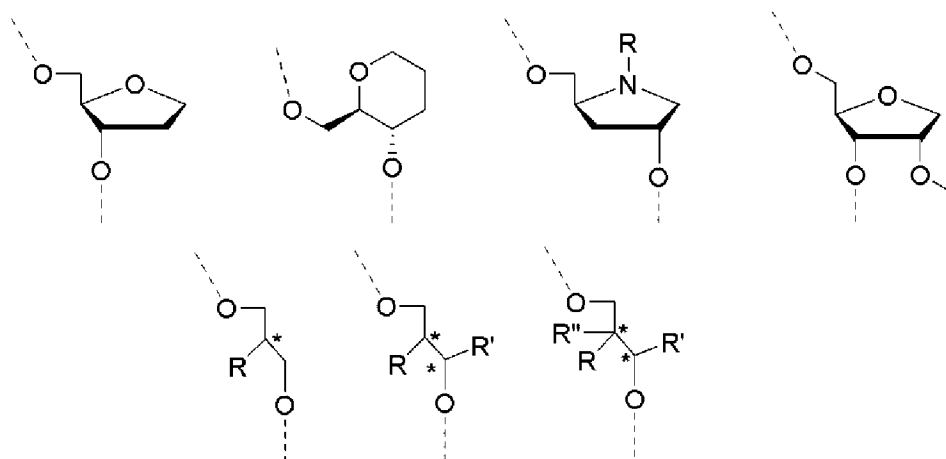
когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой атом водорода.

Е. Термически дестабилизирующие модификации

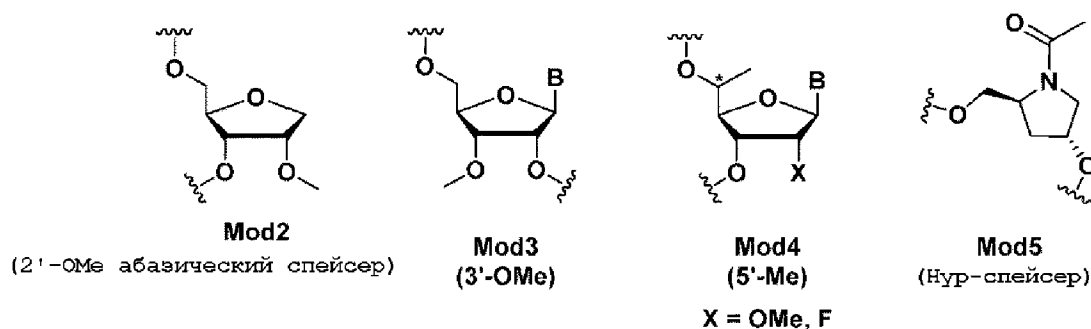
В некоторых вариантах осуществления молекулу дцРНК можно оптимизировать для обеспечения РНК-интерференции путем включения термически дестабилизирующих модификаций в затравочную область антисмысловой цепи (т.е. в положения 2-9 от 5'-конца антисмысловой цепи), чтобы уменьшить или ингибировать сайленсинг нецелевого гена. Было обнаружено, что дцРНК с антисмысловой цепью, содержащей, по меньшей мере, одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в первых 9 нуклеотидных положениях, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи, обладают сниженной активностью в сайленсинге нецелевого гена. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в первых 9 нуклеотидных положениях от 5'-области антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления одна или более термически дестабилизирующих модификаций дуплекса находятся в положениях 2-9, или предпочтительно 4-8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая(ие) модификация(и) дуплекса расположена(ы) в положении 6, 7 или 8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В еще одних дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса находится в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи. Термин «термически дестабилизирующая(ие) модификация(и)» включает модификацию(и), которая приводит к образованию дцРНК с более низкой общей температурой плавления (T_m) (предпочтительно T_m на один, два, три или четыре градуса ниже, чем T_m дцРНК без такой(их) модификации(й)). В некоторых вариантах осуществления термодестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 от 5'-конца антисмысловой цепи.

Термически дестабилизирующие модификации могут включать, не ограничиваясь этим, модификацию в виде удаленного азотистого основания; несовпадение с противоположным нуклеотидом в противоположной цепи; и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксид-модификация или ациклический нуклеотид, например, незакрытые нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA).

Примеры модификаций азотистого основания включают, не ограничиваясь следующим:

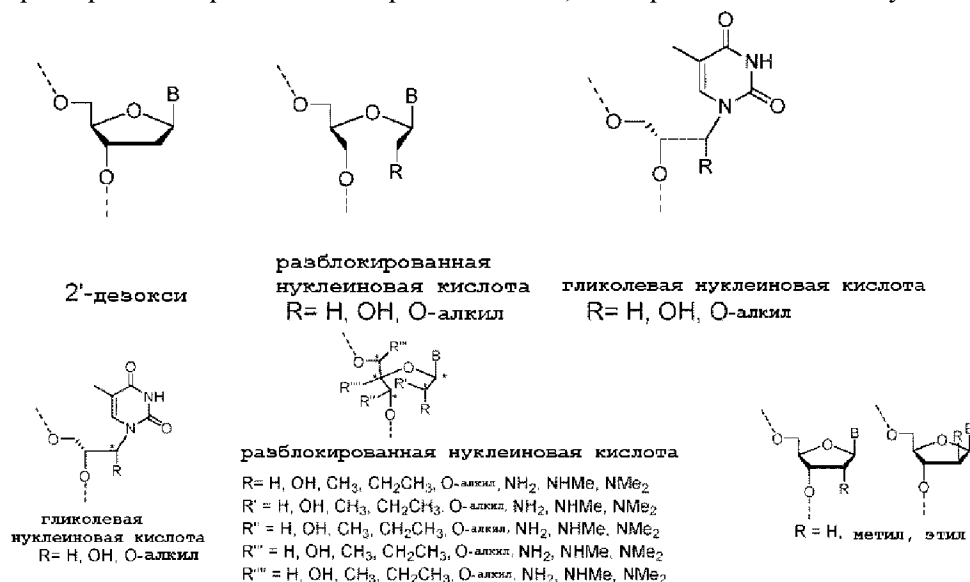


где R=H, Me, Et или OMe; R'=H, Me, Et или OMe; R''=H, Me, Et или OMe



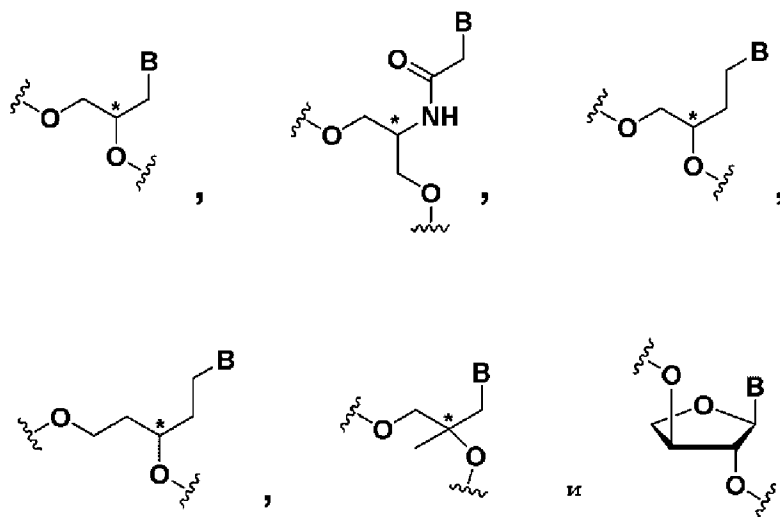
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

Примеры модификаций сахара включают, не ограничиваясь следующим:



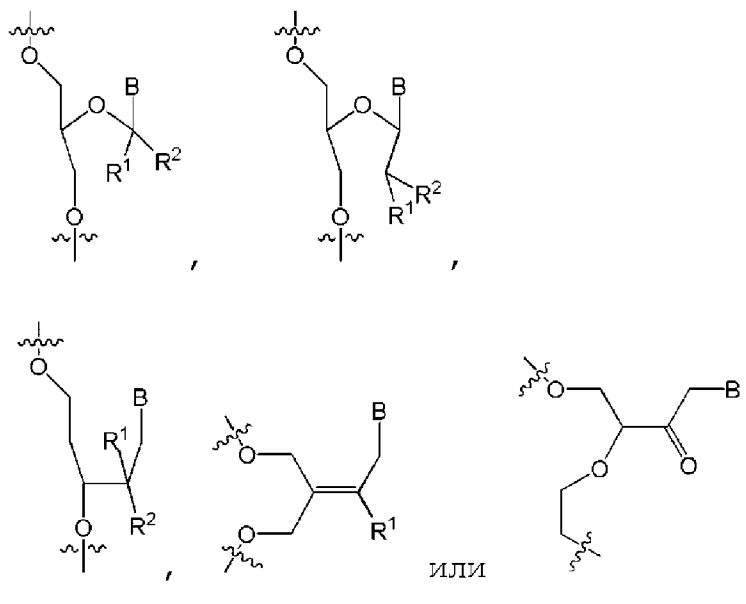
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание, и звездочка в каждой структуре представляет собой либо R-изомер, S-изомер, либо рацемическое соединение.

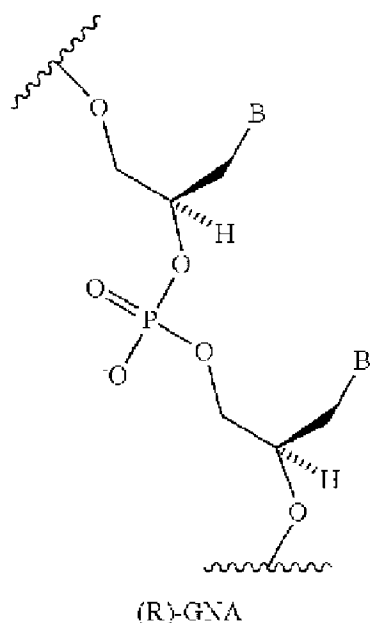
Термин «ациклический нуклеотид» относится к любому нуклеотиду, содержащему ациклический сахар рибозу, например, где любая из связей между атомами углерода рибозы (например, C1'-C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4' или C1'-O4') отсутствует или, по меньшей мере, один из атомов углерода рибозы или кислорода (например, C1', C2', C3', C4' или O4') независимо или в комбинации отсутствует в нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления ациклический нуклеотид представляет собой:



где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, атом галогена, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар). Термин «UNA» относится к незакрытой ациклической нуклеиновой кислоте, в которой любая из связей сахара была удалена, образуя незакрытый «сахарный» остаток. В одном примере UNA также охватывает мономеры с удаленными связями между C1'-C4' (т.е. ковалентная

углерод-кислород-углеродная связь между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере удалена связь C2'-C3' (т.е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') сахара (см. Michaelov et. al., *Tetrahedron Letters*, 26 (17): 2059). (1985) и Fluiter et al., *Mol. Biosyst.*, 10: 1039 (2009), которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость остова, не влияя на спаривание Уотсона-Крика. Ациклический нуклеотид может быть связан через 2'-5' или 3'-5' связь.

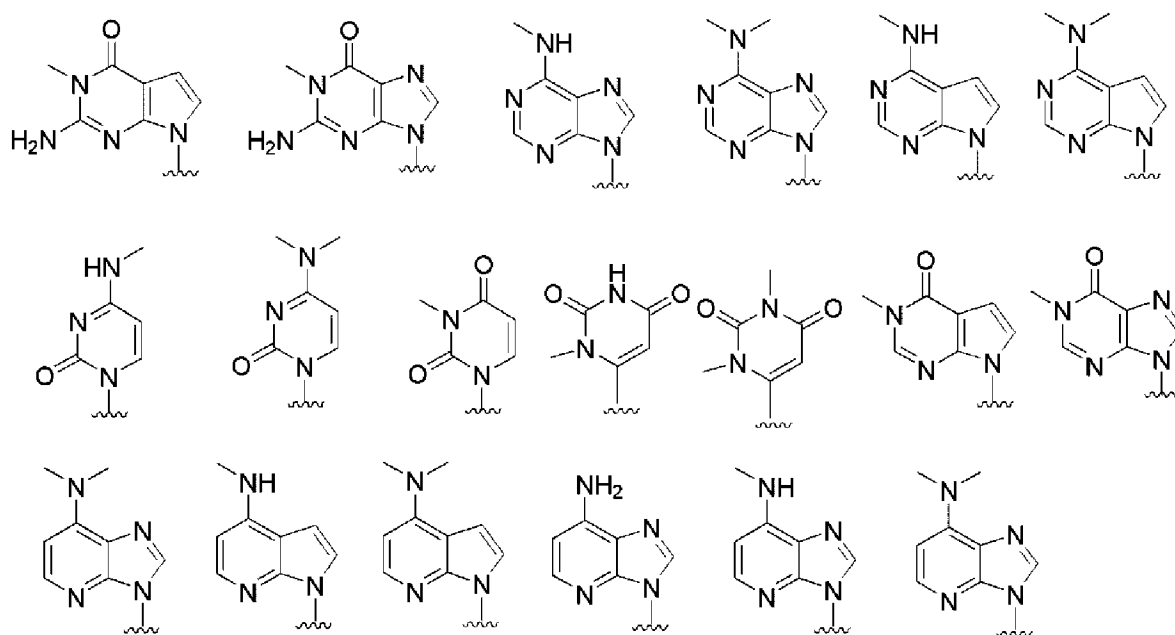
Термин «GNA» относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, подобный ДНК или РНК, но отличающийся составом своего «остова», в том, что состоит из повторяющихся звеньев глицерина, связанных фосфодиэфирными связями:



Термически дестабилизирующей модификацией дуплекса могут быть несовпадения (т. е. некомплементарные пары оснований) между термически дестабилизирующим нуклеотидом и противоположным нуклеотидом в противоположной цепи в дуплексе дцРНК. Примеры несовпадающих пар оснований включают G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T или их комбинация. Другие несовпадающие пары оснований, известные в данной области, также входят в объем настоящего изобретения. Несовпадение может находиться между нуклеотидами, которые являются либо природными нуклеотидами, либо модифицированными нуклеотидами, т. е. несовпадение спаривания оснований может иметь место между азотистыми основаниями соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций сахаров рибоз в нуклеотидах. В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит, по меньшей мере, одно азотистое основание в несовпадающей паре, которое представляет собой 2'-дезоксисоснование; например, 2'-дезоксисоснование находится в смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой цепи включает нуклеотиды

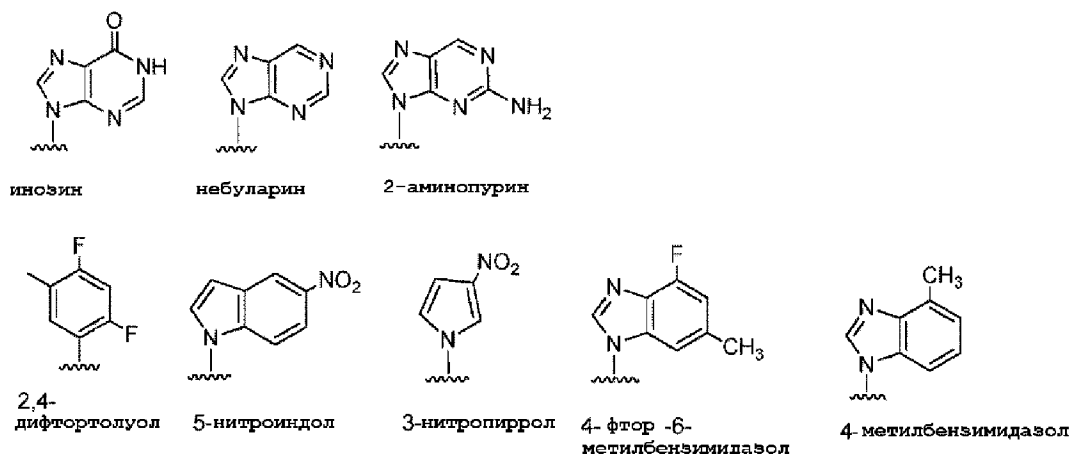
с нарушенными водородными связями Уотсона-Крика с комплементарным основанием в мРНК-мишени, такие как:



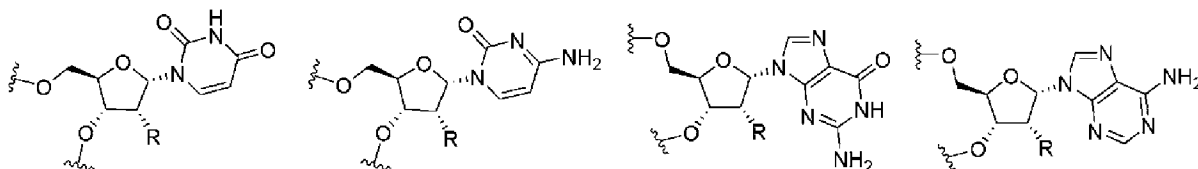
Другие примеры модификаций нуклеотидов с удаленным азотистым основанием, ациклических нуклеотидов (включая UNA и GNA) и модификаций по типу несовпадения подробно описаны в WO 2011/133876, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки.

Термически дестабилизирующие модификации могут также включать универсальные основания с пониженной или отсутствующей способностью образовывать водородные связи с противоположными основаниями и фосфатные модификации.

В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса включает нуклеотиды с неканоническими основаниями, такие как, помимо прочего, модификации азотистых оснований с нарушенной или полностью отсутствующей способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной цепи. Такие модификации азотистых оснований оценивали на предмет дестабилизации центральной области дуплекса дцРНК, как описано в WO 2010/0011895, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры модификаций азотистых оснований:

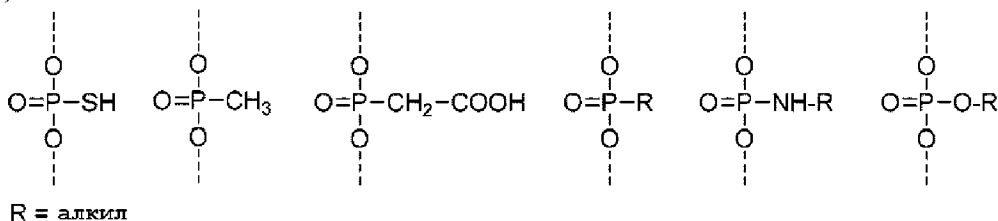


В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой цепи включает один или более α -нуклеотидов, комплементарных основанию в мРНК-мишени, например:



где R представляет собой H, OH, OCH₃, F, NH₂, NHMe, NMe₂ или O-алкил.

Примеры фосфатных модификаций, которые, как известно, снижают термостабильность дуплексов дцРНК по сравнению с природными фосфодиэфирными связями, включают:



Алкил для R-группы может представлять собой C₁-C₆алкил. Конкретные алкилы для группы R включают, не ограничиваясь этим, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил и гексил.

Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, с учетом функциональной роли азотистых оснований, определяющей специфичность РНКи-агента по настоящему изобретению, модификации азотистых оснований могут быть выполнены различными способами, описанными здесь, например, для введения дестабилизирующих модификаций в РНКи-агент по изобретению, например, с целью усиления целевого эффекта по сравнению с нецелевым эффектом; диапазон доступных модификаций и, как правило, присутствующих в РНКи-агентах по изобретению имеет тенденцию быть намного больше для модификаций, не связанных с азотистыми основаниями, например, модификации сахарных групп или фосфатных остовов полирибонуклеотидов. Такие модификации более подробно описаны в других разделах настоящего описания и явно

предусмотрены для РНК-агентов по настоящему изобретению, содержащих либо природные азотистые основания, либо модифицированные азотистые основания, как описано выше или по тексту в других местах в данном документе.

В дополнение к антисмысловой цепи, содержащей термически дестабилизирующую модификацию, дцРНК также может содержать одну или более стабилизирующих модификаций. Например, дцРНК может содержать, по меньшей мере, две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующих модификаций. Без ограничений, все стабилизирующие модификации могут находиться в одной цепи. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепи содержат, по меньшей мере, две стабилизирующие модификации. Стабилизирующая модификация может находиться в любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, стабилизирующая модификация может находиться в каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая стабилизирующая модификация может находиться в чередующемся паттерне в смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержат обе стабилизирующие модификации в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн стабилизирующих модификаций в смысловой цепи может быть таким же или отличным от чередующегося паттерна в антисмысловой цепи, и чередующийся паттерн стабилизирующих модификаций в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна стабилизирующих модификаций в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5'-конца. В еще одних некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 14 и 16 от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну стабилизирующую модификацию, расположенную рядом с дестабилизирующей модификацией. Например, стабилизирующей модификацией может быть нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т.е. в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующую модификацию на каждом из 5'-конца и 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т.е. в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, две стабилизирующие модификации на 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т.е. в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, стабилизирующая модификация смысловой цепи может находиться в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых еще одних вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех стабилизирующих модификаций.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь не содержит стабилизирующей модификации в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

Примеры термически стабилизирующих модификаций включают, не ограничиваясь этим, 2'-фтор-модификации. Другие термически стабилизирующие модификации включают, не ограничиваясь этим, LNA.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, четыре (например, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничения, все 2'-фторнуклеотиды могут находиться в одной цепи. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепи содержат, по меньшей мере, два 2'-фторнуклеотида. 2'-фтор-модификация может находиться в любом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи. Например, 2'-фтор-модификация может находиться в каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая 2'-фтор-модификация может находиться в чередующемся паттерне в смысловой или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержит обе 2'-фтор-модификации в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн 2'-фтор-модификаций в смысловой цепи может быть таким же или отличным от чередующегося паттерна 2'-фтор-модификаций в антисмысловой цепи, и чередующийся паттерн 2'-фтор-модификаций в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна 2'-фтор-модификаций в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничения, 2'-фтор-модификация в антисмысловой цепи может находиться в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5'-конца. В некоторых

других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5'-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один 2'-фторнуклеотид, смежный с дестабилизирующей модификацией. Например, 2'-фторнуклеотид может представлять собой нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т.е. в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотид на каждом из 5'-конца и 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т.е. в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, два 2'-фторнуклеотида на 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т.е. в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотида. Без ограничения, 2'-фтор-модификация в смысловой цепи может находиться в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех 2'-фторнуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь не содержит 2'-фторнуклеотида в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида (nt) и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов (nt), где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один термически дестабилизирующий нуклеотид, где, по меньшей мере, один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (т.е. в положениях 2-9 от 5'-конца антисмысловой цепи), где один конец дцРНК является тупым, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов, и где дцРНК необязательно дополнительно имеет, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4

или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит, по меньшей мере, четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. Предпочтительно выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой и антисмысловой цепях молекулы дцРНК может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одной и той же или другой модификацией, которая может включать одно или более изменений одного или обоих несвязывающих атомов кислорода фосфата или одного или нескольких связывающих атомов кислорода фосфата; изменение компонента сахара рибозы, например, 2'-гидроксила сахара рибозы; полную замену фосфатной группы линкерами «дефосфо»; модификацию или замену природного основания; и замену или модификацию рибозо-фосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие из модификаций имеют место в положении, которое повторяется внутри нуклеиновой кислоты, например, модификация основания или фосфатной группы или несвязывающего О фосфатной группы. В некоторых случаях модификация будет находиться во всех положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях это отсутствует. Например, модификация может иметь место только в 3'- или 5'-концевом положении, может иметь место только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидов цепи. Модификация может находиться в двухцепочечной области, одноцепочечной области или в обеих. Модификация может находиться только в двухцепочечной области РНК или может иметь место только в одноцепочечной области РНК. Например, фосфоротиоатная модификация в несвязывающем положении О находится только на одном или обоих концах, может находиться только в концевой области, например, в положении в концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5, или 10 нуклеотидах в цепи, или могут встречаться в двухцепочечных и одноцепочечных областях, особенно на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Возможно, например, повысить стабильность, включив определенные основания в выступы или включив модифицированные нуклеотиды или заменители нуклеотидов в одноцепочечные выступы, например, в 5'- или 3'-выступ, или в оба. Например, может быть желательным включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания в 3'- или 5'-выступе могут быть модифицированы, например, модификацией, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, использование модификаций во 2'-положении сахара рибозы с модификациями, известными в данной области, например, с использованием дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезокс-2'-фтор-(2'-F) или 2'-О-метил-модифицированных вместо сахара рибозы азотистого основания, и модификации в

фосфатной группе, например, фосфоротиоатные модификации. Выступы не обязательно должны быть гомологичны с последовательностью-мишенью.

В некоторых вариантах 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'-дезоксидом или 2'-фтором. Цепи могут содержать более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Следует понимать, что эти модификации являются дополнением, по меньшей мере, к одной термически дестабилизирующей модификации дуплекса, находящегося в антисмысловой цепи.

Как правило, в смысловой и антисмысловой цепи находится, по меньшей мере, две различные модификации. Такими двумя модификациями могут быть 2'-дезоксимодификация, 2'-О-метил-модификация или 2'-фтор-модификация, ациклические нуклеотиды или другие. В некоторых вариантах осуществления каждая смысловая и антисмысловая цепь содержит два по-разному модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-О-метила или 2'-дезоксидом. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилнуклеотидом, 2'-дезоксинуклеотидом, 2'-дезоксид-2'-фторнуклеотидом, 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA) нуклеотидом, 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил (2'-О-DMAEOE) нуклеотидом, 2'-О-аминопропил (2'-О-AP) нуклеотидом или 2'-ара-Ф-нуклеотидом. Вновь, следует понимать, что эти модификации являются дополнением, по меньшей мере, к одной термически дестабилизирующей модификации дуплекса, присутствующего в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах цепи молекула дцРНК по настоящему изобретению содержит модификации в чередующемся паттерне, в частности, в областях В1, В2, В3, В1', В2', В3', В4'. В рамках настоящего изобретения, термин «чередующийся мотив» или «чередующийся паттерн» относится к мотиву, имеющему одну или более модификаций, где каждая модификация находится в чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному на каждые два нуклеотида или одному на каждые три нуклеотида или аналогичный паттерн. Например, если каждый из А, В и С представляет один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВВАААВВВ...» или «АВСАВСАВСАВС...» и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т. е. модификации в каждом последующем нуклеотиде, может быть одинаковыми, но каждый для смысловой цепи или антисмысловой цепи можно выбрать из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, таком как «АВАВАВ...», «АСАСАС...», «ВДВДВД...» или «СДСДСД...» и т. д.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению содержит паттерн модификации для чередующегося мотива в смысловой цепи, который сдвинут относительно паттерна модификации чередующегося мотива в антисмысловой цепи. Сдвиг может представлять собой такой, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует различно модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, смысловая цепь, когда является спаренной с антисмысловой цепью в дуплекс дцРНК, то чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «АВАВАВ» от 5'-3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВАВАВА» от 5'-3' цепи в дуплексной области. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ААВВААВВ» от 5'-3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВВААВВАА» от 5'-3' цепи в дуплексной области, таким образом, что существует полный или частичный сдвиг паттернов модификации между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

Молекула дцРНК по настоящему изобретению может дополнительно содержать, по меньшей мере, одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может находиться в любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или обеих в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может иметь место в каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может иметь место в чередующемся паттерне в смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержит обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может быть таким же или отличным от такового в антисмысловой цепи, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в области выступа. Например, область выступа содержит два нуклеотида, имеющих фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть сделаны для связывания нуклеотидов выступа с концевыми спаренными нуклеотидами в области дуплекса. Например, по меньшей мере, 2, 3, 4 или все нуклеотидные выступы могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и необязательно могут быть дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие нуклеотидный выступ со спаренным нуклеотидом, который находится рядом с нуклеотидным выступом. Например, может быть, по меньшей мере, две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются нуклеотидными выступами, и третий является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Предпочтительно эти три концевых

нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы 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, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении олигонуклеотидной последовательности, и указанная смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидной связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы 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, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидной связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из трех 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, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидной связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из четырех фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из девяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена 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 либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 1-10 от концевой положения(й) смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи на одном или обоих концах смысловой или антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более модификаций фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в положениях 1-10 внутренней области дуплекса каждой смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны через фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь в положениях 8-16 дуплексной области, где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи; молекула дцРНК может необязательно дополнительно содержать одну или более модификаций фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в положениях 1-10 от концевой положения(й).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит от одной до пяти модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 и от одной до пяти модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и от одной до пяти модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 и одну модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 или 2 и две модификации фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 или 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему

[illegible]

осуществления общая структура хиральных центров остова включает не более 1 межнуклеотидной связи, которая не является хиральной. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 10 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 8 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 11 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 7 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 12 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 13 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 14 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 5 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 15 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 4 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Sp-конфигурации необязательно являются смежными или несмежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Sp-конфигурации необязательно являются смежными или несмежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи, которые не являются хиральными, необязательно являются смежными или несмежными.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит блок, представляющий собой стереохимический блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Rp-блок в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Rp. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Sp-блок в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Sp. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению содержат как Rp-блоки, так и Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению содержат один или более Rp-блоков, но не содержат Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению содержат один или более Sp-блоков, но не содержат Rp-блоки. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению содержат один или более РО-блоков, в которых каждая межнуклеотидная связь представляет собой природную фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит 5'-блок, представляющий собой Sp-блок, где каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит тип нуклеозида в области или олигонуклеотиде, за которым следует определенный тип межнуклеотидной связи, например, природная фосфатная связь, модифицированная межнуклеотидная связь, Rp-хиральная межнуклеотидная связь, Sp-хиральная межнуклеотидная связь и т. д. В некоторых вариантах осуществления за A следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за A следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за A следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за U следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за U следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за U следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за C следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за C следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за C следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за G следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за G следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за G следует естественная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за C и U следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за C и U следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за C и U следует естественная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за A и G следует Sp. В некоторых вариантах

осуществления за А и G следует R_p.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит несовпадение(я) с мишенью в дуплексе или их комбинации. Несовпадение может находиться в области выступов или дуплексной области. Пару оснований можно классифицировать на основе ее способности способствовать диссоциации или плавлению (например, на основе свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретного спаривания, то наиболее простой подход представляет собой такой, как исследовать пары на основе индивидуальных пар независимо от соседа, или также можно использовать аналогичный анализ). В отношении возможности способствовать диссоциации: А:U является предпочтительнее чем G:C; G:U является предпочтительнее чем G:C; и I:C является предпочтительнее чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические или отличные от канонического спаривания (как описано по тексту в других местах описания) являются предпочтительными по сравнению с каноническими спариваниями (А:Т, А:U, G:C); и спаривания, которые содержат универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническим спариванием.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит, по меньшей мере, одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных областях от 5'-конца антисмысловой цепи, которые можно независимо выбрать из группы: А:U, G:U, I:C и несовпадающих пар, например, неканонических или отличных от канонических спариваний или спариваний, которые содержат универсальное основание, для обеспечения диссоциации антисмысловой цепи в 5'-конце дуплекса.

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

Было обнаружено, что введение 4'-модифицированного или 5'-модифицированного нуклеотида на 3'-конце фосфодиэфирной (PO), фосфоротиоатной (PS) или фосфородитиоатной (PS2) связи динуклеотида в любое положение одноцепочечного или двухцепочечного олигонуклеотида может оказывать стерическое воздействие на межнуклеотидную связь и, следовательно, защищать или стабилизировать ее от действия нуклеаз.

В некоторых вариантах осуществления 5'-модифицированный нуклеотид вводят на 3'-конце динуклеотида в любое положение одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Например, 5'-алкилированный нуклеотид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любое положение одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Алкильная группа в 5'-положении сахара рибозы может быть рацемическим или хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 5'-алкилированным нуклеотидом является 5'-метилнуклеотид. 5'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления 4'-модифицированный нуклеотид вводят на 3'-конце динуклеотида в любое положение одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Например, 4'-алкилированный нуклеотид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любое положение одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Алкильная группа в 4'-положении сахара рибозы может представлять собой рацемический или хирально чистый R- или S-изомер. Типичным 4'-алкилированным нуклеозидом является 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером. Альтернативно, 4'-О-алкилированный нуклеозид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любое положение одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. 4'-О-алкил сахара рибозы может быть рацемическим или хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 4'-О-алкилированным нуклеозидом является 4'-О-метилнуклеозид. 4'-О-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления 5'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или повышает эффективность дцРНК. 5'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 5'-алкилированным нуклеозидом является 5'-метилнуклеозид. 5'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления 4'-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или повышает эффективность дцРНК. 4'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 4'-алкилированным нуклеозидом является 4'-метилнуклеозид. 4'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления 4'-О-алкилированный нуклеозид вводят в любое положение смысловой или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или повышает эффективность дцРНК. 5'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 4'-О-алкилированным нуклеозидом является 4'-О-метилнуклеозид. 4'-О-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению может содержать связи 2'-5' (с 2'-H, 2'-ОН и 2'-ОМе и с P=O или P=S). Например, модификации 2'-5'-связей можно использовать для повышения устойчивости к нуклеазам или для ингибирования связывания смысловой цепи с антисмысловой цепью, или их можно использовать на 5'-конце смысловой цепи, чтобы избежать активации смысловой цепи под действием RISC.

В еще одном варианте осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению может содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-H, 2'-ОН и 2'-ОМе). Например, такие модификации L-сахарами можно использовать для повышения устойчивости к нуклеазам или для ингибирования связывания смысловой цепи с

антисмысловой цепью, или их можно использовать на 5'-конце смысловой цепи, чтобы избежать активации смысловой цепи под действием RISC.

В различных патентных публикациях описываются мультимерные миРНК, которые все также можно использовать с дцРНК по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, US 7858769, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления молекулы дцРНК по настоящему изобретению являются 5'-фосфорилированными или включают аналог фосфорила на 5'-конце. 5'-фосфатные модификации включают те, которые совместимы с RISC-опосредованным сайленсингом генов. Подходящие модификации включают: 5'-монофосфат $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5')$; 5'-дифосфат $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-трифосфат $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-гуанозиновый кэп (7-метилованный или неметилованный) $(7\text{m-G-O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{PO}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-аденозиновый кэп (Appp) и любую модифицированную или немодифицированную структуру нуклеотидного кэпа $(\text{NO}-\text{O}-5'-(\text{HO})(\text{O})\text{PO}-(\text{HO})(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-монотиофосфат (фосфоротиоат; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-монодитиофосфат (фосфородитиоат; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-фосфотиолат $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5')$; любую дополнительную комбинацию замещенных кислородом/серой монофосфатов, дифосфатов и трифосфатов (например, 5'-альфа-тиотрифосфат, 5'-гамма-тиотрифосфат и т. д.), 5'-фосфорамидаты $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$, $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$), 5'-алкилфосфонаты ($\text{R}=\text{алкил}=\text{метил, этил, изопропил, пропил и т. д.}$, например, $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$), 5'-алкенилфосфонаты (т.е. винил, замещенный винил), $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$), 5'-алкилэфирфосфонаты ($\text{R}=\text{алкилэфир}=\text{метоксиметил (MeOCH}_2-)$, этоксиметил и т.д., например, $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$). В одном примере модификация может быть помещена в антисмысловую цепь молекулы дцРНК.

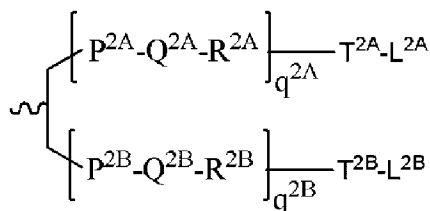
Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные здесь, может быть присоединен к олигонуклеотиду иРНК с использованием различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

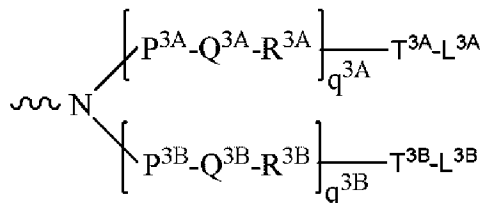
Линкеры обычно содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, единицу, такую как NR_8 , $\text{C}(\text{O})$, $\text{C}(\text{O})\text{NH}$, SO , SO_2 , SO_2NH или цепь из атомов, такую как без ограничения замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероцикл, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил,

алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где один или более метиленов могут прерываться или иметь на конце O, S, S(O), SO₂, N(R8), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероцикл; где R8 представляет собой атом водорода, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит примерно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомов.

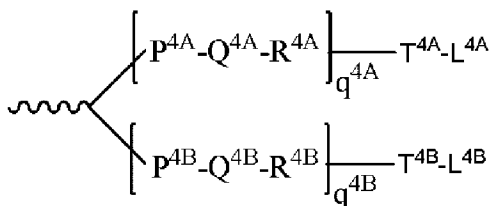
В некоторых вариантах осуществления дцРНК по настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, представленных любой из формул (XXXI) - (XXXIV):



Формула XXXI

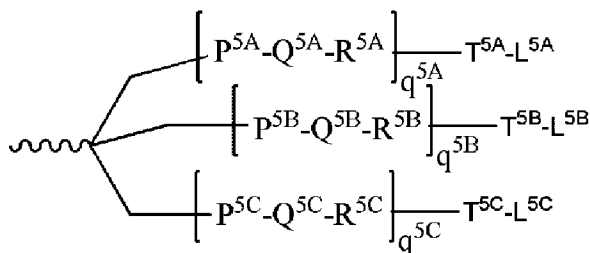


Формула XXXII



Формула XXXIII

или



Формула XXXIV

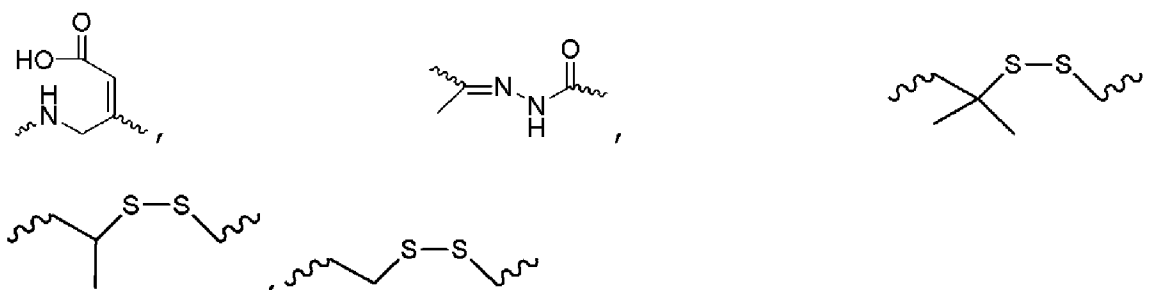
где:

q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} независимо для каждого случая равны 0-20, и где повторяющаяся единица может быть одинаковой или разной;

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} каждый независимо для каждого случая 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 для каждого случая отсутствуют или представляют собой алкилен, замещенный алкилен, в котором один или более метиленов могут быть прерваны или оканчиваются одним или более из O, S, S(O), SO₂, N(RN), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

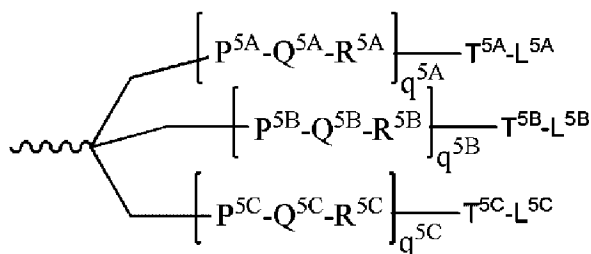
R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} каждый независимо для каждого случая отсутствует или представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=NO,



или гетероциклил;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд; т. е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгированные производные GalNAc особенно пригодны для использования с РНКи-агентами для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как представленные формулой (XXXV):

Формула XXXV



Формула (VII)

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

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

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

Расщепляемые линкерные группы являются чувствительными к расщепляющим агентам, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию вызывающих деградацию молекул. Обычно расщепляющие агенты преобладают или встречаются на более высоких уровнях или с более высокими активностями внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких агентов, вызывающих деградацию, включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или такие восстановители, как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут вызывать деградацию расщепляемых в реакции окисления-восстановления линкерных групп в результате восстановления; эстеразы; эндосомы или агенты, которые могут создавать кислую среду, например, агенты, которые обеспечивают значение pH 5 или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или приводить к деградации расщепляемой кислотами линкерной группы, действуя в качестве обычной кислоты, пептидазы (которые могут обладать субстратной специфичностью) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к pH. Значение pH сыворотки человека равно 7,4, тогда как среднее значение внутриклеточного pH немного ниже в диапазоне примерно от 7,1 до 7,3. Эндосомы имеют более кислое значение pH, в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более кислый pH примерно 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном значении pH, высвобождая при этом катионный липид из лиганда в клетку или в требуемый компартмент клетки.

Линкер может включать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, которая является мишенью.

В общем, применимость расщепляемых линкерных групп-кандидатов можно оценить, тестируя способность вызывающего деградацию агента (или условия) расщеплять выбранную для исследования линкерную группу. Также может быть желательным тестирование линкерной группы-кандидата в отношении способности быть резистентной к расщеплению в крови или в случае контактирования с другой тканью, не являющейся

тканью-мишенью. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению в случае первого и второго условия, где первое выбирают таким образом, чтобы оно указывало на расщепление в клетке-мишени, и второе выбирают так, чтобы оно указывало на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке. Тестирование можно провести в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органа или ткани или в целом организме животного. Могут быть полезными первоначальные оценки в бесклеточных условиях или в культуральных условиях и для подтверждения дальнейшей оценки в целом организме животного. В предпочтительных вариантах осуществления пригодные выбранные для исследования соединения расщепляются, по меньшей мере, примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных с целью имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных с целью имитации внеклеточных условий).

Расщепляемые при окислении-восстановлении линкерные группы

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую при окислении-восстановлении линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является расщепляемая линкерная группа-кандидат подходящей «расщепляемой при восстановлении линкерной группой» или, например, подходящей для применения с конкретной молекулой иРНК и конкретным нацеливающим агентом, то можно использовать способы, описанные здесь. Например, кандидата можно оценить посредством инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстановителем, используя реагенты, известные в данной области, которые имитируют уровень расщепления, который можно наблюдать в клетке, например, в клетке-мишени. Кандидаты также можно оценить в условиях, которые выбраны таким образом, чтобы имитировать условия в крови или сыворотке. В одном варианте соединения-кандидаты расщепляются не более чем примерно на 10% в крови. В других вариантах пригодные соединения-кандидаты деградируют, по меньшей мере, примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточные условия) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточные условия). Уровень расщепления соединений-кандидатов также можно определить, используя стандартные ферментативные кинетические анализы в условиях, выбранных таким образом, чтобы они имитировали внутриклеточную среду, и, сравнивая с условиями, выбранными так, чтобы они имитировали внеклеточную среду.

Основанные на фосфате расщепляемые линкерные группы

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит основанную на фосфате расщепляемую линкерную группу. Основанная на фосфате расщепляемая линкерная группа расщепляется агентами, которые или вызывают

деградацию или гидролизуют фосфатную группу. Примером агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатаза в клетках. Примерами основанных на фосфате линкерных групп являются $-O-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(S)(SRk)-O-$, $-S-P(O)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(ORk)-S-$, $-S-P(O)(ORk)-S-$, $-O-P(S)(ORk)-S-$, $-S-P(S)(ORk)-O-$, $-O-P(O)(Rk)-O-$, $-O-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-O-$, $-S-P(S)(Rk)-O-$, $-S-P(O)(Rk)-S-$, $-O-P(S)(Rk)-S-$. В некоторых вариантах осуществления основанными на фосфате линкерными группами являются $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$. В некоторых вариантах осуществления основанная на фосфате расщепляемая линкерная группа представляет собой $-O-P(O)(OH)-O-$. Данные кандидаты можно оценить, используя способы, аналогичные вышеописанным способам.

Расщепляемая кислотой линкерная группа

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой группу, которая расщепляется в кислых условиях. В некоторых вариантах осуществления расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с pH примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или такими агентами, как ферменты, которые могут функционировать в качестве обычной кислоты. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать среду для расщепления расщепляемых кислотой линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотой линкерных групп включают, без ограничения, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. В некоторых вариантах осуществления атом углерода, связанный с атомом кислорода сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметилпентил или трет-бутил. Такие кандидаты можно оценить, используя способы, аналогичные вышеописанным способам.

Основанные на сложных эфирах расщепляемые линкерные группы

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит основанную на сложном эфире расщепляемую линкерную группу. Основанная на сложном эфире расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетке такими ферментами как эстеразы и амидазы. Примеры основанных на сложных эфирах расщепляемых линкерных групп включают, без ограничения, сложные эфиры алкилена, алкенилена и алкинилена. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Такие кандидаты можно оценить, используя способы, аналогичные вышеописанным способам.

Основанные на пептидах расщепляемые линкерные группы

В еще одном варианте расщепляемый линкер содержит основанную на пептиде расщепляемую линкерную группу. Основанная на пептиде расщепляемая линкерная группа

расщепляется в клетке такими ферментами, как пептидазы и протеазы. Основанные на пептидах расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Основанные на пептидах расщепляемые группы не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может образоваться между любыми алкиленами, алкениленами или алкиниленами. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Основанная на пептиде расщепляемая группа обычно ограничивается пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами с получением пептидов и белков и не включает полную амидную функциональную группу. Основанные на пептидах расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу $-NHCH(RA)C(O)NHCH(RB)C(O)-$ где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Такие кандидаты можно оценить с использованием способов, аналогичных вышеописанным способам.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение конъюгатов РНК, включают, не ограничиваясь этим, патенты США № 4828979; 4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717; 5580731; 5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718; 5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263; 4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963; 5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098; 5371241; 5391723; 5416203; 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552; 5567810; 5574142; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928; 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; и 8106022, содержание каждого из которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

Необязательно, чтобы все положения в данном соединении были единообразно модифицированы, и фактически в одно соединение или даже в один нуклеозид в иРНК может быть включено более одной из вышеуказанных модификаций. Настоящее изобретение также относится к соединениям иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» соединения иРНК или «химеры» по настоящему изобретению представляют собой соединения иРНК, например, дцРНК, которые содержат две или более химически различающихся областей, каждая из которых состоит, по меньшей мере, из одной мономерной единицы, т.е. нуклеотида в случае соединения дцРНК. Такие иРНК обычно содержат, по меньшей мере, одну область, в которой РНК модифицирована таким образом, чтобы придать иРНК повышенную устойчивость к расщеплению нуклеазами, увеличенный захват клетками и/или повышенную аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью. Дополнительная область иРНК может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера РНКазы Н является клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Следовательно, активация РНКазы Н приводит к расщеплению РНК-

мишени, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования экспрессии генов под действием иРНК. Следовательно, при использовании химерных дцРНК часто можно получить сравнимые результаты в случае более коротких иРНК по сравнению с фосфоротиоатными дезокси-дцРНК, гибридизующимися с той же областью-мишенью. Расщепление РНК-мишени можно выявить обычным образом, используя гель-электрофорез, и при необходимости ассоциированные способы гибридизации нуклеиновых кислот, известные в данной области.

В некоторых случаях РНК в иРНК может быть модифицирована нелигандной группой. Ряд нелигандных молекул конъюгировали с иРНК для повышения активности, распределения в клетках или захвата иРНК клетками, и процедуры получения таких конъюгатов доступны в научной литературе. Такие нелигандные группы включали липидные группы, такие как холестерин (Kubo T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1): 54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4: 1053), тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660: 306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3: 2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 533), алифатическую цепь, например, группы додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, дигексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-O-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777), полиамин или цепь полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides and Nucleotides*, 1995, 14: 969), или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651), группу пальмитоила (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229), или группу октадециламина или гексиламинокарбонилкохлестерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277: 923). Репрезентативные патенты США, в которых описано получение таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих амиолинкер в одном или более положениях последовательности. Затем аминогруппу подвергают взаимодействию с конъюгируемой молекулой, используя соответствующие реагенты для связывания или активации. Реакцию конъюгации можно провести либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка РНК-конъюгата с использованием ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

Доставка иРНК

Доставка иРНК субъекту, нуждающемуся в этом, может быть достигнута рядом различных путей. Доставка *in vivo* может осуществляться непосредственно путем введения композиции, содержащей иРНК, например, дцРНК субъекту. В качестве альтернативы доставка может осуществляться опосредованно введением одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. Эти альтернативы обсуждаются ниже.

Прямая доставка

В общем, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с иРНК по настоящему изобретению (см., например, публикации Akhtar S. and Julian R.L., (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO 94/02595, которые в полном объеме включены здесь посредством ссылки). Однако имеется три фактора, которые важно учитывать для успешной доставки молекулы иРНК *in vivo* (1) биологическая стабильность доставляемой молекулы, (2) предупреждение неспецифических эффектов и (3) накопление доставляемого агента в ткани-мишени. Неспецифические эффекты иРНК можно свести к минимуму посредством местного введения, например, прямой инъекцией или имплантацией в ткань (в качестве неограничивающего примера в глаз) или местным введением препарата. Местное введение в область лечения максимизирует локальную концентрацию агента, ограничивает воздействие агента на ткани всего организма, которые в ином случае могут пострадать под действием агента или которые могут вызвать деградацию агента, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы иРНК. Результаты нескольких исследований показали эффективный нокдаун генных продуктов при локальном введении иРНК-агента. Например, было показано, что интраокулярная доставка дцРНК VEGF посредством инъекции в стекловидное тело макакам-крабоедам (Tolentino M.L. et al. (2004) *Retina*, 24: 132-138) и субретинальные инъекции мышам (Reich S.L. et al. (2003) *Mol. Vis.*, 9: 210-216) профилактируют неоваскуляризацию на экспериментальной модели возрастной макулярной дегенерации. Кроме того, прямая интратуморальная инъекция дцРНК мышам уменьшает объем опухолей (Pille L. et al. (2005) *Mol. Ther.*, 11: 267-274) и может увеличивать продолжительность жизни мышей, несущих опухоли (Kim W.L. et al. (2006) *Mol. Ther.*, 14: 343-350; Li S. et al. (2007) *Mol. Ther.*, 15: 515-523). Также была показана успешная РНК-интерференция при локальной доставке в ЦНС посредством прямой инъекции (Dorn G. et al. (2004) *Nucleic Acids*, 32:e49; Tan P.H. et al. (2005) *Gene Ther.*, 12:59-66; Makimura H. et al (2002) *BMC Neurosci.*, 3:18; Shishkina G.T. et al. (2004) *Neuroscience*, 129:521-528; Thakker E.R. et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101:17270-17275; Akaneya Y. et al. (2005) *J. Neurophysiol.*, 93:594-602) и в легкие интраназальным введением (Howard K.A. et al. (2006) *Mol. Ther.*, 14:476-484; Zhang X. et al. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279:10677-10684; Bitko V. et al. (2005) *Nat. Med.*, 11:50-55). В случае системного введения иРНК для лечения заболевания, РНК может быть модифицирована или альтернативно доставлена с использованием системы для доставки лекарственного средства; где оба способа функционируют, предотвращая быстрый распад дцРНК под действием эндо- и экзонуклеаз *in vivo*.

Модификация РНК или фармацевтического носителя также может позволить нацелить композицию иРНК на ткань-мишень и избежать нежелательных нецелевых эффектов. Молекулы иРНК можно модифицировать химической конъюгацией с другими группами, например, липидом или углеводом, как описано в настоящем документе. Такие конъюгаты можно использовать для нацеливания иРНК на определенные клетки, например,

клетки печени, например, гепатоциты. Например, GalNAc-конъюгаты или липидные составы (например, LNP) можно использовать для нацеливания иРНК на определенные клетки, например, клетки печени, например, гепатоциты.

Молекулы иРНК можно модифицировать химической конъюгацией с липофильными группами, такими как холестерин, для усиления захвата клетками и предотвращения деградации. Например, иРНК, направленную против AroB, конъюгированную с липофильной группой холестерина, инъецировали системно мышам, что приводило к нокдауну мРНК aroB как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek J. et al. (2004) *Nature*, 432: 173-178). Было показано, что конъюгация иРНК с аптамером ингибирует рост опухолей и опосредует регрессию опухолей на мышинной модели рака предстательной железы (McNamara J.O. et al. (2006) *Nat. Biotechnol.*, 24: 1005-1015). В альтернативном варианте осуществления иРНК может быть доставлена с использованием систем для доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы иРНК (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия в отрицательно заряженной клеточной мембране, обеспечивая возможность эффективного захвата иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут либо быть связаны с иРНК, либо индуцированы с целью образования везикулы или мицеллы (см., например, Kim S.H. et al. (2008) *Journal of Controlled Release*, 129(2): 107-116), которая инкапсулирует иРНК. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию иРНК при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов иРНК может осуществить специалист в данной области (см., например, публикации Sorensen D.R. et al. (2003) *J. Mol. Biol.*, 327:761-766; Verma U.N. et al. (2003) *Clin. Cancer Res.*, 9:1291-1300; Arnold A.S. et al. (2007) *J. Hypertens.*, 25:197-205, которые в полном объеме включены здесь посредством ссылки). Некоторые неограничивающие примеры систем для доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen D.R. et al. (2003), выше; Verma U.N. et al. (2003), выше), олигофектамин, «твердые частицы нуклеиновая кислота-липид» (Zimmermann T.S. et al. (2006) *Nature*, 441: 111-114), кардиолипид (Chien P.Y. et al. (2005) *Cancer Gene Ther.*, 12: 321-328; Pal A. et al. (2005) *Int. J. Oncol.*, 26: 1087-1091), полиэтиленмин (Bonnet M.E. et al. (2008) *Pharm. Res.*, Aug. 16 Epub. в печати; Aigner A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.*, 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu S. (2006) *Mol. Pharm.*, 3: 472-487) и полиамидамины (Tomalia D.A. et al. (2007) *Biochem. Soc. Trans.*, 35: 61-67; Yoo H. et al. (1999) *Pharm. Res.*, 16: 1799-1804). В некоторых вариантах иРНК образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки.

Вектор, кодирующий иРНК

иРНК, нацеленные на ген LRRK2, могут экспрессироваться из транскрипционных единиц, вставленных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture A et al., TIG. (1996),

12:5-10; WO 00/22113, WO 00/22114 и патент США 6054299). Экспрессия предпочтительно является транзистентной (в течение месяцев или более) в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа ткани или клетки-мишени. Такие трансгены могут быть введены в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор. Трансген также может быть сконструирован таким образом, чтобы его можно было наследовать в виде внехромосомной плазмиды (Gassmann et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:1292).

Отдельная цепь или цепи иРНК могут быть транскрибированы с промотора в экспрессионном векторе. Если две отдельные цепи должны быть экспрессированы для получения, например, дцРНК, то два отдельных экспрессионных вектора можно ввести совместно (например, путем трансфекции или инфекции) в клетку-мишень. Альтернативно, каждая отдельная цепь дцРНК может транскрибироваться промоторами, каждый из которых находится в одной и той же экспрессионной плазмиде. В одном варианте осуществления дцРНК экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированными повторами, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью, так что дцРНК имеет структуру «стебель-петля».

Экспрессионные векторы иРНК обычно представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Экспрессионные векторы, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии иРНК, как здесь описано. Доставка векторов, экспрессирующих иРНК, может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в клетки-мишени, эксплантированные у пациента, с последующим повторным введением в организм пациента, или любым другим способом, позволяющим осуществить введение в желаемую клетку-мишень.

Экспрессионную плазмиду иРНК можно трансфектировать в клетку-мишень в виде комплекса с катионным липидным носителем (например, олигофектамином) или некаатионным липидным носителем (например, Transit-ТКО™). Множественные липидные трансфекции для иРНК-опосредованных нокдаунов, нацеленных на различные области РНК-мишени, продолжительностью в неделю или более также рассматриваются в описании. Успешное введение векторов в клетки-хозяева можно контролировать с помощью различных известных способов. Например, сигналы транзистентной трансфекции можно детектировать с использованием репортера, такого как флуоресцентный маркер, такой как зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильную трансфекцию клеток *ex vivo* можно детектировать с использованием маркеров, которые придают трансфектированной клетке устойчивость к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным препаратам), например устойчивость к гигромицину В.

Вирусные векторные системы, которые можно использовать в способах и композициях, описанных здесь, включают без ограничения (а) аденовирусные векторы; (b)

ретровирусные векторы, включая без ограничения лентивирусные векторы, вирус лейкоза мышей Молони и т.д.; (с) векторы на основе аденоассоциированных вирусов; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе вируса SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы на основе поксвирусов, таких как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины или авипоксвируса, например, поксвируса канареек или вируса оспы птиц; и (j) зависимый от хелперов или имеющий усеченный геном аденовирус. Репликационно-дефектные вирусы также могут быть предпочтительными. Разные векторы будут включаться или не будут включаться в геном клеток. Конструкции при необходимости могут содержать вирусные последовательности для трансфекции. Альтернативно, конструкция может быть включена в векторы, способные к эписомной репликации, например, векторы EPV и EBV. Для конструкций для рекомбинантной экспрессии ИРНК-агента обычно могут потребоваться регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.д., чтобы обеспечить экспрессию ИРНК-агента в клетках-мишенях. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, известны в данной области.

Векторы, подходящие для доставки иРНК, должны включать регуляторные элементы (промотор, энхансер и т.д.), достаточные для экспрессии иРНК в желаемой клетке-мишени или ткани. Регуляторные элементы могут быть выбраны для обеспечения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцибельной экспрессии.

Экспрессию иРНК можно точно регулировать, например, с использованием индуцибельной регуляторной последовательности, чувствительной к определенным физиологическим регуляторам, например уровням циркулирующей глюкозы или гормонам (Docherty et al., 1994, FASEB J., 8:20-24). Такие индуцибельные экспрессионные системы, подходящие для контроля экспрессии дцРНК в клетках или в организме млекопитающих, включают, например, регуляцию экдизоном, эстрогеном, прогестероном, тетрациклином, химическими индукторами димеризации и изопропил- β -D1-тиогалактопиранозидом (IPTG). Специалист в данной области сможет выбрать подходящую регуляторную/промоторную последовательность на основе предполагаемого применения трансгена иРНК.

В конкретном варианте осуществления можно использовать вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК. Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Такие ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК, клонируют в один или несколько векторов, что облегчает доставку нуклеиновой кислоты пациенту. Более подробную информацию о ретровирусных векторах можно найти, например, в публикации Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), в которой описывается использование ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* в гемопозитические стволовые клетки с

целью получения стволовых клеток, более устойчивых к химиотерапии. Другими ссылками, иллюстрирующими использование ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes et al., *J. Clin. Invest.*, 93:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood*, 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy*, 4:129-141 (1993); и Grossman and Wilso, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.*, 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предполагаемые для использования, включают, например, векторы на основе ВИЧ, описанные в патентах США № 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ посредством ссылки.

Также предусматривается применение аденовирусов для доставки иРНК. Аденовирусы являются особенно привлекательными носителями, например, для доставки генов в респираторный эпителий. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, вызывая заболевание в легкой форме. Другими мишенями для систем доставки на основе аденовирусов являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышцы. Преимущество аденовирусов заключается в том, что они способны инфицировать неделящиеся клетки. Kozarsky and Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) представляют обзор по генной терапии на основе аденовирусов. Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) продемонстрировали применение аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий макака-резус. Другие примеры использования аденовирусов в генной терапии можно найти в публикациях Rosenfeld et al., *Cell*, 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.*, 91:225-234 (1993); публикация PCT WO 94/12649; и Wang et al., *Gene Therapy*, 2:775-783 (1995). Подходящий AV-вектор для экспрессии иРНК, раскрытый в описании, способ конструирования рекомбинантного AV-вектора и способ доставки вектора в клетки-мишени описаны Xia H. et al. (2002), *Nat. Biotech.*, 20: 1006-1010.

Также предусматривается использование векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В некоторых вариантах осуществления иРНК может быть экспрессирована в виде двух отдельных комплементарных молекул одноцепочечной РНК из рекомбинантного AAV вектора, имеющего, например, промоторы U6 или H1 РНК, или промоторы цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV векторы для экспрессии двухцепочечной РНК, раскрытые в описании, способы конструирования рекомбинантного AV вектора и способы доставки векторов в клетки-мишени описаны в публикациях Samulski R et al. (1987), *J. Virol.*, 61: 3096-3101; Fisher K. J. et al. (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski R. et al. (1989), *J. Virol.*, 63: 3822-3826; в патенте США № 5252479; патенте США № 5139941; международной патентной заявке WO 94/13788; и международной патентной заявке WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Другой типичный вирусный вектор представляет собой вирус оспы, такой как вирус коровьей оспы, например, аттенуированный вирус коровьей оспы, такой как модифицированный вирус осповакцины Ankara (MVA) или NYVAC, авипоксвирус, такой

как вирус оспы кур или оспы канареек.

Тропизм вирусных векторов можно модифицировать путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов или путем замены другими вирусными капсидными белками, в зависимости от конкретной ситуации. Например, лентивирусные векторы можно псевдотипировать поверхностными белками вируса везикулярного стоматита (VSV), бешенства, вирусов Эбола, Мокола и т.п. AAV векторы могут быть созданы для нацеливания на разные клетки путем конструирования векторов для экспрессии различных серотипов капсидного белка; см., например, публикацию Rabinowitz J.E. et al. (2002), J. Virol., 76:791-801, полное раскрытие которой включено здесь в качестве ссылки.

Фармацевтический препарат вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе или может включать матрицу с замедленным высвобождением, в который включен носитель для доставки гена. Альтернативно, когда полный вектор для доставки гена может быть получен интактным из рекомбинантных клеток, например, ретровирусные векторы, фармацевтический препарат может включать одну или более клеток, которые продуцируют систему для доставки гена.

III. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим иРНК, как здесь описано, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция, содержащая иРНК, применима для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией или активностью МУОС (например, глаукомы, например, первичной открытоугольной глаукомы (POAG)). Такие фармацевтические композиции формулируют с учетом способа доставки. В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть приготовлены для локальной доставки, например, путем интраокулярной доставки (например, интравитреальное введение, например, интравитреальная инъекция; трансклеральное введение, например, трансклеральная инъекция; субконъюнктивальное введение, например, субконъюнктивальная инъекция; ретробульбарное введение, например, ретробульбарная инъекция); внутрикамерное введение, например, внутрикамерная инъекция; или субретинальное введение, например, субретинальная инъекция). В еще одних вариантах осуществления композиции можно формулировать для местного применения. В еще одном примере композиции могут быть формулированы для системного введения посредством парентеральной доставки, например, путем внутривенной (в/в) доставки. В некоторых вариантах осуществления композиция, обеспеченная здесь (например, композиция, содержащая конъюгат GalNAc или состав LNP), формулируется для внутривенной доставки.

Фармацевтические композиции, описанные здесь, вводят в дозе, достаточной для ингибирования экспрессии МУОС. Как правило, подходящая доза иРНК будет находиться в диапазоне от 0,01 до 200,0 мг на кг массы тела реципиента в сутки. Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в сутки, или иРНК можно вводить в виде двух, трех

или более субдоз с соответствующими интервалами в течение суток или даже с использованием непрерывной инфузии или доставки с помощью состава с контролируемым высвобождением. В этом случае иРНК, содержащаяся в каждой субдозе, должна быть соответственно ниже для достижения суммарной суточной дозы. Разовая доза также может быть составлена для доставки в течение нескольких суток, например, с использованием обычного состава с замедленным высвобождением, который обеспечивает замедленное высвобождение иРНК в течение периода в несколько суток. Композиции с пролонгированным высвобождением хорошо известны в данной области и особенно пригодны для доставки агентов в конкретное место, следовательно, их можно использовать с агентами по настоящему изобретению. В этом варианте осуществления разовая доза содержит соответствующее кратное количество от суточной дозы.

Эффект однократной дозы на уровне МУОС может быть длительным, поэтому последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 суток или с интервалами не более 1, 2, 3, 4, 12, 24 или 36 недель.

Специалистам в данной области будет понятно, что на дозировку и временную схему введения, которые необходимы для эффективного лечения субъекта, могут оказывать влияние определенные факторы, включая, помимо прочего, тяжесть заболевания или расстройства, предшествующее лечение, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократное введение или серию введений. Оценки эффективных доз и периодов полураспада *in vivo* для отдельных иРНК, охватываемых настоящим изобретением, можно выполнить с использованием обычных методологий или на основе тестирования *in vivo* с использованием подходящей модели на животных.

Подходящая модель на животных, например, на мыши или макаке-крабоеде, например, животном, содержащем трансген, экспрессирующий МУОС человека, может быть использована для определения терапевтически эффективной дозы и/или эффективной схемы дозирования при введении миРНК МУОС.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и составам, которые включают соединения иРНК, заявленные здесь. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими способами в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от области, которая подвергается лечению. Введение может быть локальным (например, интраокулярной инъекцией), местным (например, раствором глазных капель) или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; подкожное введение, например, с использованием имплантированного устройства; или интракраниальное введение, например, путем интрапаренхиматозного, интратекального или интравентрикулярного введения.

Фармацевтические композиции и составы для местного введения могут включать

трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. Презервативы, перчатки с покрытием и т.п. также могут быть пригодными. Подходящие составы для местного применения включают составы, в которых иРНК, раскрытые в описании, находятся в смеси с агентом для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатообразующие агенты и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидил DOPE этаноламин, димиристоилфосфатидилхолин DMPC, дистеаролфосфатидилхолин), негативные (например, димиристоилфосфатидилглицерин DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил DOTAP и диолеоилфосфатидилэтанолламин DOTMA). иРНК, раскрытые в описании, могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать с ними комплексы, в частности, с катионными липосомами. Альтернативно иРНК могут образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, не ограничиваясь этим, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C_{1-20} алкиловый эфир (например, изопропилмиристенат IPM), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемая соль. Препараты для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

Липосомальные составы

Помимо микроэмульсий существует множество организованных структур на основе поверхностно-активных веществ, которые были изучены и использованы для приготовления лекарственных препаратов. К ним относятся монослои, мицеллы, бислои и везикулы. Везикулы, такие как липосомы, вызывают большой интерес благодаря их специфичности и продолжительности действия, которое они обеспечивают с точки зрения доставки лекарственных средств. В рамках настоящего изобретения термин «липосома» означает везикулу, состоящую из амфифильных липидов, расположенных в виде сферического бислоя или бислоев.

Липосомы представляют собой однослойные или многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного вещества, и водное внутреннее пространство. Водное пространство содержит композицию для доставки. Преимущество катионных липосом заключается в том, что они способны сливаться с клеточной стенкой. Некатионные липосомы, хотя и не способны так же эффективно сливаться с клеточной стенкой, поглощаются макрофагами *in vivo*.

Для проникновения через неповрежденную кожу млекопитающих липидные

везикулы должны пройти через ряд мелких пор, каждая диаметром менее 50 нм, за счет соответствующего трансдермального градиента. Следовательно, желательно использовать липосому, которая обладает высокой деформируемостью и способна проходить через такие мелкие поры.

Дополнительные преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биodeградируемыми; липосомы могут включать широкий ряд водорастворимых и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные лекарственные средства в их внутренних компартментах от метаболизма и деградации (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, volume 1, p. 245). Важными факторами при приготовлении липосомальных композиций являются поверхностный заряд липидов, размер везикул и водный объем липосом.

Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к месту проявления действия. Поскольку липосомальная мембрана структурно подобна биологическим мембранам, и когда липосомы наносятся на ткань, то липосомы начинают сливаться с клеточными мембранами, и по мере слияния липосомы и клетки содержимое липосом высвобождается в клетку, где агент может активно действовать.

Липосомальные препараты были предметом обширных исследований в качестве способа доставки многих лекарственных препаратов. Появляется все больше доказательств того, что для местного применения липосомы имеют ряд преимуществ по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают снижение побочных эффектов, связанных с высокой системной абсорбцией вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в нужной мишени и возможность введения в кожу широкого спектра лекарственных средств, как гидрофильных, так и гидрофобных.

В нескольких сообщениях подробно описана способность липосом доставлять агенты, включая высокомолекулярную ДНК, в кожу. В кожу вводили соединения, включающие анальгетики, антитела, гормоны и высокомолекулярные ДНК. Большинство аппликаций приводили к нацеливанию на верхний эпидермис.

Липосомы делятся на две больших группы. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновой кислоты с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс ДНК/липосома связывается с отрицательно заряженной поверхностью клетки и интернализуется в эндосому. За счет кислого значения pH внутри эндосомы липосомы разрушаются, высвобождая свое содержимое в цитоплазму клетки (Wang et al. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:980-985).

Липосомы, чувствительные к pH, или отрицательно заряженные липосомы, захватывают нуклеиновые кислоты, а не образуют с ними комплексы. Поскольку и нуклеиновая кислота, и липид заряжены одинаково, то происходит скорее отталкивание,

чем образование комплекса. Тем не менее, некоторое количество нуклеиновой кислоты захватывается внутрь водного пространства этих липосом. Липосомы, чувствительные к рН, использовались для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в клеточные монослои в культуре. Экспрессию экзогенного гена обнаруживали в клетках-мишенях (Zhou et al. (1992) *Journal of Controlled Release*, 19:269-274).

Один из основных типов липосомальной композиции включает фосфолипиды, отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Нейтральные липосомальные композиции, например, могут быть получены из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомальные композиции обычно образуются из димиристоилфосфатидилглицерина, в то время как анионные фузогенные липосомы образуются главным образом из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомальной композиции образуется из фосфатидилхолина (PC), например, такого как соевый PC и яичный PC. Другой тип образуется из смесей фосфолипидов, фосфатидилхолина или холестерина.

В нескольких исследованиях оценивалась местная доставка липосомальных лекарственных форм в кожу. Нанесение липосом, содержащих интерферон, на кожу морской свинки привело к уменьшению кожных герпетических высыпаний, в то время как доставка интерферона другими способами (например, в виде раствора или эмульсии) оказалась неэффективной (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Кроме того, в еще одном исследовании была протестирована эффективность интерферона, вводимого как часть липосомальной композиции, при сравнении с введением интерферона с использованием водной системы, и был сделан вывод о том, что липосомальная композиция превосходит введение с водной системой (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

Неионогенные липосомальные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина А в дерму кожи мыши. Результаты показали, что такие неионогенные липосомальные системы эффективно способствуют отложению циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu et al. (1994) *S.T.P. Pharma. Sci.*, 4(6):466).

Липосомы также включают «стерически стабилизированные» липосомы, термин, который в используемом здесь смысле, относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к повышению периода полураспада в кровотоке по сравнению с липосомами, в которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами стерически стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть везикула-образующих липидов липосомы (А) содержит один или более гликолипидов, таких как

моносиалоганглиозид GM1, или (B) дериватизована одним или более гидрофильными полимерами, такими как группа полиэтиленгликоля (ПЭГ). Не желая ограничиваться конкретной теорией, в данной области полагают, что, по меньшей мере, в случае стерически стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или ПЭГ-дериватизованные липиды, увеличенное время полураспада таких стерически стабилизированных липосом в кровотоке происходит, вследствие пониженного захвата в клетки ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Различные липосомы, содержащие один или более гликолипидов, известны в данной области. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) сообщили о способности моносиалоганглиозид GM1, галактоцереброзидсульфата и фосфатидилинозитола увеличивать время полураспада липосом в крови. Эти данные были уточнены Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и в заявке WO 88/04924 Allen et al. раскрыли липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид GM1 или сложный эфир галактоцереброзидсульфата. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al.).

В данной области известны многие липосомы, содержащие липиды, дериватизированные одним или более гидрофильными полимерами, и способы их получения. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) описали липосомы, содержащие неионогенный детергент 2C₁₂15G, который содержит группу ПЭГ. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) отметили, что гидрофильное покрытие полистироловых частиц полимерными гликолями приводит к достоверному увеличению времени полураспада в крови. Синтетические фосфолипиды, модифицированные присоединением карбоксильных групп полиалкиленгликолей (например, ПЭГ), описаны Sears (патенты США № 4426330 и 4534899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) описали результаты экспериментов, демонстрирующих, что липосомы, содержащие фосфатидилэтаноламин (PE), дериватизированный ПЭГ или стеаратом ПЭГ, имеют достоверное увеличение времени полураспада в кровотоке. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) распространили такие наблюдения на другие фосфолипиды, производные ПЭГ, например, DSPE-PEG, образованный из комбинации дистеароилфосфатидилэтаноламина (DSPE) и ПЭГ. Липосомы, имеющие ковалентно связанные группы ПЭГ на их внешней поверхности, описаны в Европейском патенте EP 0445131 B1 и WO 90/04384, Fisher. Липосомальные композиции, содержащие 1-20 моль% PE, дериватизированного ПЭГ, и способы их применения описаны Woodle et al. (патенты США № 5013556 и 5356633) и Martin et al. (патент США № 5213804 и Европейский патент EP 0496813 B1). Липосомы, содержащие ряд других конъюгатов липид-полимер, раскрыты в WO 91/05545 и патенте США № 5225212 (авторы обоих Martin et al.) и в WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Липосомы, содержащие ПЭГ-модифицированные церамидные липиды, описаны в WO 96/10391 (Choi et al.), патенте США № 5540935 (Miyazaki et al.), и в патенте США № 5556948 (Tagawa et

al.) описаны ПЭГ-содержащие липосомы, которые можно дополнительно дериватизировать функциональными группами на их поверхности.

В данной области известен ряд липосом, содержащих нуклеиновые кислоты. В WO 96/40062, Thierry et al., раскрываются способы инкапсулирования нуклеиновых кислот с высокой молекулярной массой в липосомы. В патенте США № 5264221, авторы Tagawa et al., раскрываются связанные с белком липосомы, и утверждается, что содержимое таких липосом может включать дцРНК. В патенте США № 5665710, авторы Rahman et al., описаны некоторые способы инкапсулирования олигодезоксинуклеотидов в липосомы. В WO 97/04787, авторы Love et al., раскрываются липосомы, содержащие дцРНК, нацеленные на ген *raf*.

Трансферсомы, еще один тип липосом, представляют собой высокодеформируемые липидные агрегаты, которые являются привлекательными кандидатами в качестве средств для доставки лекарственных препаратов. Трансферсомы можно описать как капли липидов, которые настолько высоко деформируются, что они могут легко проникать через поры, которые меньше самой капли. Трансферсомы адаптируются к среде, в которой они используются, например, они самооптимизируются (адаптируются к форме пор кожи), самовосстанавливаются, часто достигают своих мишеней без фрагментации и часто самозагружаются. Для получения трансферсом к стандартной липосомальной композиции можно добавить активаторы краевых поверхностей, обычно поверхностно-активные вещества. Трансферсомы использовали для доставки сывороточного альбумина в кожу. Показано, что опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина столь же эффективна, как и подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как описанные здесь, в частности, в эмульсиях (включая микроэмульсии) и липосомах. Наиболее распространенный способ классификации и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, заключается в использовании гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Свойства гидрофильной группы (известной также как «головка») обеспечивает наиболее полезные критерии для классификации различных поверхностно-активных веществ, используемых в препаратах (Rieger, в монографии «Pharmaceutical Dosage Forms», Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизована, то такая молекула относится к группе неионогенных поверхностно-активных веществ. Неионогенные поверхностно-активные вещества широко применяются в фармацевтических и косметических продуктах и используются в широком интервале значений pH. Обычно значения HLB находятся в диапазоне 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, глицериловые сложные эфиры, полиглицериловые сложные эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные

эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. В группу таких соединений также включаются неионогенные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирного спирта, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блоксополимеры. Наиболее известными представителями группы неионогенных поверхностно-активных веществ являются полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд, в том случае, когда она растворена или диспергирована в воде, то такое поверхностно-активное вещество классифицируют как анионогенное. Анионогенными поверхностно-активными веществами являются карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламины аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионогенных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и мыла.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд, в том случае, когда она растворена или диспергирована в воде, то такое поверхностно-активное вещество классифицируют как катионогенное. Катионогенными поверхностно-активными веществами являются четвертичные аммониевые соли и этоксилированные амины. Наиболее часто используемыми представителями такого класса являются четвертичные аммониевые соли.

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

Имеется обзор по использованию поверхностно-активных веществ в лекарственных препаратах, составах и эмульсиях (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Частицы нуклеиновая кислота-липид

В некоторых вариантах осуществления дцРНК MYOC, заявленная в настоящем описании, полностью инкапсулируется в липидный состав, например, с образованием частиц SPLP, pSPLP, SNALP или других частиц нуклеиновая кислота-липид. SNALP и SPLP обычно содержат катионный липид, некатионный липид и липид, предотвращающий агрегацию частицы (например, конъюгат ПЭГ-липид). SNALP и SPLP чрезвычайно пригодны для системного применения, поскольку они демонстрируют увеличенное время нахождения в кровотоке после внутривенной (в/в) инъекции и накапливаются в отдаленных местах (например, местах, физически отделенных от места введения). SPLP включают «pSPLP», которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующий агент-нуклеиновая кислота, как описано в публикации PCT № WO 00/03683. Частицы по

настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр примерно от 50 нм до примерно 150 нм, более предпочтительно примерно от 60 нм до примерно 130 нм, более предпочтительно примерно от 70 нм до примерно 110 нм, наиболее предпочтительно примерно от 70 нм до примерно 90 нм, и практически нетоксичны. Кроме того, нуклеиновые кислоты, если они присутствуют в частицах нуклеиновая кислота-липид по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к расщеплению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США № 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; и публикации PCT WO 96/40964.

В некоторых вариантах осуществления соотношение липида к лекарственному средству (мас./мас. соотношение) (например, соотношение липида к дцРНК) будет находиться в диапазоне примерно от 1:1 до примерно 50:1, примерно от 1:1 до примерно 25:1, примерно от 3:1 до примерно 15:1, примерно от 4:1 до примерно 10:1, примерно от 5:1 до примерно 9:1 или примерно от 6:1 до примерно 9:1.

Катионным липидом может быть, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTAP), N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония хлорид (DOTMA), N,N-диметиламмония хлорид -2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-Дилинолейокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-Дилинолейокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-Дилинолеоил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеоил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMA), 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропан хлоридная соль (DLin-TMA.Cl), хлоридная соль 1,2-дилинолеоил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(Н,Н-Дилинолейамино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или их аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1), или их смесь. Катионный липид может составлять примерно от 20 моль % до примерно 50 моль % или примерно 40 моль % от общего количества липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан можно использовать для получения наночастиц липид-

миРНК. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США № 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления частица липид-миРНК включает 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана: 10% DSPC: 40% холестерина: 10% ПЭГ-С-DOMG (моль %) с размером частиц $63,0 \pm 20$ нм и соотношением миРНК/липид, равным 0,027.

Некатионный липид может быть анионным липидом или нейтральным липидом, включая, помимо прочего, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтаноламин 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE), дистеароил-фосфатидил -этаноламин (DSPE), 16-О-монометил PE, 16-О-диметил PE, 18-1-транс PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять примерно от 5 моль % до примерно 90 моль %, примерно 10 моль % или примерно 58 моль %, если включен холестерин, от общего количества липидов, присутствующих в частице.

Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может представлять собой, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ)-липид, включая, без ограничения, ПЭГ-диацилглицерин (DAG), ПЭГ-диалкилоксипропил (DAA), ПЭГ-фосфолипид, ПЭГ-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат ПЭГ-DAA может представлять собой, например, ПЭГ-дилаурилоксипропил (C12), ПЭГ-димиристилоксипропил (C14), ПЭГ-дипальмитилоксипропил (C16) или ПЭГ-дистеарилоксипропил (C18). Конъюгированный липид, который предотвращает агрегацию частиц, может находиться на уровне от 0 моль % до примерно 20 моль % или примерно на уровне 2 моль % от общего количества липидов, присутствующих в частице.

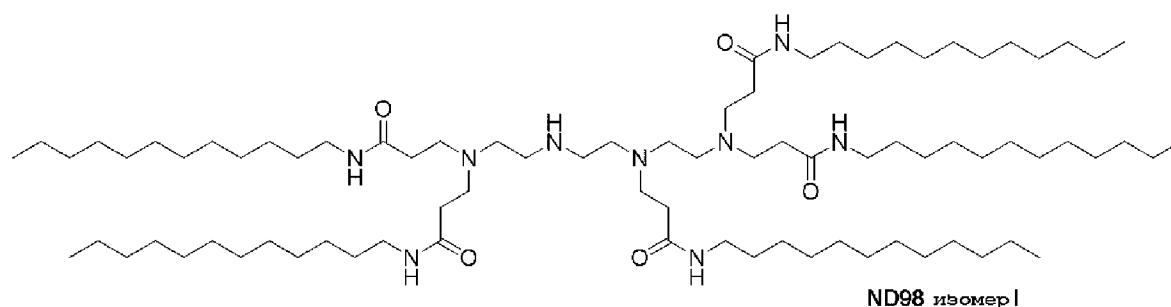
В некоторых вариантах осуществления частица нуклеиновая кислота-липид дополнительно включает холестерин в количестве, например, примерно от 10 моль % до примерно 60 моль % или примерно 48 моль % от общего количества липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления иРНК включают в состав липидных наночастиц (LNP).

LNP01

В некоторых вариантах осуществления липидоид ND98·4HCl (молекулярная масса 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и ПЭГ-церамид. C16 (Avanti Polar Lipids) можно использовать для получения наночастиц липид-

дцРНК (например, частиц LNP01). Стоковые растворы каждого указанного соединения в этаноле можно приготовить следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл, ПЭГ-керамид C16, 100 мг/мл. Стоковые растворы ND98, холестерина и ПЭГ-церамида C16 затем можно объединить, например, в молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешать с водным раствором дцРНК (например, в ацетате натрия, pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла примерно 35-45%, и конечная концентрация ацетата натрия составляла примерно 100-300 мМ. Наночастицы липид-дцРНК обычно образуются спонтанно при смешивании. В зависимости от желаемого распределения частиц по размерам полученную смесь наночастиц можно экструдировать через поликарбонатную мембрану (например, с порогом отсечения 100 нм) с использованием, например, термоцилиндрического экструдера, такого как Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). В некоторых случаях стадию экструзии можно исключить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут осуществляться, например, диализом или тангенциальной проточной фильтрацией. Буфер можно заменить, например, забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS) с pH примерно 7, например, примерно pH 6,9, примерно pH 7,0, примерно pH 7,1, примерно pH 7,2, примерно pH 7,3 или примерно pH 7,4.



Формула 1

Составы LNP01 описаны в WO 2008/042973, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы липид-дцРНК приведены в Таблице 1 ниже.

Таблица 8

Иллюстративные липидные составы

	Катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат ПЭГ-липид Соотношение липид:миРНК
SNALP	1,2-Дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:миРНК □ 7:1
S-XTC	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-	XTC/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4

	[1,3]диоксолан (ХТС)	липид:миPHK □ 7:1
LNP05	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миPHK □ 6:1
LNP06	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:миPHK □ 11:1
LNP07	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миPHK □ 6:1
LNP08	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:миPHK □ 11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1)	C12-200/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHK: 33:1

LNP14	MC3	MC3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:миPHК: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Холестерин/PEG-DSG/GalNAc- PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:миPHК: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHК: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHК: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHК: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Холестерин/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:миPHК: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Холестерин/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHК: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHК: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Холестерин/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:миPHК: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

PEG-DMG: PEG-дидириристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средней молекулярной массой 2000);

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средней молекулярной массой 2000);

PEG-cDMA: составы, содержащие PEG-карбамоил-1,2-димиристиллоксипропиламин (PEG со средней молекулярной массой 2000)

Составы, содержащие SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации заявки WO2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Составы, содержащие ХТС, описаны, например, в заявке на патент США 61/148366, поданной 29 января 2009 г.; в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/156851, поданной 2 марта 2009 г.; в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером США 61/185712, поданной 10 июня 2009 г.; в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/228373, поданной 24 июля 2009 г.; в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/239686, поданной 3 сентября 2009 г., и международной заявке PCT/US2010/022614, поданной 29 января 2010 г., которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Составы, содержащие МСЗ, описаны, например, в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/244834, поданной 22 сентября 2009 г., в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/185800, поданной 10 июня 2009 г., и в международной заявке PCT/US10/28224, поданной 10 июня 2010 г., которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны, например, в международной патентной заявке PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Составы, содержащие С12-200, описаны в предварительной заявке на патент США с регистрационным номером 61/175770, поданной 5 мая 2009 г., и в международной заявке PCT/US10/33777, поданной 5 мая 2010 г., которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

Синтез катионных липидов

Любое из соединений, например, катионные липиды и т.п., используемые в частицах нуклеиновая кислота-липид, заявленных в настоящем описании, может быть получено известными способами органического синтеза. Все заместители определены ниже, если не указано иное.

Термин «алкил» означает нециклический или циклический, насыщенный алифатический углеводород с прямой или разветвленной цепью, содержащий от 1 до 24 атомов углерода. Репрезентативные насыщенные алкилы с прямой цепью включают метил, этил, н-пропил, н-бутил, н-пентил, н-гексил и т.п.; тогда как насыщенные разветвленные алкилы включают изопропил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил, изопентил и т.п. Репрезентативные насыщенные циклические алкилы включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил и т.п.; тогда как ненасыщенные циклические алкилы включают циклопентенил и циклогексенил и т.п.

Термин «алкенил» означает алкил, имеющий значение, определенное выше, содержащий, по меньшей мере, одну двойную связь между соседними атомами углерода. Алкенилы включают как цис-, так и транс-изомеры. Репрезентативные алкенилы с прямой и разветвленной цепью включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил,

изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т.п.

Термин «алкинил» означает любой алкил или алкенил, имеющий значения, определенные выше, который также содержит, по меньшей мере, одну тройную связь между соседними атомами углерода. Репрезентативные алкинилы с прямой и разветвленной цепью включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.п.

Термин «ацил» означает любой алкил, алкенил или алкинил, в котором углерод в точке присоединения замещен оксогруппой, как определено ниже. Например, -C(=O)алкил , -C(=O)алкенил и -C(=O)алкинил представляют собой ацильные группы.

Термин «гетероцикл» означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое гетероциклическое кольцо, которое является насыщенным, ненасыщенным или ароматическим, и которое содержит 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из атомов азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азот и сера могут быть необязательно окислены, и гетероатом азот может быть необязательно кватернизован, включая бициклические кольца, в которых любой из указанных выше гетероциклов конденсирован с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, как определено ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактамыл, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и т.п.

Термины «необязательно замещенный алкил», «необязательно замещенный алкенил», «необязательно замещенный алкинил», «необязательно замещенный ацил» и «необязательно замещенный гетероцикл» означают, что при замещении, по меньшей мере, один атом водорода замещен заместителем. В случае оксо-заместителя (=O) замещаются два атома водорода. В связи с этим заместители включают оксо, атом галогена, гетероцикл, -CN , -OR^x , $\text{-NR}^x\text{R}^y$, $\text{-NR}^x\text{C(=O)R}^y$, $\text{-NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$, -C(=O)R^x , -C(=O)OR^x , $\text{-C(=O)NR}^x\text{R}^y$, $\text{-SO}_n\text{R}^x$ и $\text{-SONNR}^x\text{R}^y$, где n равно 0, 1 или 2, R^x и R^y являются одинаковыми или разными, и независимо представляют водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных алкильных и гетероциклических заместителей может быть дополнительно замещен одним или более из оксо, атома галогена, -OH , -CN , алкила, -OR^x , гетероцикла, $\text{-NR}^x\text{R}^y$, $\text{-NR}^x\text{C(=O)R}^y$, $\text{-NR}^x\text{SO}_2\text{R}^y$, -C(=O)R^x , -C(=O)OR^x , $\text{-C(=O)NR}^x\text{R}^y$, $\text{-SO}_n\text{R}^x$ и $\text{-SONNR}^x\text{R}^y$.

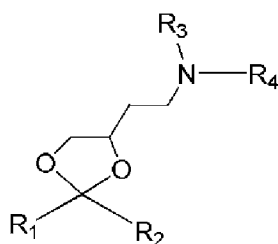
«Галоген» означает атом фтора, хлора, брома и йода.

В некоторых вариантах осуществления для способов, заявленных в настоящем описании, может потребоваться использования защитных групп. Методология защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего раскрытия представляют собой

любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональной группы. Защитную группу можно добавить к функциональной группе, чтобы «скрыть» ее реакционную способность во время определенных реакций, и затем удалить, чтобы открыть исходную функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления используется «защитная группа для спирта». «Защитная группа для спирта» представляет собой любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную реакционную способность функциональной группы спирта. Защитные группы могут быть добавлены и удалены с использованием методов, хорошо известных в данной области техники.

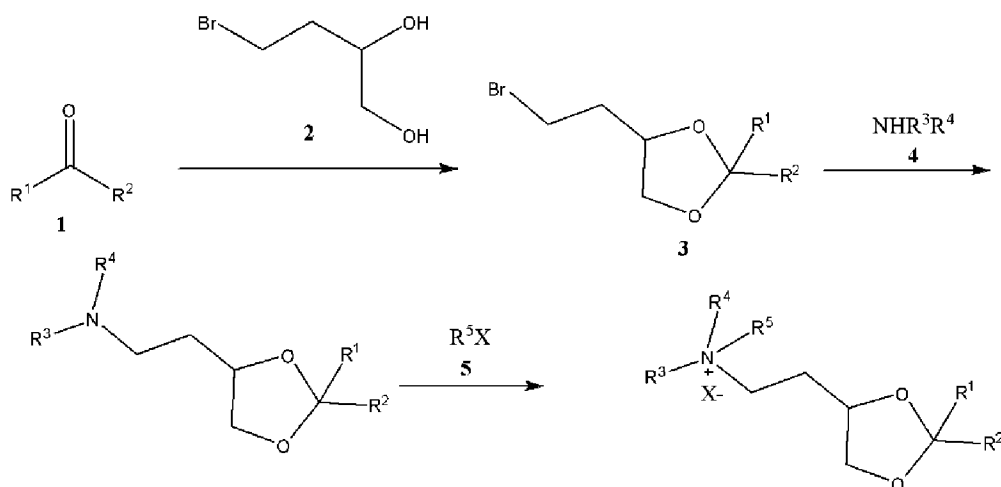
Синтез соединения формулы А

В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид, описанные здесь, составлены с использованием катионного липида формулы А:



где R^1 и R^2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, каждый из которых может быть необязательно замещен, и R^3 и R^4 независимо представляют собой низший алкил, или R^3 и R^4 , взятые вместе образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой ХТС (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан). Как правило, липид формулы А, приведенной выше, может быть получен согласно следующим схемам реакций 1 или 2, в которых все заместители являются такими, как определено выше, если не указано иное.

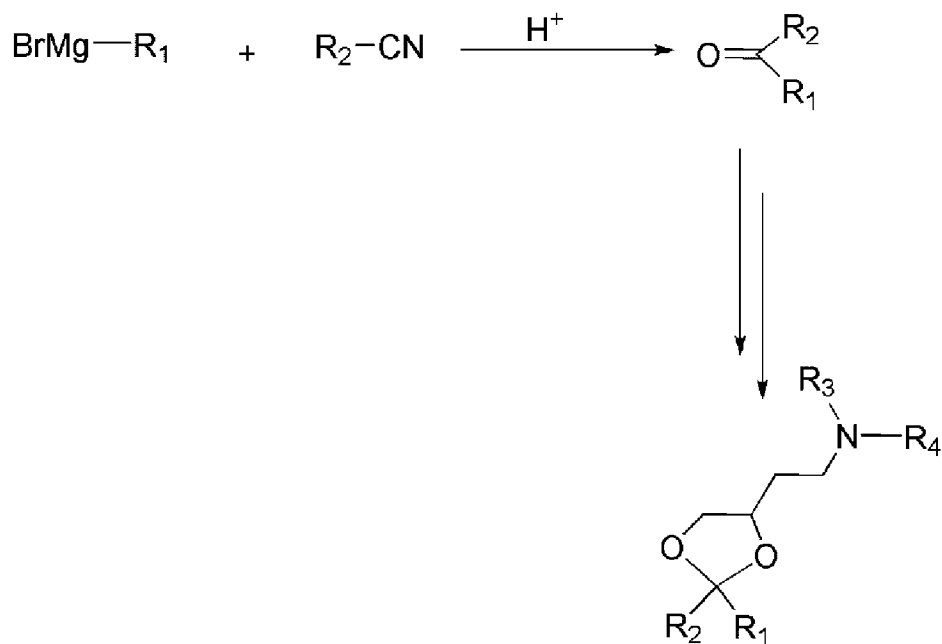
Схема 1



Липид А, где R^1 и R^2 независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, каждый из которых может быть необязательно замещен, и R^3 и R^4 независимо представляют

собой низший алкил, или R^3 и R^4 , взятые вместе образуют необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, может быть получен согласно схеме 1. Кетон 1 и бромид 2 являются коммерчески доступными, или их можно получить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Реакция 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кетала 3 амином 4 дает липиды формулы А. Липиды формулы А можно преобразовать в соответствующую аммониевую соль с использованием органической соли формулы 5, где X представляет собой выбранный противоион аниона из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата и т.п.

Схема 2



Альтернативно, исходное вещество, кетон 1, может быть получено согласно схеме реакций 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 являются коммерчески доступными, или их можно получить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области. Реакция 6 и 7 дает кетон 1. Превращение кетона 1 в соответствующие липиды формулы А описано на Ссхеме 1.

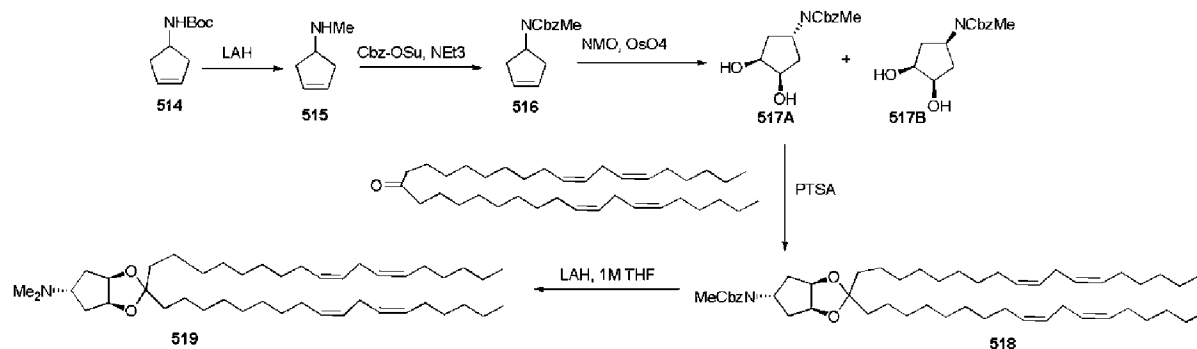
Синтез соединения МС3

Получение DLin-M-C3-DMA (т.е. (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино)бутаноата) было следующим. Раствор (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ола (0,53 г), 4-N,N-диметиламиномасляной кислоты гидрохлорида (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной соляной кислотой, и затем разбавленным водным раствором бикарбоната натрия. Органические фракции высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и растворитель удаляли на ротационном испарителе. Остаток пропускали через колонку с силикагелем (20 г), используя градиент элюции 1-5% метанол/дихлорметан. Фракции, содержащие очищенный продукт, объединяли и удаляли растворитель с

получением бесцветного масла (0,54 г).

Синтез соединения ALNY-100

Синтез кетала 519 [ALNY-100] проводили по следующей схеме 3:



Синтез соединения 515:

К перемешиваемой суспензии LiAlH_4 (3,74 г, 0,09852 моль) в 200 мл безводного ТГФ в двугорлой круглодонной колбе (1 л) медленно добавляли раствор соединения 514 (10 г, 0,04926 моль) в 70 мл ТГФ при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и затем кипятили с обратным холодильником в течение 4 ч. За ходом реакции следили с использованием ТСХ. После завершения реакции (по данным ТСХ) смесь охлаждали до 0°C и гасили осторожным добавлением насыщенного раствора Na_2SO_4 . Реакционную смесь перемешивали 4 ч при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали ТГФ. Фильтрат и промывные воды смешивали и разбавляли 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl и перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Летучие вещества удаляли в вакууме с плучением гидрохлорида соединения 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г. ^1H -ЯМР (ДМСО, 400 МГц): $\delta=9,34$ (шир., 2H), 5,68 (с, 2H), 3,74 (м, 1H), 2,66-2,60 (м, 2H), 2,50-2,45 (м, 5H).

Синтез соединения 516:

К перемешиваемому раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в двухгорлой круглодонной колбе емкостью 250 мл добавляли NEt_3 (37,2 мл, 0,2669 моль) и охлаждали до 0°C в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилоксикарбонилокси)сукцинимид (20 г, 0,08007 моль) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси давали подогреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч по данным ТСХ) смесь последовательно промывали 1 Н раствором HCl (1×100 мл) и насыщенным раствором NaHCO_3 (1×50 мл). Затем органический слой высушивали над безводным Na_2SO_4 и растворитель выпаривали с получением сырого вещества, которое очищали колоночной хроматографией на силикагеле с получением соединения 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%). ^1H -ЯМР (CDCl_3 , 400 МГц): $\delta=7,36$ -7,27 (м, 5H), 5,69 (с, 2H), 5,12 (с, 2H), 4,96 (шир., 1H), 2,74 (с, 3H), 2,60 (м, 2H), 2,30-2,25 (м, 2H). ЖХ-МС $[\text{M}+\text{H}]$ -232,3 (96,94%).

Синтез соединений 517A и 517B:

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды

(10:1) в одnogорлой круглодонной колбы емкостью 500 мл и добавляли N-метилморфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), и затем 4,2 мл 7,6% раствора OsO₄ (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~ 3 ч) смесь гасили добавлением твердого Na₂SO₃ и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разбавляли DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), затем насыщенным раствором NaHCO₃ (1×50 мл), водой (1×30 мл) и, наконец, насыщенным раствором соли (1×50 мл). Органическую фазу высушили над Na₂SO₄, и растворитель удаляли в вакууме. Хроматографическая очистка неочищенного вещества на колонке с силикагелем давала смесь диастереомеров, которые разделяли препаративной ВЭЖХ. Выход: - 6 г сырого вещества.

Соединение 517A - Пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%). ¹H-ЯМР (ДМСО, 400 МГц): δ= 7,39-7,31 (м, 5H), 5,04 (с, 2H), 4,78-4,73 (м, 1H), 4,48-4,47 (д, 2H), 3,94-3,93 (м, 2H), 2,71 (с, 3H), 1,72-1,67 (м, 4H). ЖХ-МС - [M+H]⁺-266,3, присутствует [M+NH₄]⁺-283,5, ВЭЖХ-97,86%. Стереохимия подтверждена рентгенологически.

Синтез соединения 518:

Используя процедуру, аналогичную описанной для синтеза соединения 505, получали соединение 518 (1,2 г, 41%) в виде бесцветного масла. ¹H-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ=7,35-7,33 (м, 4H), 7,30-7,27 (м, 1H), 5,37-5,27 (м, 8H), 5,12 (с, 2H), 4,75 (м, 1H), 4,58-4,57 (м, 2H), 2,78-2,74 (м, 7H), 2,06-2,00 (м, 8H), 1,96-1,91 (м, 2H), 1,62 (м, 4H), 1,48 (м, 2H), 1,37-1,25 (шир.м, 36H), 0,87 (м, 6H). ВЭЖХ-98,65%.

Общая процедура синтеза соединения 519:

Раствор соединения 518 (1 экв) в гексане (15 мл) по каплям добавляли к охлажденному на льду раствору ЛАН в ТГФ (1 М, 2 экв). После завершения добавления смесь нагревали при 40°C в течение 0,5 ч, затем снова охлаждали на бане со льдом. Смесь осторожно гидролизовали насыщенным водным раствором Na₂SO₄, затем фильтровали через целит и концентрировали до получения масла. Колоночная хроматография давала чистое соединение 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла. ¹³C ЯМР=130,2, 130,1 (x2), 127,9 (x3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (x2), 29,7, 29,6 (x2), 29,5 (x3), 29,3 (x2), 27,2 (x3), 25,6, 24,5, 23,3, 22,6, 14,1; масс-спектрометрия с электрораспылительной ионизацией (+ve): молекулярная масса C₄₄H₈₀NO₂ (M+H)⁺. Рассчитано 654,6, найдено 654,6.

Аналогичным образом можно охарактеризовать составы, приготовленные как стандартным, так и безэкструзионным способом. Например, составы обычно характеризовали визуальным осмотром. Это должны быть беловатые полупрозрачные растворы без агрегатов или осадка. Размер частиц и распределение частиц липид-наночастицы по размерам можно измерить по светорассеянию, используя, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Размер частиц должен составлять примерно 20-300 нм, например 40-100 нм. Распределение частиц по размеру должно быть унимодальным. Общую концентрацию дцРНК в составе, а также захваченную фракцию оценивали с использованием анализа исключения красителя. Образец формулированной

дцРНК можно инкубировать с РНК-связывающим красителем, таким как Ribogreen (Molecular Probes), в присутствии или в отсутствие поверхностно-активного вещества, разрушающего состав, например, 0,5% Тритон-Х100. Общее количество дцРНК в составе можно определить по сигналу от образца, содержащего поверхностно-активное вещество, по стандартной кривой. Захваченную фракцию определяют вычитанием содержания «свободной» дцРНК (измеряемого по сигналу в отсутствие поверхностно-активного вещества) из общего содержания дцРНК. Процент захваченной дцРНК обычно составляет >85%. Для состава SNALP размер частиц составляет, по меньшей мере, 30 нм, по меньшей мере, 40 нм, по меньшей мере, 50 нм, по меньшей мере, 60 нм, по меньшей мере, 70 нм, по меньшей мере, 80 нм, по меньшей мере, 90 нм, по меньшей мере, 100 нм, по меньшей мере, 110 нм и по меньшей мере, 120 нм. Подходящий диапазон обычно составляет примерно от 50 нм до примерно 110 нм, примерно от 60 нм до примерно 100 нм или примерно от 80 нм до примерно 90 нм.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или в безводных средах, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или мини-таблетки. Для их получения может оказаться желательным использование загустителей, ароматизаторов, разбавителей, эмульгаторов, диспергирующих добавок или связующих агентов. В некоторых вариантах осуществления составами для перорального введения являются препараты, в случае которых дцРНК, описанную здесь, вводят в сочетании с одним или более усилителями проникновения, поверхностно-активными веществами и хелатообразующими агентами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящими желчными кислотами/солями являются хенодезоксихолевая кислота (CDCA) и урзидезоксиходезоксихолевая кислота (UDCA), холевая кислота, дегидрохолевая кислота, дезоксихолевая кислота, глюкохолевая кислота, гликохолевая кислота, гликодезоксихолевая кислота, таурохолевая кислота, таурозидезоксихолевая кислота, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящими жирными кислотами являются арахионовая кислота, ундекановая кислота, олеиновая кислота, лауриновая кислота, каприловая кислота, каприновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, линолевая кислота, линоленовая кислота, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопентан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемые соли (например, соли натрия). В некоторых вариантах используют комбинации усилителей проницаемости, например жирных кислот/солей в сочетании с желчными кислотами/солями. Одним примером комбинации является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Другими усилителями проницаемости являются полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. днРНК, охарактеризованные в изобретении, могут быть доставлены перорально, в гранулярной форме, включая распыляемые сухие частицы,

или в комплексе с образованием микро- или наночастиц. Агенты, образующие комплексы с днРНК, включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (ПЭГ) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-derivatизированные полиимины, пуллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящими комплексообразующими агентами являются хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламин метилэтилен P(TDAE), полиаминостирол (например, п-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочная кислота), сополимер DL-молочной и гликолевой кислоты (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Составы для перорального введения днРНК и их получение подробно описаны в патенте США 6887906, публикации заявки на патент США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интратекального, интравитреального, субретинального, трансклерального, субконъюнктивного, ретробульбарного, интракамерного, интравентрикулярного введения или введения в печень могут включать стерильные водные растворы, которые могут также содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как, без ограничения, усилители проницаемости, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать без ограничения растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции можно получить из различных компонентов, которые включают, без ограничения, предварительно приготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества.

Фармацевтические препараты по настоящему изобретению, которые обычно могут представлять собой разовую лекарственную форму, можно получить обычными способами, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие способы включают в себя стадию смешивания активных ингредиентов с фармацевтически приемлемым(и) носителем(ями) и эксципиентом(ами). В общем, составы получают путем равномерного и тщательного смешивания активных ингредиентов с жидкими носителями и с тонко измельченными твердыми носителями или с теми и другими, с последующим, если это необходимо, формованием продукта.

Композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в любой из многих возможных лекарственных форм, без ограничения, таких как таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции также можно приготовить в виде суспензий в водной, безводной или смешанной среде. Водные

суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Такая суспензия может также содержать стабилизаторы.

Дополнительные составы

Эмульсии

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и формулированы в виде эмульсий. Эмульсии обычно представляют собой гетерогенные системы, состоящие из одной жидкости, диспергированной в другой жидкости в виде капель, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешивающиеся жидкие фазы, однородно смешанные и диспергированные одна в другой. В общем, эмульсии могут представлять собой либо эмульсии типа «вода-в-масле» (в/м), либо «масло-в-воде» (м/в). Если водная фаза является тонкодисперсной и диспергирована в виде небольших капелек в объемной масляной фазе, то получаемую в результате композицию называют эмульсией типа «вода-в-масле» (в/м). Альтернативно, если масляная фаза является тонкодисперсной и диспергирована в виде небольших капелек в объемной водной фазе, то получаемую в результате композицию называют эмульсией типа «масло-в-воде» (м/в). Помимо диспергированных фаз, эмульсии могут содержать дополнительные компоненты и активное лекарственное средство, которое может находиться в виде раствора в водной фазе, масляной фазе или в виде отдельной фазы. При необходимости, в эмульсии также могут присутствовать фармацевтические эксципиенты, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты. Фармацевтические эмульсии могут также представлять собой многосоставные эмульсии, состоящие более чем из двух фаз, например, в случае эмульсий типа «масло-в воде-в масле» (м/в/м) и типа «вода-в масле-в воде» (в/м/в). Такие сложные составы часто имеют определенные преимущества, которыми не обладают простые бинарные эмульсии. Мультикомпонентные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии типа м/в заключены в небольшие водные капельки, составляют эмульсию типа в/м/в. Подобным образом, система масляных капелек, включенных в глобулы воды, стабилизированные в масляной непрерывной фазе, составляют эмульсию типа м/в/м.

Эмульсии характеризуются низкой термодинамической стабильностью или ее отсутствием. Часто дисперсная или прерывистая фаза эмульсии хорошо диспергируется во внешней или в непрерывной фазе и поддерживается в этой форме, благодаря эмульгаторам

или вязкости данного состава. Любая из фаз эмульсии может быть полутвердой или твердой, как в случае основ для мазей типа эмульсии и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий заключаются в использовании эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. В широком смысле, эмульгаторы можно разделить на четыре группы: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбционные основы и тонкодисперсные твердые вещества (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как поверхностно-активные агенты, находят широкое применение в формуляции эмульсий, и в литературе имеются соответствующие обзоры (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильности к гидрофобности поверхностно-активного вещества называется гидрофильно-липофильным балансом (HLB) и является ценным инструментом при его отнесении к той или иной группе и при отборе поверхностно-активных веществ для приготовления составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на разные группы на основе природы их гидрофильной группы: неионогенные, анионогенные, катионогенные и амфотерные (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Природными эмульгаторами, используемыми в эмульсионных препаратах, являются ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и аравийская камедь. Абсорбционные основы обладают гидрофильными свойствами, и поэтому они могут впитывать воду и образовывать эмульсии типа в/м, которые еще сохраняют свою полутвердую консистенцию, и такими основами являются безводный ланолин и гидрофильный вазелин. Тонко измельченные твердые вещества также применяли в качестве хороших эмульгаторов, особенно в сочетании с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Указанные вещества включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный силикат магния-алюминия, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как уголь или глицерилтристеарат.

Многочисленные разнообразные неэмульгирующие вещества также включают в эмульсионные препараты, и такие вещества вносят вклад в обеспечение определенных свойств эмульсий. Такими веществами являются жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильными коллоидами или гидроколлоидами являются встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, аравийская камедь, агар, альгиновая кислота, каррагенан, гуаровая камедь, камедь карайи и трагакантовая камедь), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлоза и карбоксипропилцеллюлоза) и синтетические полимеры (например, карбомеры, эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Такие вещества диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсию за счет образования прочных межфазных пленок вокруг капелек дисперсионной фазы и посредством повышения вязкости внешней фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут хорошо поддерживать рост микробов, то часто в такие препараты включают консерванты. Широко используемыми консервантами, включаемыми в эмульсионные препараты, являются метилпарабен, пропилпарабен, четвертичные аммониевые соли, хлорид бензалкония, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борная кислота. В эмульсионные препараты также обычно добавляют антиоксиданты для предотвращения разложения препарата. Используемыми антиоксидантами могут быть акцепторы свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановители, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и антиоксиданты-синергисты, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов чрескожным, пероральным и парентеральным путями и способы их получения описаны в литературе (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для пероральной доставки очень широко применяли за счет простоты их приготовления, а также их эффективности с точки зрения всасывания и биологической доступности (см., например, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel

Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные на основе минерального масла, растворимые в масле витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира относятся к веществам, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий «м/в».

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения иРНК и нуклеиновые кислоты формулируют в виде микроэмульсий. Микроэмульсию можно определить как систему, состоящую из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии представляют собой системы, которые получают сначала диспергированием масла в водном растворе поверхностно-активного вещества с последующим добавлением достаточного количества четвертого компонента, обычно спирта со средней длиной цепи, с образованием прозрачной системы. Поэтому микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные, изотропно чистые дисперсии из двух несмешивающихся жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками, состоящими из поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в «Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems», Rosoff M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, p. 185-215). Микроэмульсии обычно получают объединением от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Насколько микроэмульсия представляет собой микроэмульсию типа «вода-в-масле» (в/м) или «масло-в-воде» (м/в), зависит от свойств масла и используемого поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных «головок» и углеводородных «хвостов» поверхностно-активных молекул (Schott, in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Были проведены всесторонние исследования фазовых диаграмм с использованием феноменологического подхода и были получены исчерпывающие сведения о том, как специалисты в данной области могут приготовить микроэмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G. and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с обычными эмульсиями микроэмульсии обеспечивают преимущество, которое заключается в солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств в препарате, состоящем из термодинамически стабильных капелек, которые образуются спонтанно.

Поверхностно-активные вещества, используемые для получения микроэмульсий, включают без ограничения ионогенные поверхностно-активные вещества, неионогенные

поверхностно-активные вещества, Brij 96, простые олеиловые эфиры полиоксиэтилена, сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот, монолаурат тетраглицерина (ML310), моноолеат тетраглицерина (MO310), моноолеат гексаглицерина (PO310), пентаолеат гексаглицерина (PO500), монокапрат декаглицерина (MCA750), моноолеат декаглицерина (MO750), секвиолеат декаглицерина (SO750), декаолеат декаглицерина (DAO750), одни или в сочетании со вспомогательными поверхностно-активными веществами. Вспомогательное поверхностно-активное вещество, обычно спирт с короткой цепью, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для повышения текучести за счет проникновения в пленку поверхностно-активного вещества с последующим образованием неупорядоченной пленки в результате образования пустого пространства между молекулами поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии можно получить и без использования вспомогательных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы, не содержащие спирта. Водной фазой обычно могут служить без ограничения, вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, ПЭГ300, ПЭГ400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляной фаза может содержать, без ограничения, такие вещества, как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, моно-, ди- и триглицериды со средней длиной цепи (C8-C12), полиоксиэтилированные эфиры глицерина и жирных кислот, жирные спирты, полиглицерольные глицериды, насыщенные полиглицеролизированные C8-C10-глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации и усиления всасывания лекарственных средств. Было высказано предположение, что микроэмульсии на основе липидов (как м/в, так и в/м) повышают биодоступность лекарственных средств, включая пептиды, при пероральном введении (см., например, патенты США № 6191105, 7063860, 7070802, 7157099; публикацию Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Преимущества микроэмульсий заключаются в повышенной солюбилизации лекарственных средств, защите лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможном усилении всасывания лекарственного средства, обусловленном индуцированным поверхностно-активным веществом изменением текучести и проницаемости мембраны, легкости приготовления, легкости перорального введения в виде твердых лекарственных форм, повышенной клинической эффективности и пониженной токсичности (см., например, патенты США № 6191105, 7063860, 7070802, 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться спонтанно при взаимодействии их компонентов при температуре окружающей среды. Это может быть особенно предпочтительным в случае приготовления термолабильных лекарственных средств на основе пептидов или иРНК. Микроэмульсии также являются эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов в случае как косметических, так и фармацевтических применений. Предполагается, что имеющие форму микроэмульсий

композиции и препараты согласно настоящему изобретению будут способствовать повышению уровня системного всасывания иРНК и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также повышению локального захвата иРНК и нуклеиновых кислот клетками.

Микроэмульсии по настоящему изобретению могут также содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как моностеарат сорбитана (Grill 3), лабразол и усилители проницаемости, улучшающие свойства препарата и усиливающие всасывание ИРНК-агентов и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Усилители проницаемости, используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, могут быть классифицированы как вещества, относящиеся к одной из пяти больших групп, а именно поверхностно-активным веществам, жирным кислотам, солям желчных кислот, хелатообразующим агентам и веществам, не являющимся ни хелатообразующими, ни поверхностно-активными веществами (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Каждая из таких групп обсуждалась выше.

Усилители проницаемости

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения используют различные усилители проницаемости в целях обеспечения эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств находится в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно через клеточные мембраны легко проходят только растворимые в липидах или липофильные лекарственные средства. Было обнаружено, что через клеточные мембраны могут проходить даже нелипофильные лекарственные средства, если такая пересекаемая мембрана обработана усилителем проницаемости. Усилители проницаемости, помимо стимуляции диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Усилители проницаемости можно разделить на группы, включающие соединения, относящиеся к одной из пяти больших категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатообразующие агенты и соединения, не образующие хелатные комплексы и не являющиеся поверхностно-активными веществами (см., например, Malmsten M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92). Каждая из вышеуказанных групп усилителей проницаемости более подробно описана ниже.

Поверхностно-активные вещества: в рамках настоящего раскрытия поверхностно-активные вещества (или «поверхностно-активные агенты») представляют собой химические соединения, которые при их растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное поверхностное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается уровень всасывания иРНК через слизистую оболочку. Помимо солей желчных кислот и жирных кислот, такими усилителями проницаемости являются, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-

9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (см., например, Malmsten M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92); и перфторированные эмульсии, такие как FC-43 (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Жирные кислоты: различные жирные кислоты и их производные, которые функционируют в качестве усилителей проницаемости, включают, например, олеиновую кислоту, лауриловую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, 1-монокапрат глицерина, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины или их сложные C1-20 алкиловые эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и моно- и диглицериды (т.е., олеат, лаурат, капрат, миристан, пальмитат, стеарат, линолеат и т.п.) (см., например, Touitou E. et al. Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

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

Хелатообразующие агенты: хелатообразующие агенты, используемые в настоящем изобретении, можно определить как соединения, которые способны удалять ионы металлов из раствора посредством образования комплексов с такими ионами, что приводит к усилению всасывания иРНК через слизистую оболочку. В отношении использования таких агентов в качестве усилителей проницаемости в настоящем изобретении, то такие хелатообразующие агенты имеют дополнительное преимущество, которое состоит в том, что они также служат в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку наиболее известным ДНК-нуклеазам для осуществления катализа необходим ион двухвалентного металла, и, таким образом, они ингибируются хелатообразующими агентами (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатообразующие агенты включают, без ограничения, этилендиаминотетраацетат динатрия (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацильные производные β -дикетонов (енаминов) (см., например, Katdare A. et al., Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

Агенты, отличные от хелатообразующих агентов и поверхностно-активных веществ: в рамках настоящего изобретения, усилители проницаемости, не образующие хелатные комплексы и не являющиеся поверхностно-активными веществами, можно определить как соединения, которые проявляют незначительную активность в качестве хелатообразующих агентов или в качестве поверхностно-активных веществ, но, тем не менее, усиливают всасывание иРНК через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Такая группа усилителей проницаемости включает, например, ненасыщенные циклические мочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканов (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92); и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак-натрий, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

Агенты, которые усиливают поглощение иРНК на клеточном уровне, также могут быть добавлены к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, также известно, что катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al., патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., PCT заявка WO 97/30731), усиливают поглощение дцРНК клетками. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают, например, Липофектамин™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Липофектамин™ 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Липовектамин™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Липофектамин™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA),

RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Швейцария), липосомальный реагент для трансфекции DOTAP (Grenzacherstrasse, Швейцария), липосомальный реагент для трансфекции DOSPER (Grenzacherstrasse, Швейцария) или Eugene (Grenzacherstrasse, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Madison, WI), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Madison, WI), реагент Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), реагент Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, Франция), реагент для трансфекции TransPass® D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invivogen; San Diego, CA, США), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; San Diego, CA, США), реагент для трансфекции BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, США), реагент для трансфекции TrogonPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, США), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, США), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, США) и другие.

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот можно использовать другие агенты, включая гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

Носители

Некоторые композиции по настоящему изобретению также включают в состав соединения-носители. В рамках настоящего изобретения, термин «соединение-носитель» может относиться к нуклеиновой кислоте или ее аналогу, которая является инертной (т. е. не обладает биологической активностью как таковой), но распознается как нуклеиновая кислота процессами *in vivo*, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты, обладающей биологической активностью, например, путем деградации биологически активной нуклеиновой кислоты или содействия ее удалению из циркуляции. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному снижению количества нуклеиновой кислоты, обнаруженной в печени, почках или других внециркуляторных компартментах, предположительно за счет конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общего рецептора. Например, выделение частично фосфоротиоатированной дцРНК в ткани печени может быть снижено при одновременном введении ее с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидовой кислотой или 4-ацетамидо-4'-изотиоциано-стильбен-2,2'-дисульфоновой кислотой (Miyao et al. al., DsRNA Res.Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

Экципиенты

В отличие от соединения-носителя «фармацевтический носитель» или «эксципиент» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или более нуклеиновых кислот в организм животного. Эксципиент может быть жидким или твердым, и он может быть выбран в соответствии с планируемым способом введения, так чтобы при объединении с нуклеиновой кислотой и с другими компонентами данной фармацевтической композиции он обеспечивал желаемый объем, консистенцию и т.д. Типичные фармацевтические носители включают, без ограничения, связывающие вещества (например, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или бифосфат кальция и т.д.); скользящие вещества (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); дезинтегрирующие средства (например, крахмал, гликолят натрия-крахмала и т.д.); и увлажнители (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для непарентерального введения, которые не взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, вызывающими их разрушение, также можно использовать для приготовления композиций по настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и тому подобное.

Составы для местного введения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Такие растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Могут быть также использованы фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают во взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, которые приводят к их разрушению.

Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты включают, без ограничения, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и тому подобное.

Другие компоненты

Композиции по изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях

на уровнях применения, установленных в данной области. Таким образом, композиции могут содержать, например, дополнительные совместимые фармацевтически активные вещества, например, такие как противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, либо они могут содержать дополнительные вещества, применимые при физическом приготовлении различных дозированных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, корригенты, консерванты, антиоксиданты, вещества для придания светопоглощающих свойств, загустители и стабилизаторы. Однако такие вещества при их добавлении не должны оказывать чрезмерного влияния на биологическую активность компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Препараты можно стерилизовать и при необходимости смешивать с вспомогательными средствами, например, скользящими веществами, консервантами, стабилизаторами, увлажнителями, эмульгаторами, солями, влияющими на осмотическое давление, буферами, красителями, корригентами и/или ароматизирующими веществами и тому подобными, которые не вступают во взаимодействие с нуклеиновой кислотой(ами) в препарате, вызывающее из разрушение.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные здесь, включают (a) одну или более иРНК и (b) один или более агентов, которые функционируют по механизму, отличному от РНК-интерференции. Примеры таких агентов включают, не ограничиваясь этим, агенты, которые интерферируют с взаимодействием с МУОС и, по меньшей мере, одним партнером по связыванию с МУОС.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить стандартными фармацевтическими способами с использованием клеточных культур или экспериментальных животных, например, для определения LD50 (дозы, вызывающей гибель 50% популяции) и ED50 (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение дозы, оказывающей токсическое действие, к дозе, оказывающей терапевтическое действие, представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено в виде отношения LD50/ED50. Предпочтительными являются соединения, которые имеют высокие терапевтические индексы.

Данные, полученные в результате анализов на клеточных культурах или в исследованиях на животных, могут быть использованы в целях обоснования доз в определенном диапазоне для применения у человеке. Дозы композиций, охарактеризованных в изобретении, обычно лежат в диапазоне концентраций в кровотоке, который включает значение ED50, с низкой токсичностью или в отсутствие токсичности. Доза может варьировать в таком диапазоне, в зависимости от используемой лекарственной формы и от применяемого способа введения. Для любого соединения, используемого в способах, описанных здесь, терапевтически эффективную дозу сначала можно оценить в анализах на культуре клеток. В случае моделей на животных доза может быть приготовлена

так, чтобы достичь циркулирующего в плазме диапазона концентраций соединения или, в соответствующем случае, полипептидного продукта последовательности-мишени (например, достижение пониженной концентрации полипептида), который включает IC50 (т.е., концентрацию тестируемого соединения, которая приводит к половинному от максимального подавления симптомов), которую определяют на культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения доз для человека. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, как обсуждалось выше, иРНК-агенты, описанные в данном документе, можно вводить в комбинации с другими известными агентами, эффективными в лечении заболеваний и расстройств, ассоциированных с экспрессией МҮОС (например, глаукомы, например, первичной открытоугольной глаукомы (РОАG)). В любом случае лечащий врач может регулировать дозу и временную схему введения иРНК-агента на основе результатов, наблюдаемых с использованием стандартных показателей эффективности, известных в данной области или описанных в настоящем документе.

Способы лечения заболеваний, ассоциированных с экспрессией МҮОС

Настоящее изобретение относится к применению иРНК, нацеленной на МҮОС, для ингибирования экспрессии МҮОС и/или для лечения заболевания, расстройства или патологического процесса, ассоциированного с экспрессией МҮОС (например, глаукомы, например, первичной открытоугольной глаукомы (РОАG)).

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, ассоциированного с экспрессией МҮОС, включающему введение иРНК (например, дцРНК), раскрытой в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления иРНК ингибирует (снижает) экспрессию МҮОС.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой животное, которое служит моделью заболевания, ассоциированного с экспрессией МҮОС, например, глаукомы, например, первичной открытоугольной глаукомы (РОАG).

Глаукома

В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с экспрессией МҮОС, представляет собой глаукому. Неограничивающий пример глаукомы, поддающейся лечению с использованием способа, описанного здесь, включает первичную открытоугольную глаукому (РОАG).

Клинические и патологические признаки глаукомы включают, не ограничиваясь этим, потерю зрения, снижение остроты зрения (например, ореолы вокруг источников света и нечеткость) и снижение вытекания водянистой влаги из глаза.

В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта с глаукомой моложе 18 лет. В некоторых вариантах осуществления субъект с глаукомой является взрослым человеком. В некоторых вариантах осуществления возраст субъекта с глаукомой старше 60 лет. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или идентифицирован как имеющий повышенные уровни мРНК или белка МҮОС по сравнению с референтным уровнем

(например, уровень МҮОС выше референтного уровня).

В некоторых вариантах осуществления глаукому диагностируют с использованием анализа образца, отобранного у субъекта (например, образца глазной жидкости). В некоторых вариантах осуществления образец анализируют с использованием метода, выбранного из одного или более из: флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), иммуногистохимии, иммуноанализа МҮОС, электронной микроскопии, лазерной захватывающей микродиссекции и масс-спектрометрии. В некоторых вариантах осуществления глаукому диагностируют с использованием любого подходящего диагностического теста или метода, например, аппланационной тонометрии Гольдмана, измерения центральной толщины роговицы (ССТ), автоматической пороговой статической периметрии (например, с использованием анализатора поля Хамфри), метода Ван Херика, гониоскопии, ультразвуковой биомикроскопии и оптической когерентной томографии переднего сегмента (AS-ОСТ), ангиографии (например, флуоресцентной ангиографии или ангиографии с индоцианином зеленым), электроретинографии, ультрасонографии, пахиметрии, оптической когерентной томографии (ОСТ), компьютерной томографии (СТ) и магнитно-резонансной томографии (MRI), тонометрии, тестирования цветового зрения, тестирования поля зрения, обследования с использованием щелевой лампы, офтальмоскопии и физикального обследования (например, для оценки остроты зрения (например, с исследованием глазного дна или оптической когерентной томографии (ОСТ)).

Комбинированная терапия

В некоторых вариантах осуществления иРНК (например, дцРНК), раскрытая в настоящем документе, вводят в комбинации со второй терапией (например, одной или более дополнительными терапиями), о которой известно, что она эффективна при лечении заболевания, ассоциированного с экспрессией МҮОС (глаукома, например, первичная открытоуголовая глаукома (РОАГ)) или симптом такого заболевания. иРНК можно вводить до, после или одновременно со второй терапией. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят перед второй терапией. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят после второй терапии. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят одновременно со второй терапией.

Второй терапией может быть дополнительный терапевтический агент. иРНК и дополнительное терапевтическое средство можно вводить в комбинации в одной композиции, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой терапевтический агент, отличный от иРНК, который эффективен для лечения расстройства или симптомов расстройства.

В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят в сочетании с терапией.

Типичные комбинированные методы лечения включают, не ограничиваясь этим, хирургическую лазерную трабекулопластику, хирургическую трабекулэктомию, малоинвазивную хирургию глаукомы, размещение дренажной трубки в глазу,

лекарственные препараты для перорального введения или глазные капли.

Дозы, пути и временная схема для введения

Субъекту (например, человеку, например, пациенту) можно вводить терапевтическое количество иРНК. Терапевтическое количество может составлять, например, 0,05-50 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иРНК формулирована для доставки в орган-мишень, например, в глаз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иРНК формулирована в виде липидного состава, например, в виде состава LNP, описанного здесь. В некоторых таких вариантах осуществления терапевтическое количество составляет 0,05-5 мг/кг дцРНК. В некоторых вариантах осуществления липидный состав, например состав LNP, вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления иРНК находится в форме GalNAc-конъюгата, например, описанного здесь. В некоторых таких вариантах осуществления терапевтическое количество составляет 0,5-50 мг дцРНК. В некоторых вариантах осуществления, например, GalNAc-конъюгат вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления введение повторяют, например, на регулярной основе, например, раз в сутки, раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, шести месяцев или дольше. После начальной схемы лечения терапию можно проводить реже. Например, после введения раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц, в течение шести месяцев или года, или дольше. В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент вводят в двух или более дозах. В некоторых вариантах осуществления число или количество последующих доз зависит от достижения желаемого эффекта, например, для (а) ингибирования или снижения экспрессии или активности MYOC; (b) снижения уровня неправильно свернутого белка MYOC; (с) снижения гибели клеток трабекулярной сети; (d) снижения внутриглазного давления; или (е) повышения остроты зрения, или достижения терапевтического или профилактического эффекта, например, уменьшение или предотвращение одного или более симптомов, ассоциированных с расстройством.

В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент вводят по схеме. Например, иРНК-агент можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления схема включает введение через равные интервалы времени, например, ежедневно, каждые четыре часа, каждые шесть часов, каждые восемь часов, каждые двенадцать часов, ежедневно, каждые 2 суток, каждые 3 суток, каждые 4 суток, каждые 5 суток, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц. В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент вводят с частотой, необходимой для достижения желаемого эффекта.

В некоторых вариантах осуществления схема включает введение через короткие интервалы времени, за которыми следует более длительный период времени, в течение

которого агент не вводится. Например, схема может включать начальный ряд доз, которые вводятся в течение относительно короткого периода времени (например, примерно каждые 6 ч, примерно каждые 12 ч, примерно каждые 24 ч, примерно каждые 48 ч или примерно каждые 72 ч)) с последующим более длительным периодом времени (например, примерно 1 неделя, примерно 2 недели, примерно 3 недели, примерно 4 недели, примерно 5 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель или примерно 8 недель), в течение которого иРНК-агент не вводится. В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент первоначально вводят еже часно, и затем вводят с более длительными интервалами (например, ежедневно, еженедельно, раз в две недели или ежемесячно). В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент первоначально вводят ежедневно, и затем вводят с более длительным интервалом (например, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц). В некоторых вариантах осуществления более длительный интервал увеличивают со временем, или его определяют на основе достижения желаемого эффекта.

Перед введением полной дозы иРНК пациентам можно вводить меньшую дозу, такую как 5% инфузионная доза, и контролировать побочные эффекты, такие как аллергическая реакция, или повышенный уровень липидов или кровяное давление. В другом примере за пациентом можно следить на предмет развития нежелательных эффектов.

Способы модуляции экспрессии МҮОС

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу модуляции (например, ингибирования или активации) экспрессии МҮОС, например, в клетке, ткани или в организме субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань находятся *ex vivo*, *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань находится в глазу (например, ткань трабекулярной сети, цилиарное тело, пигментный эпителий сетчатки (RPE), ткань сетчатки, астроцит, перицит, клетка Мюллера, ганглионарная клетка, эндотелиальная клетка, фоторецепторная клетка, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов) или ткань сосудистой оболочки глаза, например сосуд сосудистой оболочки). В некоторых вариантах осуществления клетка или ткань находятся в организме субъекта (например, млекопитающего, например, такого как человек). В некоторых вариантах осуществления субъект (например, человек) находится в группе риска или у него диагностировано заболевание, ассоциированное с экспрессией МҮОС, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение в контакт клетки с иРНК, описанной в настоящем документе, в количестве, эффективном для снижения экспрессии МҮОС в клетке. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт клетки с РНКи-агентом включает контактирование клетки *in vitro* с РНКи-агентом или контактирование клетки *in vivo* с РНКи-агентом. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент приводится в физический контакт с клеткой субъекта, выполняя способ, или иРНК-агент может быть помещен в ситуацию, которая позволит или

вызовет его последующий контакт с клеткой. Контакт с клеткой *in vitro* может быть осуществлен, например, инкубацией клетки с иРНК-агентом. Приведение в контакт с клеткой *in vivo* можно осуществить, например, путем инъекции РНКи-агента в ткань или рядом с ней, где расположена клетка, или инъекцией РНКи-агента в другую область, например, в ткань глаза. Например, РНКи-агент может содержать или быть связанным с лигандом, например, липофильной группой или группами, как описано ниже и дополнительно подробно описано, например, в документе РСТ/US2019/031170, который в полном объеме включен в настоящий документ посредством ссылки, включая разделы, в которых описываются липофильные группы, которые направляют или иным образом стабилизируют РНКи-агент в представляющем интерес месте. Также возможны комбинации методов контактирования *in vitro* и *in vivo*. Например, клетка также может быть приведена в контакт с РНКи-агентом *in vitro* и затем трансплантирована субъекту.

Экспрессию МҮОС можно оценить на основе уровня экспрессии мРНК МҮОС, белка МҮОС или уровня другого параметра, функционально связанного с уровнем экспрессии МҮОС. В некоторых вариантах осуществления экспрессия МҮОС ингибируется, по меньшей мере, на 5%, по меньшей мере, на 10%, по меньшей мере, на 15%, по меньшей мере, на 20%, по меньшей мере, на 25%, по меньшей мере, на 30%, по меньшей мере, на 35%, по меньшей мере, на 40%, по меньшей мере, на 45%, по меньшей мере, на 50%, по меньшей мере, на 55%, по меньшей мере, на 60%, по меньшей мере, на 65%, по меньшей мере, на 70%, по меньшей мере, на 75%, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или по меньшей мере, на 95%. В некоторых вариантах осуществления иРНК имеет IC_{50} в диапазоне 0,001-0,01 нМ, 0,001-0,10 нМ, 0,001-1,0 нМ, 0,001-10 нМ, 0,01-0,05 нМ, 0,01-0,50 нМ, 0,02-0,60 нМ, 0,01-1,0 нМ, 0,01-1,5 нМ, 0,01-10 нМ. Значение IC_{50} может быть нормализовано относительно соответствующего контрольного значения, например, IC_{50} нецелевой иРНК.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение в клетку или ткань иРНК, описанной в настоящем документе, и поддержание клетки или ткани в течение времени, достаточного для деградации мРНК-транскрипта МҮОС, тем самым ингибируя экспрессию МҮОС в клетке или ткани.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение млекопитающему композиции, описанной в настоящем документе, например, композиции, содержащей иРНК, которая связывается с МҮОС, так что экспрессия МҮОС-мишени снижается, например, в течение длительного периода времени, например, по меньшей мере, двух, трех, четырех суток или более, например, одной недели, двух недель, трех недель или четырех недель или более. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии МҮОС можно обнаружить в течение 1 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 12 ч или 24 ч после первого введения.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, описанной в настоящем документе, млекопитающему таким образом, что экспрессия целевого МҮОС повышается, например, по меньшей мере, на 10% по сравнению с необработанным животным. В некоторых вариантах осуществления активация МҮОС

имеет место в течение длительного времени, например, по меньшей мере двух, трех, четырех суток или более, например, одной недели, двух недель, трех недель, четырех недель или более. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, иРНК может активировать экспрессию МҮОС путем стабилизации мРНК-транскрипта МҮОС, взаимодействия с промотором в геноме или ингибирования ингибитора экспрессии МҮОС.

иРНК, пригодные для способов и композиций, заявленных в описании, нацелены конкретно на РНК (первичные или процессированные) МҮОС. Композиции и способы ингибирования экспрессии МҮОС с использованием иРНК могут быть приготовлены и осуществлены, как описано в других местах настоящего документа.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, комплементарную, по меньшей мере, участку РНК-транскрипта МҮОС субъекта, например, млекопитающего, например, человека, которого лечат. Композицию можно вводить любым подходящим способом, известным в данной области, включая, не ограничиваясь этим, окулярное (например, интраокулярное), местное и внутривенное введение.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят интраокулярно (например, интравитреальным введением, например, интравитреальной инъекцией; трансклеральным введением, например, трансклеральной инъекцией; субконъюнктивальным введением, например, субконъюнктивальной инъекцией; ретробульбарным введением, например, ретробульбарной инъекцией; внутрикамерным введением, например, внутрикамерной инъекцией или субретинальным введением, например, субретинальной инъекцией). В еще одних вариантах осуществления композицию вводят местно. В еще одних вариантах осуществления композицию вводят внутривенной инфузией или инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят внутривенной инфузией или инъекцией. В некоторых таких вариантах осуществления композиция содержит липидную форму миРНК (например, состав LNP, такой как состав LNP11) для внутривенной инфузии.

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут использоваться на практике или при тестировании иРНК-агентов и способов, заявленных в описании, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указанные здесь, в полном объеме включены здесь посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения.

Конкретные варианты осуществления

1. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии миоцилина (MYOC), где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь включает нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка кодирующей цепи MYOC человека, и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка некодирующей цепи MYOC человека, так что смысловая цепь является комплементарной, по меньшей мере, 15 последовательным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

2. дцРНК-агент по варианту осуществления 1, где кодирующая цепь MYOC человека содержит последовательность SEQ ID NO: 1.

3. дцРНК-агент по вариантам осуществления 1 или 2, где некодирующая цепь MYOC человека содержит последовательность SEQ ID NO: 2.

4. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии MYOC, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь является комплементарной по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

5. дцРНК-агент по варианту осуществления 4, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, или 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

6. дцРНК по любому из предшествующих вариантов осуществления, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь является комплементарной, по меньшей мере, 17 последовательным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

7. дцРНК по варианту осуществления 6, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов с 0, или 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

8. дцРНК по любому из предшествующих вариантов осуществления, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так что смысловая цепь является комплементарной, по меньшей мере, 19

последовательным нуклеотидам в антисмысловой цепи.

9. дцРНК по варианту осуществления 8, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

10. дцРНК по любому из предшествующих вариантов осуществления, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2, так, что смысловая цепь является комплементарной, по меньшей мере, 21 последовательному нуклеотиду в антисмысловой цепи.

11. дцРНК по варианту осуществления 10, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид с 0, или 1, 2 или 3 несовпадениями, соответствующего участка нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1.

12. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где участок смысловой цепи представляет собой участок смысловой цепи, представленной в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B.

13. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где участок антисмысловой цепи представляет собой участок антисмысловой цепи, представленной в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B.

14. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B.

15. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B, которая соответствует антисмысловой последовательности.

16. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B.

17. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2A, 2B, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A и 5B,

которая соответствует антисмысловой последовательности.

18. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В.

19. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В, которая соответствует антисмысловой последовательности.

20. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В.

21. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В, которая соответствует антисмысловой последовательности.

22. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где смысловая цепь имеет длину, по меньшей мере, 23 нуклеотида, например, 23-30 нуклеотидов в длину.

23. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где, по меньшей мере, одна из смысловой цепи и антисмысловой цепи конъюгирована с одной или более липофильными группами.

24. дцРНК-агент по варианту осуществления 23, где липофильная группа конъюгирована с одним или более положениями в двухцепочечной области дцРНК-агента.

25. дцРНК-агент по вариантам осуществления 23 или 24, где липофильная группа конъюгирована через линкер или носитель.

26. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-25, где липофильность липофильной группы, измеренная по значению $\log K_{ow}$, превышает 0.

27. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где гидрофобность двухцепочечного РНКи-агента, измеренная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы двухцепочечного РНКи-агента, превышает 0,2.

28. дцРНК-агент по варианту осуществления 27, где анализ связывания с белками плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием сывороточного белка альбумина человека.

29. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где

дцРНК-агент содержит, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид.

30. дцРНК-агент по варианту осуществления 29, где не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

31. дцРНК-агент по варианту осуществления, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

32. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 29-31, где, по меньшей мере, один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого нуклеотида дезокситимидина(dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, закрытого нуклеотида, незакрытого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2-О-(N-метилацетамидо)-модифицированного нуклеотида и их комбинаций.

33. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 29-31, где не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи включают модификации, отличные от 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, незакрытых нуклеиновых кислот (UNA) или гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA).

34. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, который содержит ненуклеотидный спейсер (где ненуклеотидный спейсер необязательно содержит С3-С6 алкил) между двумя смежными нуклеотидами смысловой цепи или между двумя последовательными нуклеотидами антисмысловой цепи.

35. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где длина каждой цепи не превышает 30 нуклеотидов.

36. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 1 нуклеотида.

37. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов.

38. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где длина двухцепочечной области составляет 15-30 пар нуклеотидов.

39. дцРНК-агент по варианту осуществления 25, где длина двухцепочечной области

составляет 17-23 пары нуклеотидов.

40. дцРНК-агент по варианту осуществления 25, где длина двухцепочечной области составляет 17-25 пар нуклеотидов.

41. дцРНК-агент по варианту осуществления 25, где длина двухцепочечной области составляет 23-27 пар нуклеотидов.

42. дцРНК-агент по варианту осуществления 25, где длина двухцепочечной области составляет 19-21 пару нуклеотидов.

43. дцРНК-агент по варианту осуществления 25, где длина двухцепочечной области составляет 21-23 пары нуклеотидов.

44. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где каждая цепь имеет 19-30 нуклеотидов.

45. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где каждая цепь имеет 19-23 нуклеотида.

46. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где каждая цепь имеет 21-23 нуклеотида.

47. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где агент содержит, по меньшей мере, одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

48. дцРНК-агент по варианту осуществления 47, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

49. дцРНК-агент по варианту осуществления 48, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

50. дцРНК-агент по варианту осуществления 48, где цепь представляет собой смысловую цепь.

51. дцРНК-агент по варианту осуществления 47, где фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи.

52. дцРНК-агент по варианту осуществления 51, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

53. дцРНК-агент по варианту осуществления 51, где цепь представляет собой смысловую цепь.

54. дцРНК-агент по варианту осуществления 47, где каждый из 5'- и 3'-концов одной цепи содержит фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

55. дцРНК-агент по варианту осуществления 54, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

56. дцРНК-агент по любому из предшествующих вариантов осуществления, где пара оснований в положении 1 от 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

57. дцРНК-агент по варианту осуществления 54, где смысловая цепь имеет в целом 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь имеет в целом 23 нуклеотида.

58. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-57, где одна или более

липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, по меньшей мере, в одной цепи.

59. дцРНК-агент по варианту осуществления 58, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, по меньшей мере, в одной цепи через линкер или носитель.

60. дцРНК-агент по варианту осуществления 59, где внутренние положения включают все положения, кроме двух концевых положений от каждого конца, по меньшей мере, одной цепи.

61. дцРНК-агент по варианту осуществления 59, где внутренние положения включают все положения, кроме трех концевых положений от каждого конца, по меньшей мере, одной цепи.

62. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 59-61, где внутренние положения исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

63. дцРНК-агент по варианту осуществления 62, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 9-12, где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи.

64. дцРНК-агент по варианту осуществления 62, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 11-13, где нумерация начинается от 3'-конца смысловой цепи.

65. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 59-61, где внутренние положения исключают область сайта расщепления антисмысловой цепи.

66. дцРНК-агент по варианту осуществления 65, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 12-14, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи.

67. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 59-61, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 11-13 в смысловой цепи, где нумерация начинается от 3'-конца, и положений 12-14 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца.

68. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-67, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 в смысловой цепи, и положения 6-10 и 15-18 в антисмысловой нити, где нумерация начинается от 5'-конца каждой цепи.

69. дцРНК-агент по варианту осуществления 68, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 в смысловой цепи, и положений 15 и 17 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца каждой цепи.

70. дцРНК-агент по варианту осуществления 24, где положения в двухцепочечной области исключают область сайта расщепления смысловой цепи.

71. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-70, где смысловая цепь

имеет длину 21 нуклеотид, антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, и липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи.

72. дцРНК-агент по варианту осуществления 71, где липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи.

73. дцРНК-агент по варианту осуществления 71, где липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

74. дцРНК-агент по варианту осуществления 71, где липофильная группа конъюгирована с положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

75. дцРНК-агент по варианту осуществления 71, где липофильная группа конъюгирована с положением 16 антисмысловой цепи.

76. дцРНК-агент по варианту осуществления 71, где липофильная группа конъюгирована с положением 6, где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи.

77. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-76, где липофильная группа представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

78. дцРНК-агент по варианту осуществления 77, где липофильная группа выбрана из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, 1-пиренмасляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексанола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О-3-(олеоил)литохолевой кислоты, О-3-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

79. дцРНК-агент по варианту осуществления 78, где липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

80. дцРНК-агент по варианту осуществления 79, где липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь.

81. дцРНК-агент по варианту осуществления 79, где липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

82. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-81, где липофильная группа конъюгирована через носитель, который замещает один или более нуклеотидов во внутреннем положении(ях) или двухцепочечной области.

83. дцРНК-агент по варианту осуществления 82, где носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила,

изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклическую группу, основанную на остове серинола или остове диэтаноламина.

84. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-81, где липофильная группа конъюгирована с двухцепочечным ИРНК-агентом через линкер, содержащий эфирную, тиоэфирную, карбамидную, карбонатную связь, аминосвязь, амидную, малеимидтиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

85. Двухцепочечный иРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-84, где липофильная группа конъюгирована с азотистым основанием, группой сахара или межнуклеозидной связью.

86. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-85, где липофильная группа или нацеливающий лиганд конъюгированы через биорасщепляемый линкер, выбранный из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинации.

87. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 23-86, где 3'-конец смысловой цепи защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, где указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

88. дцРНК-агент по любому из пп.23-87, дополнительно содержащий нацеливающий лиганд, который нацелен на ткань глаза или ткань печени.

89. дцРНК-агент по варианту осуществления 88, где лиганд конъюгирован со смысловой цепью.

90. дцРНК-агент по вариантам осуществления 88 или 89, где лиганд конъюгирован с 3'-концом или 5'-концом смысловой цепи.

91. дцРНК-агент по вариантам осуществления 88 или 89, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи.

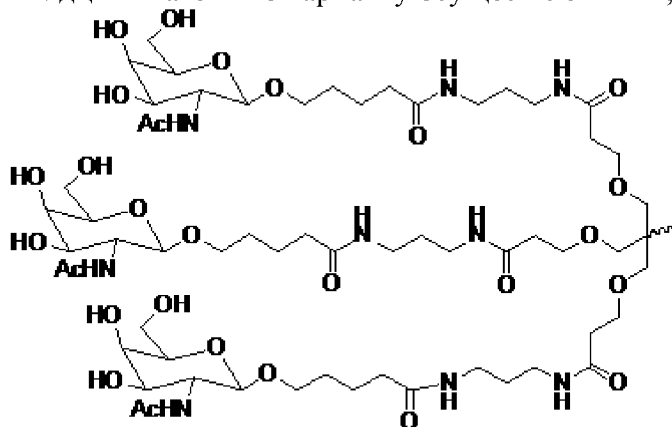
92. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 88-91, где ткань глаза представляет собой ткань трабекулярной сети, цилиарное тело, ткань сетчатки, пигментный эпителий сетчатки (RPE) или ткань сосудистой оболочки глаза, например сосуд сосудистой оболочки.

93. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 88-91, где нацеливающий лиганд содержит N-ацетилгалактозамин (GalNAc).

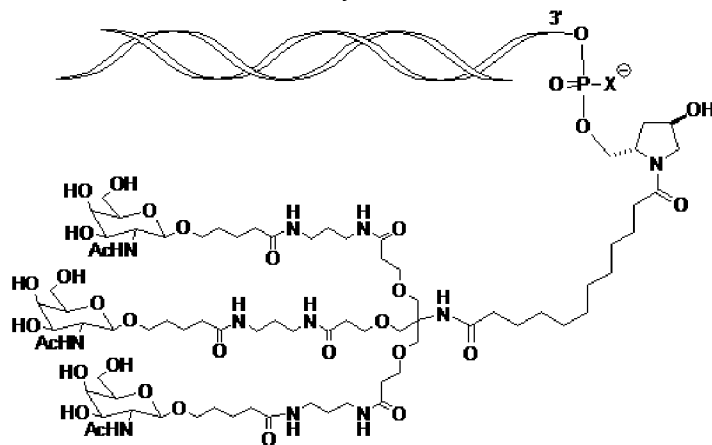
94. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 88-91, где нацеливающий лиганд представляет собой один или более конъюгатов GalNAc или одно или более производных GalNAc.

95. дцРНК-агент по варианту осуществления 94, где один или более конъюгатов GalNAc или одно или более производных GalNAc присоединены через одновалентный линкер или двухвалентный, трехвалентный или четырехвалентный разветвленный линкер.

96. дцРНК-агент по варианту осуществления 94, где лиганд представляет собой:



97. дцРНК-агент по варианту осуществления 96, где дцРНК-агент конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме.



где X представляет собой O или S.

98. дцРНК-агент по варианту осуществления 97, где X представляет собой O.

99. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-98, дополнительно содержащий концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

100. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-98, дополнительно содержащий концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом

фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

101. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-98, дополнительно содержащий концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой, второй и третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

102. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-98, дополнительно содержащий концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в третьих межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

103. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-98, дополнительно содержащий концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

104. дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-103, дополнительно содержащий фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи.

105. дцРНК-агент по варианту осуществления 104, где миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

106. Клетка, содержащая дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-105.

107. Клетка глаза человека, например (клетка трабекулярной сети, клетка цилиарного тела, клетка RPE, астроцит, перицит, клетка Мюллера, ганглионарная клетка, эндотелиальная клетка или фоторецепторная клетка), включающая пониженный уровень мРНК МҮОС или уровень белка МҮОС по сравнению с аналогичной необработанной клеткой, где необязательно уровень снижен, по меньшей мере, на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

108. Клетка человека по варианту осуществления 107, полученная способом, включающим приведение в контакт клетки человека с дцРНК-агентом по любому из вариантов осуществления 1-94.

109. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего МҮОС, содержащая дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-105.

110. Фармацевтическая композиция, содержащая дцРНК-агент по любому из вариантов осуществления 1-105 и липидный состав.

111. Способ ингибирования экспрессии МҮОС в клетке, включающий:

(а) приведение в контакт клетки с дцРНК-агентом по любому из вариантов осуществления 1-105 или с фармацевтической композицией по вариантам осуществления 109 или 110; и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для деградации мРНК-транскрипта МҮОС, тем самым ингибируя экспрессию МҮОС в клетке.

112. Способ ингибирования экспрессии МҮОС в клетке, включающий:

(а) приведение в контакт клетки с дцРНК-агентом по любому из вариантов осуществления 1-105 или с фармацевтической композицией по варианту осуществления 109 или 110; и

(b) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК МҮОС, белка МҮОС или как мРНК, так и белка МҮОС, тем самым ингибируя экспрессию МҮОС в клетке.

113. Способ по вариантам осуществления 111 или 112, где клетка находится в организме субъекта.

114. Способ по варианту осуществления 113, где субъектом является человек.

115. Способ по любому из вариантов осуществления 111-114, где уровень мРНК МҮОС ингибируется, по меньшей мере, на 50%.

116. Способ по любому из вариантов осуществления 111-114, где уровень белка

MYOC ингибируется, по меньшей мере, на 50%.

117. Способ по вариантам осуществления 114-116, где ингибирование экспрессии гена MYOC снижает уровень белка MYOC в биологическом образце (например, образце глазной жидкости) субъекта, по меньшей мере, на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

118. Способ по любому из предшествующих вариантов осуществления 114-117, где у субъекта диагностировано заболевание, ассоциированное с MYOC, например, глаукома, например, первичная открытоугольная глаукома (POAG).

119. Способ ингибирования экспрессии MYOC в клетке или ткани глаза, включающий:

(a) приведение в контакт клетки или ткани с дцРНК-агентом, который связывается с MYOC; и

(b) поддержание клетки или ткани, полученной на стадии (a), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК MYOC, белка MYOC или как мРНК, так и белка MYOC, тем самым ингибируя экспрессию MYOC в клетке или ткани.

120. Способ по варианту осуществления 119, где клетка или ткань глаза содержит ткань трабекулярной сети, цилиарное тело, клетку RPE, ткань сетчатки, астроцит, перицит, клетку Мюллера, ганглионарную клетку, эндотелиальную клетку, фоторецепторную клетку, кровеносный сосуд сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов) или ткань сосудистой оболочки глаза, например сосуд сосудистой оболочки.

120a. Способ снижения внутриглазного давления у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента по любому из вариантов осуществления 1-105 или фармацевтической композиции по вариантам осуществления 109 или 110, тем самым снижая внутриглазное давление у субъекта.

120b. Способ ограничения повышения внутриглазного давления или поддержания постоянного внутриглазного давления у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента по любому из вариантов осуществления 1-105 или фармацевтической композиции по вариантам осуществления 109 или 110, тем самым ограничивая повышение внутриглазного давления или поддерживая постоянное внутриглазное давление у субъекта.

121. Способ лечения субъекта, имеющего или у которого диагностировано заболевание, ассоциированное с MYOC, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента по любому из вариантов осуществления 1-105 или фармацевтической композиции по вариантам осуществления 109 или 110, тем самым обеспечивая лечение заболевания.

122. Способ по вариантам осуществления 118 или 121, где заболевание, ассоциированное с MYOC, представляет собой глаукому.

122a. Способ лечения субъекта, имеющего глаукому, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента по вариантам

осуществления 1-105 или фармацевтической композиции по вариантам осуществления 109 или 110, тем самым обеспечивая лечение глаукомы.

123. Способ по вариантам осуществления 122 или 122а, где глаукома выбрана из группы, состоящей из первичной открытоугольной глаукомы (POAG).

124. Способ по любому из вариантов осуществления 121-123, где лечение включает ослабление, по меньшей мере, одного признака или симптома заболевания.

125. Способ по варианту осуществления 124, где, по меньшей мере, один признак или симптом глаукомы включает показатель одного или более из повреждения зрительного нерва, потери зрения, туннельного зрения, нечеткости зрения, боли в глазах или наличия, уровня или активности MYOC (например, гена MYOC, мРНК MYOC или белка MYOC).

126. Способ по любому из вариантов осуществления 121-123, где лечение включает предупреждение прогрессирования заболевания.

127. Способ по любому из вариантов осуществления 124-126, где лечение включает одно или более из: (а) ингибирования или снижения экспрессии или активности MYOC; (b) снижения уровня неправильно свернутого белка MYOC; (с) уменьшения гибели клеток трабекулярной сети; (d) снижения внутриглазного давления; или (е) повышения остроты зрения.

128. Способ по варианту осуществления 127, где лечение приводит к среднему снижению, по меньшей мере, на 30% по сравнению с исходным уровнем мРНК MYOC в ткани трабекулярной сети, цилиарном теле, сетчатке, RPE, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов) или ткани сосудистой оболочки глаза, например, сосуде сосудистой оболочки.

129. Способ по варианту осуществления 128, где лечение приводит к среднему снижению мРНК MYOC, по меньшей мере, на 60% по сравнению с исходным уровнем в ткани трабекулярной сети, цилиарном теле, сетчатке, RPE, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов) или ткани сосудистой оболочки глаза, например, сосуда сосудистой оболочки.

130. Способ по варианту осуществления 129, где лечение приводит к среднему снижению мРНК MYOC, по меньшей мере, на 90% по сравнению с исходным уровнем в ткани трабекулярной сети, цилиарном теле, сетчатке, RPE, кровеносном сосуде сетчатки (например, включая эндотелиальные клетки и клетки гладкой мускулатуры сосудов) или ткани сосудистой оболочки глаза, например, сосуда сосудистой оболочки.

131. Способ по любому из вариантов осуществления 124-129, где после лечения у субъекта имеет место нокдаун продолжительностью, по меньшей мере, 8 недель после однократной дозы дцРНК, оцениваемый по белку MYOC в сетчатке.

132. Способ по варианту осуществления 131, где после лечения у субъекта имеет место нокдаун продолжительностью, по меньшей мере, 12 недель после однократной дозы дцРНК, оцениваемый по белку MYOC в сетчатке.

133. Способ по варианту осуществления 132, где после лечения у субъекта имеет место нокдаун продолжительностью, по меньшей мере, 16 недель после однократной дозы

дцРНК, оцениваемый по белку МҮОС в сетчатке.

134. Способ по любому из вариантов осуществления 113-133, где субъектом является человек.

135. Способ по любому из вариантов осуществления 114-134, где дцРНК-агент вводят в дозе примерно от 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

136. Способ по любому из вариантов осуществления 114-135, где дцРНК-агент вводят субъекту интраокулярно, внутривенно или местно.

137. Способ по варианту осуществления 136, где интраокулярное введение включает интравитреальное введение (например, интравитреальную инъекцию), трансклеральное введение (например, трансклеральную инъекцию), субконъюнктивальное введение (например, субконъюнктивальную инъекцию), ретробульбарное введение (например, ретробульбарную инъекцию), внутрикамерное введение (например, внутрикамерную инъекцию) или субретинальное введение (например, субретинальную инъекцию).

138. Способ по любому из вариантов осуществления 114-137, дополнительно включающий измерение уровня МҮОС (например, гена МҮОС, мРНК МҮОС или белка МҮОС) у субъекта.

139. Способ по варианту осуществления 138, где измерение уровня МҮОС у субъекта включает измерение уровня гена МҮОС, белка МҮОС или мРНК МҮОС в биологическом образце субъекта (например, образце глазной жидкости).

140. Способ по любому из вариантов осуществления 114-139, дополнительно включающий выполнение анализа крови, визуализирующего теста или биопсии внутриглазной жидкости.

141. Способ по любому из вариантов осуществления 138-140, где измерение уровня МҮОС (например, гена МҮОС, мРНК МҮОС или белка МҮОС) у субъекта проводят до лечения дцРНК-агентом или фармацевтической композицией.

142. Способ по варианту осуществления 141, где при определении того, что субъект имеет уровень МҮОС (например, гена МҮОС, мРНК МҮОС или белка МҮОС), превышающий референтный уровень, субъекту вводят дцРНК-агент или фармацевтическую композицию.

143. Способ по любому из вариантов осуществления 139-142, где измерение уровня МҮОС (например, гена МҮОС, мРНК МҮОС или белка МҮОС) у субъекта проводят после лечения дцРНК-агентом или фармацевтической композицией.

144. Способ по любому из вариантов осуществления 121-143, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного агента и/или проведение дополнительной терапии, подходящей для лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с МҮОС.

145. Способ по варианту осуществления 144, где дополнительное средство и/или терапия включает одно или более из фотодинамической терапии, фотокоагуляционной терапии, стероида, нестероидного противовоспалительного средства, средства против МҮОС и/или витрэктомии.

Примеры

Пример 1. миРНК МУОС

Последовательности нуклеиновой кислоты, обеспеченные здесь, представлены с использованием стандартной номенклатуры. См. сокращенные обозначения в Таблице 1.

Следует понимать, что эти мономеры, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями.

Таблица 1

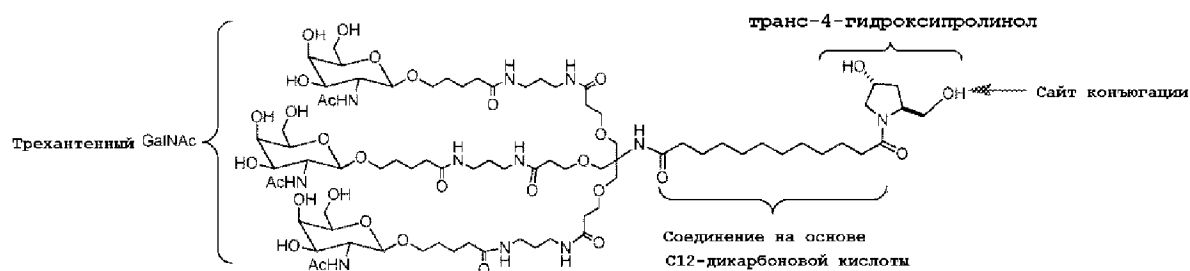
Сокращенные обозначения мономеров нуклеотидов, использованных в представлении последовательностей нуклеиновой кислоты

Сокращенное обозначение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3'-фосфоротиоат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат
(Ahd)	(Ahd) 2'-О-гексадецил-аденозин-3'-фосфат
(Ahds)	(Ahds) 2'-О-гексадецил-аденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфотиоат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфоротиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
(Ghd)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфат
(Ghds)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфоротиоат

T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tb	бета-L-тимидин-3'-фосфат
Tbs	бета-L-тимидин-3'-фосфотиоат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
Tgn	S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
Agn	S-изомер аденозингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
Cgn	цитидингликолевая нуклеиновая кислота (GNA) S-изомер
Ggn	S-изомер гуанозингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA)
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	уридин-3'-фосфат
Ub	бета-L-уридин-3'-фосфат
Ubs	бета-L-уридин-3'-фосфотиоат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
VP	винилфосфонат
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
dA	2'-дезоксияденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксияденозин-3'-фосфотиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфотиоат

dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфотиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-дезоксиуридин
s	тиофосфатная связь
L96 ¹	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканоил]-4-гидроксипролинол Нур-(GalNAc-алкил) ₃
(Aeo)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат
(Aeos)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфотиоат
(Geo)	2'-O-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-O-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Teo)	2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
(m5Ceo)	2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-O-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат

¹Химическая структура L96 является следующей:



Экспериментальные методы

Биоинформатика

Транскрипты

Были созданы четыре ряда мРНК, нацеленных на MYOC человека, «миоцилин» (человек: NCBI refseqID NM_000261.2; NCBI GeneID: 4653). Человеческая мРНК NM_000261.2 REFSEQ имеет длину 2100 оснований. Пары олигонуклеотидов были генерированы с использованием биоинформационных методов и ранжированы, и иллюстративные пары олигонуклеотидов показаны в Таблице 2А, Таблице 2В, Таблице 3А, Таблице 3В, Таблице 4А, Таблице 4В, Таблице 5А и Таблице 5В. Модифицированные последовательности представлены в Таблице 2А, Таблице 3А, Таблице 4А и Таблице 5А. Немодифицированные последовательности представлены в Таблице 2В, Таблице 3В, Таблице 4В и Таблице 5В.

Таблица 2А

Иллюстративные модифицированные последовательности одиночных цепей и дуплексов миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	Название последовательности смысловой цепи	SEQ ID NO: (смысловая цепь)	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	Название антисмыслового олигонуклеотида	SEQ ID NO: (антисмысловая цепь)	Последовательность антисмысловой цепи	Последовательность мРНК-мишени	SEQ ID NO:
AD-886932	A-1683138.1	2749	CAGUCCCA AUGAAUCC AGCdTdT	A-1683139.1	301	GCUGGAUU CAUUGGGA CUGdTdT	CAGUCCCA AUGAAUCC AGC	2751
AD-886933	A-1683140.1	2750	AGUCCCAA UGAAUCCA GCUdTdT	A-1683141.1	302	AGCUGGAU UCAUUGGG ACUdTdT	AGUCCCAA UGAAUCCA GCU	2752
AD-886934	A-1683142.1	3	GUCCCAAU GAAUCCAG CUGdTdT	A-1683143.1	303	CAGCUGGA UUCAUUGG GACdTdT	GUCCCAAU GAAUCCAG CUG	2753
AD-886935	A-1683144.1	4	CCAUGUCA GUCAUCCA UAAdTdT	A-1683145.1	304	UUAUGGAU GACUGACA UGGdTdT	CCAUGUCA GUCAUCCA UAA	2754
AD-886936	A-1683146.1	5	AUGUCAGU CAUCCAUA ACUdTdT	A-1683147.1	305	AGUUAUGG AUGACUGA CAUdTdT	AUGUCAGU CAUCCAUA ACU	2755
AD-886937	A-1683148.1	6	GCUGGAAA	A-1683149.1	306	UCUGGUUU	GCUGGAAA	2756

			CCCAAACC AGAdTdT			GGGUUUC AGCdTdT	CCCAAACC AGA	
AD-886938	A-1683150.1	7	AAACCCAA ACCAGAGA GUUdTdT	A-1683151.1	307	AACUCUCU GGUUUGG UUUdTdT	AAACCCAA ACCAGAGA GUU	2757
AD-886939	A-1683152.1	8	AACCCAAA CCAGAGAG UUGdTdT	A-1683153.1	308	CAACUCUC UGGUUUG GUUdTdT	AACCCAAA CCAGAGAG UUG	2758
AD-886940	A-1683154.1	9	CCGAGACA AGUCAGUU CUGdTdT	A-1683155.1	309	CAGAACUG ACUUGUCU CGGdTdT	CCGAGACA AGUCAGUU CUG	2759
AD-886941	A-1683156.1	10	GAGACAAG UCAGUUCU GGAdTdT	A-1683157.1	310	UCCAGAAC UGACUUGU CUCdTdT	GAGACAAG UCAGUUCU GGA	2760
AD-886942	A-1683158.1	11	AGACAAGU CAGUUCUG GAGdTdT	A-1683159.1	311	CUCCAGAA CUGACUUG UCUdTdT	AGACAAGU CAGUUCUG GAG	2761
AD-886943	A-1683160.1	12	CAGUUCUG GAGGAAGA GAAdTdT	A-1683161.1	312	UUCUCUUC CUCCAGAA CUGdTdT	CAGUUCUG GAGGAAGA GAA	2762
AD-886944	A-1683162.1	13	AGUUCUGG AGGAAGAG AAGdTdT	A-1683163.1	313	CUUCUCUU CCUCCAGA ACUdTdT	AGUUCUGG AGGAAGAG AAG	2763

AD-886945	A-1683164.1	14	UCUGGAGG AAGAGAAG AAGdTdT	A-1683165.1	314	CUUCUUCU CUUCCUCCA GAdTdT	UCUGGAGG AAGAGAAG AAG	2764
AD-886946	A-1683166.1	15	AGGCUCCA GAGAAGUU UCUdTdT	A-1683167.1	315	AGAAACUU CUCUGGAG CCUdTdT	AGGCUCCA GAGAAGUU UCU	2765
AD-886947	A-1683168.1	16	GGCUCCAG AGAAGUUU CUAdTdT	A-1683169.1	316	UAGAAACU UCUCUGGA GCCdTdT	GGCUCCAG AGAAGUUU CUA	2766
AD-886948	A-1683170.1	17	GCUCCAGA GAAGUUUC UACdTdT	A-1683171.1	317	GUAGAAAC UUCUCUGG AGCdTdT	GCUCCAGA GAAGUUUC UAC	2767
AD-886949	A-1683172.1	18	CUCCAGAG AAGUUUCU ACGdTdT	A-1683173.1	318	CGUAGAAA CUUCUCUG GAGdTdT	CUCCAGAG AAGUUUCU ACG	2768
AD-886950	A-1683174.1	19	UGAAGUCC GAGCUAAC UGAdTdT	A-1683175.1	319	UCAGUUAG CUCGGACU UCAdTdT	UGAAGUCC GAGCUAAC UGA	2769
AD-886951	A-1683176.1	20	GUCCGAGC UAACUGAA GUUdTdT	A-1683177.1	320	AACUUCAG UUAGCUCG GACdTdT	GUCCGAGC UAACUGAA GUU	2770
AD-886952	A-1683178.1	21	UCCGAGCU AACUGAAG	A-1683179.1	321	GAACUUCA GUUAGCUC	UCCGAGCU AACUGAAG	2771

			UUCdTdT			GGAdTdT	UUC	
AD-886953	A-1683180.1	22	CCGAGCUA ACUGAAGU UCCdTdT	A-1683181.1	322	GGAACUUC AGUUAGCU CGGdTdT	CCGAGCUA ACUGAAGU UCC	2772
AD-886954	A-1683182.1	23	CGAGCUAA CUGAAGUU CCUdTdT	A-1683183.1	323	AGGAACUU CAGUUAGC UCGdTdT	CGAGCUAA CUGAAGUU CCU	2773
AD-886955	A-1683184.1	24	GAGCUAAC UGAAGUUC CUGdTdT	A-1683185.1	324	CAGGAACU UCAGUUAG CUCdTdT	GAGCUAAC UGAAGUUC CUG	2774
AD-886956	A-1683186.1	25	AGCUAACU GAAGUUCC UGCdTdT	A-1683187.1	325	GCAGGAAC UUCAGUUA GCUdTdT	AGCUAACU GAAGUUCC UGC	2775
AD-886957	A-1683188.1	26	GCUAACUG AAGUUCCU GCUdTdT	A-1683189.1	326	AGCAGGAA CUUCAGUU AGCdTdT	GCUAACUG AAGUUCCU GCU	2776
AD-886958	A-1683190.1	27	GUUCCUGC UUCCCGAA UUUdTdT	A-1683191.1	327	AAAUUCGG GAAGCAGG AACdTdT	GUUCCUGC UUCCCGAA UUU	2777
AD-886959	A-1683192.1	28	UUCCUGCU UCCCGAAU UUUdTdT	A-1683193.1	328	AAAAUUCG GGAAGCAG GAAdTdT	UUCCUGCU UCCCGAAU UUU	2778
AD-886960	A-1683194.1	29	UCCUGCUU	A-1683195.1	329	CAAAAUUC	UCCUGCUU	2779

			CCCGAAUU UUGdTdT			GGGAAGCA GGAdTdT	CCCGAAUU UUG	
AD-886961	A-1683196.1	30	CCUGCUUC CCGAAUUU UGAdTdT	A-1683197.1	330	UCAAAAUU CGGGAAGC AGGdTdT	CCUGCUUC CCGAAUUU UGA	2780
AD-886962	A-1683198.1	31	CUGCUUCC CGAAUUUU GAAdTdT	A-1683199.1	331	UUCAAAAU UCGGGAAG CAGdTdT	CUGCUUCC CGAAUUUU GAA	2781
AD-886963	A-1683200.1	32	UGCUUCCC GAAUUUUG AAGdTdT	A-1683201.1	332	CUUCAAAA UUCGGGAA GCAdTdT	UGCUUCCC GAAUUUUG AAG	2782
AD-886964	A-1683202.1	33	GCUUCCCG AAUUUUGA AGGdTdT	A-1683203.1	333	CCUUCAAA AUUCGGGA AGCdTdT	GCUUCCCG AAUUUUGA AGG	2783
AD-886965	A-1683204.1	34	CUUCCCGA AUUUUGAA GGAdTdT	A-1683205.1	334	UCCUUCAA AAUUCGGG AAGdTdT	CUUCCCGA AUUUUGAA GGA	2784
AD-886966	A-1683206.1	35	UUCCCGAA UUUUGAAG GAGdTdT	A-1683207.1	335	CUCCUUCA AAAUUCGG GAAdTdT	UUCCCGAA UUUUGAAG GAG	2785
AD-886967	A-1683208.1	36	UCCCGAAU UUUGAAGG AGAdTdT	A-1683209.1	336	UCUCCUUC AAAAUUCG GGAdTdT	UCCCGAAU UUUGAAGG AGA	2786

AD-886968	A-1683210.1	37	CCCGAAUU UUGAAGGA GAGdTdT	A-1683211.1	337	CUCUCCUUC AAAAUUCG GGdTdT	CCCGAAUU UUGAAGGA GAG	2787
AD-886969	A-1683212.1	38	CGGAUGUG GAGAACUA GUUdTdT	A-1683213.1	338	AACUAGUU CUCCACAUC CGdTdT	CGGAUGUG GAGAACUA GUU	2788
AD-886970	A-1683214.1	39	GGAUGUGG AGAACUAG UUUdTdT	A-1683215.1	339	AAACUAGU UCUCCACA UCCdTdT	GGAUGUGG AGAACUAG UUU	2789
AD-886971	A-1683216.1	40	GAUGUGGA GAACUAGU UUGdTdT	A-1683217.1	340	CAAACUAG UUCUCCAC AUCdTdT	GAUGUGGA GAACUAGU UUG	2790
AD-886972	A-1683218.1	41	AUGUGGAG AACUAGUU UGGdTdT	A-1683219.1	341	CCAAACUA GUUCUCCA CAUdTdT	AUGUGGAG AACUAGUU UGG	2791
AD-886973	A-1683220.1	42	UGUGGAGA ACUAGUUU GGGdTdT	A-1683221.1	342	CCCAAACU AGUUCUCC ACAdTdT	UGUGGAGA ACUAGUUU GGG	2792
AD-886974	A-1683222.1	43	GUGGAGAA CUAGUUUG GGUdTdT	A-1683223.1	343	ACCCAAAC UAGUUCUC CACdTdT	GUGGAGAA CUAGUUUG GGU	2793
AD-886975	A-1683224.1	44	UGGAGAAC UAGUUUGG	A-1683225.1	344	UACCCAAA CUAGUUCU	UGGAGAAC UAGUUUGG	2794

			GUAdTdT			CCAdTdT	GUA	
AD-886976	A-1683226.1	45	GGAGAACU AGUUUGGG UAGdTdT	A-1683227.1	345	CUACCCAA ACUAGUUC UCCdTdT	GGAGAACU AGUUUGGG UAG	2795
AD-886977	A-1683228.1	46	GAGAACUA GUUUGGGU AGGdTdT	A-1683229.1	346	CCUACCCAA ACUAGUUC UCdTdT	GAGAACUA GUUUGGGU AGG	2796
AD-886978	A-1683230.1	47	ACGCUGAG AACAGCAG AAAdTdT	A-1683231.1	347	UUUCUGCU GUUCUCAG CGUdTdT	ACGCUGAG AACAGCAG AAA	2797
AD-886979	A-1683232.1	48	GCUGAGAA CAGCAGAA ACAdTdT	A-1683233.1	348	UGUUUCUG CUGUUCUC AGCdTdT	GCUGAGAA CAGCAGAA ACA	2798
AD-886980	A-1683234.1	49	CUGAGAAC AGCAGAAA CAAdTdT	A-1683235.1	349	UUGUUUCU GCUGUUCU CAGdTdT	CUGAGAAC AGCAGAAA CAA	2799
AD-886981	A-1683236.1	50	UGAGAACA GCAGAAAC AAUdTdT	A-1683237.1	350	AUUGUUUC UGCUGUUC UCAdTdT	UGAGAACA GCAGAAAC AAU	2800
AD-886982	A-1683238.1	51	GAGAACAG CAGAAACA AUUdTdT	A-1683239.1	351	AAUUGUUU CUGCUGUU CUCdTdT	GAGAACAG CAGAAACA AUU	2801
AD-886983	A-1683240.1	52	AGAACAGC	A-1683241.1	352	UAAUUGUU	AGAACAGC	2802

			AGAAACAA UUA _d T _d T			UCUGCUGU UCU _d T _d T	AGAAACAA UUA	
AD-886984	A-1683242.1	53	GAACAGCA GAAACAAU UAC _d T _d T	A-1683243.1	353	GUAAUUGU UUCUGCUG UUC _d T _d T	GAACAGCA GAAACAAU UAC	2803
AD-886985	A-1683244.1	54	AACAGCAG AAACAAUU ACU _d T _d T	A-1683245.1	354	AGUAAUUG UUUCUGCU GUU _d T _d T	AACAGCAG AAACAAUU ACU	2804
AD-886986	A-1683246.1	55	ACAGCAGA AACAAUUA CUG _d T _d T	A-1683247.1	355	CAGUAAUU GUUUCUGC UGU _d T _d T	ACAGCAGA AACAAUUA CUG	2805
AD-886987	A-1683248.1	56	CAGCAGAA ACAAUUAC UGG _d T _d T	A-1683249.1	356	CCAGUAAU UGUUUCUG CUG _d T _d T	CAGCAGAA ACAAUUAC UGG	2806
AD-886988	A-1683250.1	57	AGCAGAAA CAAUUACU GGC _d T _d T	A-1683251.1	357	GCCAGUAA UUGUUUCU GCU _d T _d T	AGCAGAAA CAAUUACU GGC	2807
AD-886989	A-1683252.1	58	GCAGAAAC AAUUACUG GCA _d T _d T	A-1683253.1	358	UGCCAGUA AUUGUUUC UGC _d T _d T	GCAGAAAC AAUUACUG GCA	2808
AD-886990	A-1683254.1	59	CAGAAACA AUUACUGG CAAd _d T _d T	A-1683255.1	359	UUGCCAGU AAUUGUUU CUG _d T _d T	CAGAAACA AUUACUGG CAA	2809

AD-886991	A-1683256.1	60	AGAAACAA UUACUGGC AAGdTdT	A-1683257.1	360	CUUGCCAG UAAUUGUU UCUdTdT	AGAAACAA UUACUGGC AAG	2810
AD-886992	A-1683258.1	61	GAAACAAU UACUGGCA AGUdTdT	A-1683259.1	361	ACUUGCCA GUAAUUGU UUCdTdT	GAAACAAU UACUGGCA AGU	2811
AD-886993	A-1683260.1	62	AACAAUUA CUGGCAAG UAUdTdT	A-1683261.1	362	AUACUUGC CAGUAAUU GUUdTdT	AACAAUUA CUGGCAAG UAU	2812
AD-886994	A-1683262.1	63	ACAAUUAC UGGCAAGU AUGdTdT	A-1683263.1	363	CAUACUUG CCAGUAAU UGUdTdT	ACAAUUAC UGGCAAGU AUG	2813
AD-886995	A-1683264.1	64	CAAUUACU GGCAAGUA UGGdTdT	A-1683265.1	364	CCAUACUU GCCAGUAA UUGdTdT	CAAUUACU GGCAAGUA UGG	2814
AD-886996	A-1683266.1	65	AAUUACUG GCAAGUAU GGUdTdT	A-1683267.1	365	ACCAUACU UGCCAGUA AUUdTdT	AAUUACUG GCAAGUAU GGU	2815
AD-886997	A-1683268.1	66	UACUGGCA AGUAUGGU GUGdTdT	A-1683269.1	366	CACACCAU ACUUGCCA GUAdTdT	UACUGGCA AGUAUGGU GUG	2816
AD-886998	A-1683270.1	67	AUGUCCGC CAGGUUUU	A-1683271.1	367	UCAAAAAC CUGGCGGA	AUGUCCGC CAGGUUUU	2817

			UGAdTdT			CAUdTdT	UGA	
AD-886999	A-1683272.1	68	UGUCCGCC AGGUUUUU GAGdTdT	A-1683273.1	368	CUCAAAAA CCUGGCGG ACAdTdT	UGUCCGCC AGGUUUUU GAG	2818
AD-887000	A-1683274.1	69	GUCCGCCA GGUUUUUG AGUdTdT	A-1683275.1	369	ACUCAAAA ACCUGGCG GACdTdT	GUCCGCCA GGUUUUUG AGU	2819
AD-887001	A-1683276.1	70	UCCGCCAG GUUUUUGA GUAdTdT	A-1683277.1	370	UACUCAAA AACCUGGC GGAdTdT	UCCGCCAG GUUUUUGA GUA	2820
AD-887002	A-1683278.1	71	CCGCCAGG UUUUUGAG UAUdTdT	A-1683279.1	371	AUACUCAA AAACCUGG CGGdTdT	CCGCCAGG UUUUUGAG UAU	2821
AD-887003	A-1683280.1	72	CGCCAGGU UUUUGAGU AUGdTdT	A-1683281.1	372	CAUACUCA AAAACCUG GCGdTdT	CGCCAGGU UUUUGAGU AUG	2822
AD-887004	A-1683282.1	73	GCCAGGUU UUUGAGUA UGAdTdT	A-1683283.1	373	UCAUACUC AAAAACCU GGCdTdT	GCCAGGUU UUUGAGUA UGA	2823
AD-887005	A-1683284.1	74	CCAGGUUU UUGAGUAU GACdTdT	A-1683285.1	374	GUCAUACU CAAAAACC UGGdTdT	CCAGGUUU UUGAGUAU GAC	2824
AD-887006	A-1683286.1	75	CAGGUUUU	A-1683287.1	375	GGUCAUAC	CAGGUUUU	2825

			UGAGUAUG ACCdTdT			UCAAAAAC CUGdTdT	UGAGUAUG ACC	
AD-887007	A-1683288.1	76	AGGUUUUU GAGUAUGA CCUdTdT	A-1683289.1	376	AGGUCAUA CUCAAAAA CCUdTdT	AGGUUUUU GAGUAUGA CCU	2826
AD-887008	A-1683290.1	77	GGUUUUUG AGUAUGAC CUCdTdT	A-1683291.1	377	GAGGUCAU ACUCAAAA ACCdTdT	GGUUUUUG AGUAUGAC CUC	2827
AD-887009	A-1683292.1	78	GUUUUUGA GUAUGACC UCAdTdT	A-1683293.1	378	UGAGGUCA UACUCAAA AACdTdT	GUUUUUGA GUAUGACC UCA	2828
AD-887010	A-1683294.1	79	GACCUCAU CAGCCAGU UUAdTdT	A-1683295.1	379	UAAACUGG CUGAUGAG GUCdTdT	GACCUCAU CAGCCAGU UUA	2829
AD-887011	A-1683296.1	80	ACCUCAUC AGCCAGUU UAUdTdT	A-1683297.1	380	AUAAACUG GCUGAUGA GGUdTdT	ACCUCAUC AGCCAGUU UAU	2830
AD-887012	A-1683298.1	81	CCUCAUCA GCCAGUUU AUGdTdT	A-1683299.1	381	CAUAAACU GGCUGAUG AGGdTdT	CCUCAUCA GCCAGUUU AUG	2831
AD-887013	A-1683300.1	82	CUCAUCAG CCAGUUUA UGCdTdT	A-1683301.1	382	GCAUAAAC UGGCUGAU GAGdTdT	CUCAUCAG CCAGUUUA UGC	2832

AD-887014	A-1683302.1	83	UCAUCAGC CAGUUUAU GCAdTdT	A-1683303.1	383	UGCAUAAA CUGGCUGA UGAdTdT	UCAUCAGC CAGUUUAU GCA	2833
AD-887015	A-1683304.1	84	UCAGCCAG UUUAUGCA GGGdTdT	A-1683305.1	384	CCCUGCAU AAACUGGC UGAdTdT	UCAGCCAG UUUAUGCA GGG	2834
AD-887016	A-1683306.1	85	GGCUACCC UUCUAAGG UUCdTdT	A-1683307.1	385	GAACCUUA GAAGGGUA GCCdTdT	GGCUACCC UUCUAAGG UUC	2835
AD-887017	A-1683308.1	86	GCUACCCU UCUAAGGU UCAdTdT	A-1683309.1	386	UGAACCUU AGAAGGGU AGCdTdT	GCUACCCU UCUAAGGU UCA	2836
AD-887018	A-1683310.1	87	CUACCCUU CUAAGGUU CACdTdT	A-1683311.1	387	GUGAACCU UAGAAGGG UAGdTdT	CUACCCUU CUAAGGUU CAC	2837
AD-887019	A-1683312.1	88	UACCCUUC UAAGGUUC ACAdTdT	A-1683313.1	388	UGUGAACC UUAGAAGG GUAdTdT	UACCCUUC UAAGGUUC ACA	2838
AD-887020	A-1683314.1	89	ACCCUUCU AAGGUUCA CAUdTdT	A-1683315.1	389	AUGUGAAC CUUAGAAG GGUdTdT	ACCCUUCU AAGGUUCA CAU	2839
AD-887021	A-1683316.1	90	CCCUUCUA AGGUUCAC	A-1683317.1	390	UAUGUGAA CCUUGAGAA	CCCUUCUA AGGUUCAC	2840

			AUAdTdT			GGGdTdT	AUA	
AD-887022	A-1683318.1	91	CCUUCUAA GGUUCACA UACdTdT	A-1683319.1	391	GUAUGUGA ACCUUAGA AGGdTdT	CCUUCUAA GGUUCACA UAC	2841
AD-887023	A-1683320.1	92	CUUCUAAG GUUCACAU ACUdTdT	A-1683321.1	392	AGUAUGUG AACCUUAG AAGdTdT	CUUCUAAG GUUCACAU ACU	2842
AD-887024	A-1683322.1	93	UUCUAAGG UUCACAU CUGdTdT	A-1683323.1	393	CAGUAUGU GAACCUUA GAAdTdT	UUCUAAGG UUCACAU CUG	2843
AD-887025	A-1683324.1	94	CUAAGGUU CACAUACU GCCdTdT	A-1683325.1	394	GGCAGUAU GUGAACCU UAGdTdT	CUAAGGUU CACAUACU GCC	2844
AD-887026	A-1683326.1	95	UAAGGUUC ACAUACUG CCUdTdT	A-1683327.1	395	AGGCAGUA UGUGAACC UUAdTdT	UAAGGUUC ACAUACUG CCU	2845
AD-887027	A-1683328.1	96	GAGUCCAG AACUGUCA UAAAdTdT	A-1683329.1	396	UUAUGACA GUUCUGGA CUCdTdT	GAGUCCAG AACUGUCA UAA	2846
AD-887028	A-1683330.1	97	AGUCCAGA ACUGUCAU AAGdTdT	A-1683331.1	397	CUUAUGAC AGUUCUGG ACUdTdT	AGUCCAGA ACUGUCAU AAG	2847
AD-887029	A-1683332.1	98	GUCCAGAA	A-1683333.1	398	UCUUAUGA	GUCCAGAA	2848

			CUGUCAUA AGAdTdT			CAGUUCUG GACdTdT	CUGUCAUA AGA	
AD-887030	A-1683334.1	99	UCCAGAAC UGUCAUAA GAUdTdT	A-1683335.1	399	AUCUUAUG ACAGUUCU GGAdTdT	UCCAGAAC UGUCAUAA GAU	2849
AD-887031	A-1683336.1	100	CCAGAACU GUCAUAAG AUAdTdT	A-1683337.1	400	UAUCUUAU GACAGUUC UGGdTdT	CCAGAACU GUCAUAAG AUA	2850
AD-887032	A-1683338.1	101	CAGAACUG UCAUAAGA UAUdTdT	A-1683339.1	401	AUAUCUUA UGACAGUU CUGdTdT	CAGAACUG UCAUAAGA UAU	2851
AD-887033	A-1683340.1	102	AGAACUGU CAUAAGAU AUGdTdT	A-1683341.1	402	CAUAUCUU AUGACAGU UCUdTdT	AGAACUGU CAUAAGAU AUG	2852
AD-887034	A-1683342.1	103	GAACUGUC AUAAGAU UGAdTdT	A-1683343.1	403	UCAUAUCU UAUGACAG UUCdTdT	GAACUGUC AUAAGAU UGA	2853
AD-887035	A-1683344.1	104	AACUGUCA UAAGAU GAGdTdT	A-1683345.1	404	CUCAUAUC UUAUGACA GUUdTdT	AACUGUCA UAAGAU GAG	2854
AD-887036	A-1683346.1	105	ACUGUCAU AAGAU AGCdTdT	A-1683347.1	405	GCUCAUAU CUUAUGAC AGUdTdT	ACUGUCAU AAGAU AGC	2855

AD-887037	A-1683348.1	106	CUGUCAUA AGAUAUGA GCUdTdT	A-1683349.1	406	AGCUCAUA UCUUAUGA CAGdTdT	CUGUCAUA AGAUAUGA GCU	2856
AD-887038	A-1683350.1	107	UGUCAUAA GAUAUGAG CUGdTdT	A-1683351.1	407	CAGCUCAU AUCUUAUG ACAdTdT	UGUCAUAA GAUAUGAG CUG	2857
AD-887039	A-1683352.1	108	GUCAUAAG AUAUGAGC UGAdTdT	A-1683353.1	408	UCAGCUCA UAUCUUAU GACdTdT	GUCAUAAG AUAUGAGC UGA	2858
AD-887040	A-1683354.1	109	AAGAU AUG AGCUGAAU ACCdTdT	A-1683355.1	409	GGUAUUCA GCUCAUAU CUUdTdT	AAGAU AUG AGCUGAAU ACC	2859
AD-887041	A-1683356.1	110	UGAAUACC GAGACAGU GAAdTdT	A-1683357.1	410	UUCACUGU CUCGGUAU UCAdTdT	UGAAUACC GAGACAGU GAA	2860
AD-887042	A-1683358.1	111	UGAAGGCU GAGAAGGA AAUdTdT	A-1683359.1	411	AUUUCCUU CUCAGCCU UCAdTdT	UGAAGGCU GAGAAGGA AAU	2861
AD-887043	A-1683360.1	112	GGCUGAGA AGGAAAUC CCUdTdT	A-1683361.1	412	AGGGAUUU CCUUCUCA GCCdTdT	GGCUGAGA AGGAAAUC CCU	2862
AD-887044	A-1683362.1	113	CGGACAGU UCCCGUAU	A-1683363.1	413	AGAAUACG GGAACUGU	CGGACAGU UCCCGUAU	2863

			UCUdTdT			CCGdTdT	UCU	
AD-887045	A-1683364.1	114	GGACAGUU CCCGUAUU CUUdTdT	A-1683365.1	414	AAGAAUAC GGGAACUG UCCdTdT	GGACAGUU CCCGUAUU CUU	2864
AD-887046	A-1683366.1	115	GACAGUUC CCGUAUUC UUGdTdT	A-1683367.1	415	CAAGAAUA CGGGAACU GUCdTdT	GACAGUUC CCGUAUUC UUG	2865
AD-887047	A-1683368.1	116	ACAGUUCC CGUAUUCU UGGdTdT	A-1683369.1	416	CCAAGAAU ACGGGAAC UGUdTdT	ACAGUUCC CGUAUUCU UGG	2866
AD-887048	A-1683370.1	117	GCCUCUGG GUCAUUUA CAGdTdT	A-1683371.1	417	CUGUAAAU GACCCAGA GGCdTdT	GCCUCUGG GUCAUUUA CAG	2867
AD-887049	A-1683372.1	118	CCAUUGUC CUCUCCAA ACUdTdT	A-1683373.1	418	AGUUUGGA GAGGACAA UGGdTdT	CCAUUGUC CUCUCCAA ACU	2868
AD-887050	A-1683374.1	119	CAUUGUCC UCUCCAAA CUGdTdT	A-1683375.1	419	CAGUUUGG AGAGGACA AUGdTdT	CAUUGUCC UCUCCAAA CUG	2869
AD-887051	A-1683376.1	120	AUUGUCCU CUCCAAAC UGAdTdT	A-1683377.1	420	UCAGUUUG GAGAGGAC AAUdTdT	AUUGUCCU CUCCAAAC UGA	2870
AD-887052	A-1683378.1	121	UUGUCCUC	A-1683379.1	421	UUCAGUUU	UUGUCCUC	2871

			UCCAAACU GAAdTdT			GGAGAGGA CAAdTdT	UCCAAACU GAA	
AD-887053	A-1683380.1	122	UCUCCAAA CUGAACCC AGAdTdT	A-1683381.1	422	UCUGGGUU CAGUUUGG AGAdTdT	UCUCCAAA CUGAACCC AGA	2872
AD-887054	A-1683382.1	123	CAAACUGA ACCCAGAG AAUdTdT	A-1683383.1	423	AUUCUCUG GGUUCAGU UUGdTdT	CAAACUGA ACCCAGAG AAU	2873
AD-887055	A-1683384.1	124	AAACUGAA CCCAGAGA AUCdTdT	A-1683385.1	424	GAUUCUCU GGGUUCAG UUUdTdT	AAACUGAA CCCAGAGA AUC	2874
AD-887056	A-1683386.1	125	CCCAGAGA AUCUGGAA CUCdTdT	A-1683387.1	425	GAGUUCCA GAUUCUCU GGGdTdT	CCCAGAGA AUCUGGAA CUC	2875
AD-887057	A-1683388.1	126	GUCGCCAA UGCCUUCA UCAdTdT	A-1683389.1	426	UGAUGAAG GCAUUGGC GACdTdT	GUCGCCAA UGCCUUCA UCA	2876
AD-887058	A-1683390.1	127	CCAAUGCC UUCAUCAU CUGdTdT	A-1683391.1	427	CAGAUGAU GAAGGCAU UGGdTdT	CCAAUGCC UUCAUCAU CUG	2877
AD-887059	A-1683392.1	128	AAUGCCUU CAUCAUCU GUGdTdT	A-1683393.1	428	CACAGAUG AUGAAGGC AUUdTdT	AAUGCCUU CAUCAUCU GUG	2878

AD-887060	A-1683394.1	129	AUGCCUUC AUCAUCUG UGGdTdT	A-1683395.1	429	CCACAGAU GAUGAAGG CAUdTdT	AUGCCUUC AUCAUCUG UGG	2879
AD-887061	A-1683396.1	130	GUGGCACC UUGUACAC CGUdTdT	A-1683397.1	430	ACGGUGUA CAAGGUGC CACdTdT	GUGGCACC UUGUACAC CGU	2880
AD-887062	A-1683398.1	131	ACCGUCAA CUUUGCUU AUGdTdT	A-1683399.1	431	CAUAAGCA AAGUUGAC GGUdTdT	ACCGUCAA CUUUGCUU AUG	2881
AD-887063	A-1683400.1	132	CCGUCAAC UUUGCUUA UGAdTdT	A-1683401.1	432	UCAUAAGC AAAGUUGA CGGdTdT	CCGUCAAC UUUGCUUA UGA	2882
AD-887064	A-1683402.1	133	CGUCAACU UUGCUUAU GACdTdT	A-1683403.1	433	GUCAUAAG CAAAGUUG ACGdTdT	CGUCAACU UUGCUUAU GAC	2883
AD-887065	A-1683404.1	134	GUCAACUU UGCUUAUG ACAdTdT	A-1683405.1	434	UGUCAUAA GCAAAGUU GACdTdT	GUCAACUU UGCUUAUG ACA	2884
AD-887066	A-1683406.1	135	UCAACUUU GCUUAUGA CACdTdT	A-1683407.1	435	GUGUCAUA AGCAAAGU UGAdTdT	UCAACUUU GCUUAUGA CAC	2885
AD-887067	A-1683408.1	136	CCCUGACC AUCCCAUU	A-1683409.1	436	UUGAAUGG GAUGGUCA	CCCUGACC AUCCCAUU	2886

			CAAdTdT			GGGdTdT	CAA	
AD-887068	A-1683410.1	137	CCUGACCA UCCCAUUC AAGdTdT	A-1683411.1	437	CUUGAAUG GGAUGGUC AGGdTdT	CCUGACCA UCCCAUUC AAG	2887
AD-887069	A-1683412.1	138	CUGACCAU CCCAUUCA AGAdTdT	A-1683413.1	438	UCUUGAAU GGGAUGGU CAGdTdT	CUGACCAU CCCAUUCA AGA	2888
AD-887070	A-1683414.1	139	CCAUCCCA UUCAAGAA CCGdTdT	A-1683415.1	439	CGGUUCUU GAAUGGGA UGGdTdT	CCAUCCCA UUCAAGAA CCG	2889
AD-887071	A-1683416.1	140	AUCCCAUU CAAGAACC GCUdTdT	A-1683417.1	440	AGCGGUUC UUGAAUGG GAUdTdT	AUCCCAUU CAAGAACC GCU	2890
AD-887072	A-1683418.1	141	UCCCAUUC AAGAACCG CUAdTdT	A-1683419.1	441	UAGCGGUU CUUGAAUG GGAdTdT	UCCCAUUC AAGAACCG CUA	2891
AD-887073	A-1683420.1	142	CCCAUUCA AGAACCGC UAUdTdT	A-1683421.1	442	AUAGCGGU UCUUGAAU GGGdTdT	CCCAUUCA AGAACCGC UAU	2892
AD-887074	A-1683422.1	143	AAGUACAG CAGCAUGA UUGdTdT	A-1683423.1	443	CAAUCAUG CUGCUGUA CUUdTdT	AAGUACAG CAGCAUGA UUG	2893
AD-887075	A-1683424.1	144	AGUACAGC	A-1683425.1	444	UCAAUCAU	AGUACAGC	2894

			AGCAUGAU UGAdTdT			GCUGCUGU ACUdTdT	AGCAUGAU UGA	
AD-887076	A-1683426.1	145	ACAGCAGC AUGAUUGA CUAdTdT	A-1683427.1	445	UAGUCAAU CAUGCUGC UGUdTdT	ACAGCAGC AUGAUUGA CUA	2895
AD-887077	A-1683428.1	146	CAGCAGCA UGAUUGAC UACdTdT	A-1683429.1	446	GUAGUCAA UCAUGCUG CUGdTdT	CAGCAGCA UGAUUGAC UAC	2896
AD-887078	A-1683430.1	147	AGCAGCAU GAUUGACU ACAdTdT	A-1683431.1	447	UGUAGUCA AUCAUGCU GCUdTdT	AGCAGCAU GAUUGACU ACA	2897
AD-887079	A-1683432.1	148	GCAGCAUG AUUGACUA CAAdTdT	A-1683433.1	448	UUGUAGUC AAUCAUGC UGCdTdT	GCAGCAUG AUUGACUA CAA	2898
AD-887080	A-1683434.1	149	CAGCAUGA UUGACUAC AACdTdT	A-1683435.1	449	GUUGUAGU CAAUCAUG CUGdTdT	CAGCAUGA UUGACUAC AAC	2899
AD-887081	A-1683436.1	150	AGCAUGAU UGACUACA ACCdTdT	A-1683437.1	450	GGUUGUAG UCAAUCAU GCUdTdT	AGCAUGAU UGACUACA ACC	2900
AD-887082	A-1683438.1	151	GCAUGAUU GACUACAA CCCdTdT	A-1683439.1	451	GGGUUGUA GUCAAUCA UGCdTdT	GCAUGAUU GACUACAA CCC	2901

AD-887083	A-1683440.1	152	UCUUUGCC UGGGACAA CUUdTdT	A-1683441.1	452	AAGUUGUC CCAGGCAA AGAdTdT	UCUUUGCC UGGGACAA CUU	2902
AD-887084	A-1683442.1	153	UUGCCUGG GACAACUU GAAdTdT	A-1683443.1	453	UUCAAGUU GUCCCAGG CAAdTdT	UUGCCUGG GACAACUU GAA	2903
AD-887085	A-1683444.1	154	CCUGGGAC AACUUGAA CAUdTdT	A-1683445.1	454	AUGUUCAA GUUGUCCC AGGdTdT	CCUGGGAC AACUUGAA CAU	2904
AD-887086	A-1683446.1	155	CUGGGACA ACUUGAAC AUGdTdT	A-1683447.1	455	CAUGUUCA AGUUGUCC CAGdTdT	CUGGGACA ACUUGAAC AUG	2905
AD-887087	A-1683448.1	156	UGGGACAA CUUGAACA UGGdTdT	A-1683449.1	456	CCAUGUUC AAGUUGUC CCAdTdT	UGGGACAA CUUGAACA UGG	2906
AD-887088	A-1683450.1	157	GGGACAAC UUGAACAU GGUdTdT	A-1683451.1	457	ACCAUGUU CAAGUUGU CCCdTdT	GGGACAAC UUGAACAU GGU	2907
AD-887089	A-1683452.1	158	GGACAACU UGAACAUG GUCdTdT	A-1683453.1	458	GACCAUGU UCAAGUUG UCCdTdT	GGACAACU UGAACAUG GUC	2908
AD-887090	A-1683454.1	159	GACAACUU GAACAUGG	A-1683455.1	459	UGACCAUG UUCAAGUU	GACAACUU GAACAUGG	2909

			UCAdTdT			GUCdTdT	UCA	
AD-887091	A-1683456.1	160	ACAACUUG AACAUGGU CACdTdT	A-1683457.1	460	GUGACCAU GUUCAAGU UGUdTdT	ACAACUUG AACAUGGU CAC	2910
AD-887092	A-1683458.1	161	CAACUUGA ACAUGGUC ACUdTdT	A-1683459.1	461	AGUGACCA UGUUCAAG UUGdTdT	CAACUUGA ACAUGGUC ACU	2911
AD-887093	A-1683460.1	162	ACUUGAAC AUGGUCAC UUAdTdT	A-1683461.1	462	UAAGUGAC CAUGUUCA AGUdTdT	ACUUGAAC AUGGUCAC UUA	2912
AD-887094	A-1683462.1	163	CUUGAACA UGGUCACU UAUdTdT	A-1683463.1	463	AUAAGUGA CCAUGUUC AAGdTdT	CUUGAACA UGGUCACU UAU	2913
AD-887095	A-1683464.1	164	UUGAACAU GGUCACUU AUGdTdT	A-1683465.1	464	CAUAAGUG ACCAUGUU CAAdTdT	UUGAACAU GGUCACUU AUG	2914
AD-887096	A-1683466.1	165	UGAACAUG GUCACUUA UGAdTdT	A-1683467.1	465	UCAUAAGU GACCAUGU UCAdTdT	UGAACAUG GUCACUUA UGA	2915
AD-887097	A-1683468.1	166	GAACAUGG UCACUUAU GACdTdT	A-1683469.1	466	GUCAUAAG UGACCAUG UUCdTdT	GAACAUGG UCACUUAU GAC	2916
AD-887098	A-1683470.1	167	AACAUGGU	A-1683471.1	467	UGUCAUAA	AACAUGGU	2917

			CACUUAUG ACAdTdT			GUGACCAU GUUdTdT	CACUUAUG ACA	
AD-887099	A-1683472.1	168	ACAUGGUC ACUUAUGA CAUdTdT	A-1683473.1	468	AUGUCAUA AGUGACCA UGUdTdT	ACAUGGUC ACUUAUGA CAU	2918
AD-887100	A-1683474.1	169	CAUGGUCA CUUAUGAC AUCdTdT	A-1683475.1	469	GAUGUCAU AAGUGACC AUGdTdT	CAUGGUCA CUUAUGAC AUC	2919
AD-887101	A-1683476.1	170	UGGUCACU UAUGACAU CAAdTdT	A-1683477.1	470	UUGAUGUC AUAAGUGA CCAdTdT	UGGUCACU UAUGACAU CAA	2920
AD-887102	A-1683478.1	171	GGUCACUU AUGACAUC AAGdTdT	A-1683479.1	471	CUUGAUGU CAUAAGUG ACCdTdT	GGUCACUU AUGACAUC AAG	2921
AD-887103	A-1683480.1	172	GUCACUUA UGACAUCA AGCdTdT	A-1683481.1	472	GCUUGAUG UCAUAAGU GACdTdT	GUCACUUA UGACAUCA AGC	2922
AD-887104	A-1683482.1	173	ACAUCAAG CUCUCCAA GAUdTdT	A-1683483.1	473	AUCUUGGA GAGCUUGA UGUdTdT	ACAUCAAG CUCUCCAA GAU	2923
AD-887105	A-1683484.1	174	AUCAAGCU CUCCAAGA UGUdTdT	A-1683485.1	474	ACAUCUUG GAGAGCUU GAUdTdT	AUCAAGCU CUCCAAGA UGU	2924

AD-887106	A-1683486.1	175	UCAAGCUC UCCAAGAU GUGdTdT	A-1683487.1	475	CACAUCUU GGAGAGCU UGAdTdT	UCAAGCUC UCCAAGAU GUG	2925
AD-887107	A-1683488.1	176	AGCUCUCC AAGAUGUG AAAdTdT	A-1683489.1	476	UUUCACAU CUUGGAGA GCUdTdT	AGCUCUCC AAGAUGUG AAA	2926
AD-887108	A-1683490.1	177	GCUCUCCA AGAUGUGA AAAdTdT	A-1683491.1	477	UUUUCACA UCUUGGAG AGCdTdT	GCUCUCCA AGAUGUGA AAA	2927
AD-887109	A-1683492.1	178	CUCUCCAA GAUGUGAA AAGdTdT	A-1683493.1	478	CUUUUCAC AUCUUGGA GAGdTdT	CUCUCCAA GAUGUGAA AAG	2928
AD-887110	A-1683494.1	179	UCUCCAAG AUGUGAAA AGCdTdT	A-1683495.1	479	GCUUUUCA CAUCUUGG AGAdTdT	UCUCCAAG AUGUGAAA AGC	2929
AD-887111	A-1683496.1	180	UCCAAGAU GUGAAAAG CCUdTdT	A-1683497.1	480	AGGCUUUU CACAUCUU GGAdTdT	UCCAAGAU GUGAAAAG CCU	2930
AD-887112	A-1683498.1	181	CCAAGAUG UGAAAAGC CUCdTdT	A-1683499.1	481	GAGGCUUU UCACAUCU UGGdTdT	CCAAGAUG UGAAAAGC CUC	2931
AD-887113	A-1683500.1	182	GGAUGAAC AUGGUCAC	A-1683501.1	482	AUGGUGAC CAUGUUCA	GGAUGAAC AUGGUCAC	2932

			CAUdTdT			UCCdTdT	CAU	
AD-887114	A-1683502.1	183	CAGGAAUU GUAGUCUG AGGdTdT	A-1683503.1	483	CCUCAGAC UACAAUUC CUGdTdT	CAGGAAUU GUAGUCUG AGG	2933
AD-887115	A-1683504.1	184	AGGAAUUG UAGUCUGA GGGdTdT	A-1683505.1	484	CCCUCAGAC UACAAUUC CUdTdT	AGGAAUUG UAGUCUGA GGG	2934
AD-887116	A-1683506.1	185	UCUUCUGU CAGCAUUU AUGdTdT	A-1683507.1	485	CAUAAAUG CUGACAGA AGAdTdT	UCUUCUGU CAGCAUUU AUG	2935
AD-887117	A-1683508.1	186	CUUCUGUC AGCAUUUA UGGdTdT	A-1683509.1	486	CCAUAAAU GCUGACAG AAGdTdT	CUUCUGUC AGCAUUUA UGG	2936
AD-887118	A-1683510.1	187	UUCUGUCA GCAUUUAU GGGdTdT	A-1683511.1	487	CCCAUAAA UGCUGACA GAAdTdT	UUCUGUCA GCAUUUAU GGG	2937
AD-887119	A-1683512.1	188	CUGUCAGC AUUUAUGG GAUdTdT	A-1683513.1	488	AUCCCAUA AAUGCUGA CAGdTdT	CUGUCAGC AUUUAUGG GAU	2938
AD-887120	A-1683514.1	189	UGUCAGCA UUUAUGGG AUGdTdT	A-1683515.1	489	CAUCCCAU AAAUGCUG ACAdTdT	UGUCAGCA UUUAUGGG AUG	2939
AD-887121	A-1683516.1	190	GUCAGCAU	A-1683517.1	490	ACAUCCCA	GUCAGCAU	2940

			UUAUGGGA UGUdTdT			UAAAUGCU GACdTdT	UUAUGGGA UGU	
AD-887122	A-1683518.1	191	UCAGCAUU UAUGGGAU GUUdTdT	A-1683519.1	491	AACAUCCC AUAAAUGC UGAdTdT	UCAGCAUU UAUGGGAU GUU	2941
AD-887123	A-1683520.1	192	CAGCAUUU AUGGGAUG UUUdTdT	A-1683521.1	492	AAACAUC CAUAAAUG CUGdTdT	CAGCAUUU AUGGGAUG UUU	2942
AD-887124	A-1683522.1	193	AGCAUUUA UGGGAUGU UUAdTdT	A-1683523.1	493	UAAACAUC CCAUAAAU GCUdTdT	AGCAUUUA UGGGAUGU UUA	2943
AD-887125	A-1683524.1	194	GCAUUUAU GGGAUGUU UAAdTdT	A-1683525.1	494	UUAAACAU CCCAUAAA UGCdTdT	GCAUUUAU GGGAUGUU UAA	2944
AD-887126	A-1683526.1	195	CAUUUAUG GGAUGUUU AAUdTdT	A-1683527.1	495	AUUAAACA UCCCAUAA AUGdTdT	CAUUUAUG GGAUGUUU AAU	2945
AD-887127	A-1683528.1	196	AUUUAUGG GAUGUUUA AUGdTdT	A-1683529.1	496	CAUUAAAC AUCCCAUA AAUdTdT	AUUUAUGG GAUGUUUA AUG	2946
AD-887128	A-1683530.1	197	UUUAUGGG AUGUUUAA UGAdTdT	A-1683531.1	497	UCAUUAAA CAUCCCAU AAAdTdT	UUUAUGGG AUGUUUAA UGA	2947

AD-887129	A-1683532.1	198	UUAUGGGA UGUUUAAU GACdTdT	A-1683533.1	498	GUCAUUA ACAUCCA UAdTdT	UUAUGGGA UGUUUAAU GAC	2948
AD-887130	A-1683534.1	199	AUGGGAUG UUUAAUGA CAUdTdT	A-1683535.1	499	AUGUCAU AAACAUC CAUdTdT	AUGGGAUG UUUAAUGA CAU	2949
AD-887131	A-1683536.1	200	UGGGAUGU UUAUGAC AUAdTdT	A-1683537.1	500	UAUGUCA UAAACAUC CCAdTdT	UGGGAUGU UUAUGAC AUA	2950
AD-887132	A-1683538.1	201	GGGAUGUU UAAUGACA UAGdTdT	A-1683539.1	501	CUAUGUCA UUAACAUC CCCdTdT	GGGAUGUU UAAUGACA UAG	2951
AD-887133	A-1683540.1	202	GGAUGUUU AAUGACAU AGUdTdT	A-1683541.1	502	ACUAUGUC AUUAAACA UCCdTdT	GGAUGUUU AAUGACAU AGU	2952
AD-887134	A-1683542.1	203	GAUGUUUA AUGACAU GUUdTdT	A-1683543.1	503	AACUAUGU CAUUAAC AUCdTdT	GAUGUUUA AUGACAU GUU	2953
AD-887135	A-1683544.1	204	AUGUUUAA UGACAUAG UUCdTdT	A-1683545.1	504	GAACUAUG UCAUAAA CAUdTdT	AUGUUUAA UGACAUAG UUC	2954
AD-887136	A-1683546.1	205	UGUUUAAU GACAUAGU	A-1683547.1	505	UGAACUAU GUCAUUA	UGUUUAAU GACAUAGU	2955

			UCAdTdT			ACAdTdT	UCA	
AD-887137	A-1683548.1	206	GUUUA AUG ACA UAGUU CAAdTdT	A-1683549.1	506	UUGAACUA UGUCAUUA AACdTdT	GUUUA AUG ACA UAGUU CAA	2956
AD-887138	A-1683550.1	207	UUUAAUGA CAUAGUUC AAGdTdT	A-1683551.1	507	CUUGAACU AUGUCAU AAAdTdT	UUUAAUGA CAUAGUUC AAG	2957
AD-887139	A-1683552.1	208	UUAAUGAC AUAGUUCA AGUdTdT	A-1683553.1	508	ACUUGAAC UAUGUCAU UAdTdT	UUAAUGAC AUAGUUCA AGU	2958
AD-887140	A-1683554.1	209	UAAUGACA UAGUUCAA GUUdTdT	A-1683555.1	509	AACUUGAA CUAUGUCA UAdTdT	UAAUGACA UAGUUCAA GUU	2959
AD-887141	A-1683556.1	210	AAUGACAU AGUUCAAG UUUdTdT	A-1683557.1	510	AAACUUGA ACUAUGUC AUUdTdT	AAUGACAU AGUUCAAG UUU	2960
AD-887142	A-1683558.1	211	AUGACAUA GUUCAAGU UUUdTdT	A-1683559.1	511	AAAACUUG AACUAUGU CAUdTdT	AUGACAUA GUUCAAGU UUU	2961
AD-887143	A-1683560.1	212	UGACAUAG UUCAAGUU UUCdTdT	A-1683561.1	512	GAAAACUU GAACUAUG UCAdTdT	UGACAUAG UUCAAGUU UUC	2962
AD-887144	A-1683562.1	213	GACAUAGU	A-1683563.1	513	AGAAAACU	GACAUAGU	2963

			UCAAGUUU UCUdTdT			UGAACUAU GUCdTdT	UCAAGUUU UCU	
AD-887145	A-1683564.1	214	ACAUAGUU CAAGUUUU CUUdTdT	A-1683565.1	514	AAGAAAAC UUGAACUA UGUdTdT	ACAUAGUU CAAGUUUU CUU	2964
AD-887146	A-1683566.1	215	CAUAGUUC AAGUUUUC UUGdTdT	A-1683567.1	515	CAAGAAAA CUUGAACU AUGdTdT	CAUAGUUC AAGUUUUC UUG	2965
AD-887147	A-1683568.1	216	AUAGUUCA AGUUUUCU UGUdTdT	A-1683569.1	516	ACAAGAAA ACUUGAAC UAUdTdT	AUAGUUCA AGUUUUCU UGU	2966
AD-887148	A-1683570.1	217	UAGUUCAA GUUUUCUU GUGdTdT	A-1683571.1	517	CACAAGAA AACUUGAA CUAdTdT	UAGUUCAA GUUUUCUU GUG	2967
AD-887149	A-1683572.1	218	AGUUCAAG UUUUCUUG UGAdTdT	A-1683573.1	518	UCACAAGA AAACUUGA ACUdTdT	AGUUCAAG UUUUCUUG UGA	2968
AD-887150	A-1683574.1	219	GUUCAAGU UUUCUUGU GAUdTdT	A-1683575.1	519	AUCACAAG AAAACUUG AACdTdT	GUUCAAGU UUUCUUGU GAU	2969
AD-887151	A-1683576.1	220	UUCAAGUU UUCUUGUG AUUdTdT	A-1683577.1	520	AAUCACAA GAAAACUU GAAdTdT	UUCAAGUU UUCUUGUG AUU	2970

AD-887152	A-1683578.1	221	UCAAGUUU UCUUGUGA UUUdTdT	A-1683579.1	521	AAAUCACA AGAAAACU UGAdTdT	UCAAGUUU UCUUGUGA UUU	2971
AD-887153	A-1683580.1	222	CAAGUUUU CUUGUGAU UUGdTdT	A-1683581.1	522	CAAAUCAC AAGAAAAC UUGdTdT	CAAGUUUU CUUGUGAU UUG	2972
AD-887154	A-1683582.1	223	AAGUUUUC UUGUGAUU UGGdTdT	A-1683583.1	523	CCAAAUCA CAAGAAAA CUUdTdT	AAGUUUUC UUGUGAUU UGG	2973
AD-887155	A-1683584.1	224	AGUUUUCU UGUGAUUU GGGdTdT	A-1683585.1	524	CCCAAUC ACAAGAAA ACUdTdT	AGUUUUCU UGUGAUUU GGG	2974
AD-887156	A-1683586.1	225	GUUUUCUU GUGAUUUG GGGdTdT	A-1683587.1	525	CCCCAAUC ACAAGAAA ACdTdT	GUUUUCUU GUGAUUUG GGG	2975
AD-887157	A-1683588.1	226	UGUGAUUU GGGGCAAA AGCdTdT	A-1683589.1	526	GCUUUUGC CCCAAUC ACAdTdT	UGUGAUUU GGGGCAAA AGC	2976
AD-887158	A-1683590.1	227	GUGAUUUG GGGCAAAA GCUdTdT	A-1683591.1	527	AGCUUUUG CCCCAAUC ACdTdT	GUGAUUUG GGGCAAAA GCU	2977
AD-887159	A-1683592.1	228	UGAUUUGG GGCAAAAG	A-1683593.1	528	CAGCUUUU GCCCCAAA	UGAUUUGG GGCAAAAG	2978

			CUGdTdT			UCAdTdT	CUG	
AD-887160	A-1683594.1	229	UAGUUUCU UCCUGAAA ACCdTdT	A-1683595.1	529	GGUUUUCA GGAAGAAA CUAdTdT	UAGUUUCU UCCUGAAA ACC	2979
AD-887161	A-1683596.1	230	AGUUUCUU CCUGAAAA CCAdTdT	A-1683597.1	530	UGGUUUUC AGGAAGAA ACUdTdT	AGUUUCUU CCUGAAAA CCA	2980
AD-887162	A-1683598.1	231	GUUUCUUC CUGAAAAC CAUdTdT	A-1683599.1	531	AUGGUUUU CAGGAAGA AACdTdT	GUUUCUUC CUGAAAAC CAU	2981
AD-887163	A-1683600.1	232	UUUCUUCC UGAAAACC AUUdTdT	A-1683601.1	532	AAUGGUUU UCAGGAAG AAAdTdT	UUUCUUCC UGAAAACC AUU	2982
AD-887164	A-1683602.1	233	UUCUUCCU GAAAACCA UUGdTdT	A-1683603.1	533	CAAUGGUU UUCAGGAA GAAdTdT	UUCUUCCU GAAAACCA UUG	2983
AD-887165	A-1683604.1	234	UCUUCCUG AAAACCAU UGCdTdT	A-1683605.1	534	GCAAUGGU UUUCAGGA AGAdTdT	UCUUCCUG AAAACCAU UGC	2984
AD-887166	A-1683606.1	235	CUUCCUGA AAACCAUU GCUdTdT	A-1683607.1	535	AGCAAUGG UUUUCAGG AAGdTdT	CUUCCUGA AAACCAUU GCU	2985
AD-887167	A-1683608.1	236	UUCCUGAA	A-1683609.1	536	GAGCAAUG	UUCCUGAA	2986

			AACCAUUG CUCdTdT			GUUUUCAG GAAdTdT	AACCAUUG CUC	
AD-887168	A-1683610.1	237	UCCUGAAA ACCAUUGC UCUdTdT	A-1683611.1	537	AGAGCAAU GGUUUUCA GGAdTdT	UCCUGAAA ACCAUUGC UCU	2987
AD-887169	A-1683612.1	238	CCUGAAAA CCAUUGCU CUUdTdT	A-1683613.1	538	AAGAGCAA UGGUUUUC AGGdTdT	CCUGAAAA CCAUUGCU CUU	2988
AD-887170	A-1683614.1	239	CUGAAAAC CAUUGCUC UUGdTdT	A-1683615.1	539	CAAGAGCA AUGGUUUU CAGdTdT	CUGAAAAC CAUUGCUC UUG	2989
AD-887171	A-1683616.1	240	AACCAUUG CUCUUGCA UGUdTdT	A-1683617.1	540	ACAUGCAA GAGCAAUG GUUdTdT	AACCAUUG CUCUUGCA UGU	2990
AD-887172	A-1683618.1	241	CCAUUGCU CUUGCAUG UUAdTdT	A-1683619.1	541	UAACAUGC AAGAGCAA UGGdTdT	CCAUUGCU CUUGCAUG UUA	2991
AD-887173	A-1683620.1	242	CAUUGCUC UUGCAUGU UACdTdT	A-1683621.1	542	GUAACAUG CAAGAGCA AUGdTdT	CAUUGCUC UUGCAUGU UAC	2992
AD-887174	A-1683622.1	243	AUUGCUCU UGCAUGUU ACAdTdT	A-1683623.1	543	UGUAACAU GCAAGAGC AAUdTdT	AUUGCUCU UGCAUGUU ACA	2993

AD-887175	A-1683624.1	244	UUGCUCUU GCAUGUUA CAUdTdT	A-1683625.1	544	AUGUAACA UGCAAGAG CAAdTdT	UUGCUCUU GCAUGUUA CAU	2994
AD-887176	A-1683626.1	245	UGCUCUUG CAUGUUAC AUGdTdT	A-1683627.1	545	CAUGUAAC AUGCAAGA GCAdTdT	UGCUCUUG CAUGUUAC AUG	2995
AD-887177	A-1683628.1	246	GCUCUUGC AUGUUACA UGGdTdT	A-1683629.1	546	CCAUGUAA CAUGCAAG AGCdTdT	GCUCUUGC AUGUUACA UGG	2996
AD-887178	A-1683630.1	247	CUCUUGCA UGUUACAU GGUdTdT	A-1683631.1	547	ACCAUGUA ACAUGCAA GAGdTdT	CUCUUGCA UGUUACAU GGU	2997
AD-887179	A-1683632.1	248	UCUUGCAU GUUACAUG GUUdTdT	A-1683633.1	548	AACCAUGU AACAUGCA AGAdTdT	UCUUGCAU GUUACAUG GUU	2998
AD-887180	A-1683634.1	249	CUUGCAUG UUACAUGG UUAdTdT	A-1683635.1	549	UAACCAUG UAACAUGC AAGdTdT	CUUGCAUG UUACAUGG UUA	2999
AD-887181	A-1683636.1	250	UUGCAUGU UACAUGGU UACdTdT	A-1683637.1	550	GUAACCAU GUAACAUG CAAdTdT	UUGCAUGU UACAUGGU UAC	3000
AD-887182	A-1683638.1	251	UGCAUGUU ACAUGGUU	A-1683639.1	551	GGUAACCA UGUAACAU	UGCAUGUU ACAUGGUU	3001

			ACCdTdT			GCAdTdT	ACC	
AD-887183	A-1683640.1	252	GCAUGUUA CAUGGUUA CCAdTdT	A-1683641.1	552	UGGUAACC AUGUAACA UGCdTdT	GCAUGUUA CAUGGUUA CCA	3002
AD-887184	A-1683642.1	253	AUGUUACA UGGUUACC ACAdTdT	A-1683643.1	553	UGUGGUAA CCAUGUAA CAUdTdT	AUGUUACA UGGUUACC ACA	3003
AD-887185	A-1683644.1	254	UGUUACAU GGUUACCA CAAdTdT	A-1683645.1	554	UUGUGGUA ACCAUGUA ACAdTdT	UGUUACAU GGUUACCA CAA	3004
AD-887186	A-1683646.1	255	UGGUUACC ACAAGCCA CAAdTdT	A-1683647.1	555	UUGUGGCU UGUGGUAA CCAdTdT	UGGUUACC ACAAGCCA CAA	3005
AD-887187	A-1683648.1	256	GGUUACCA CAAGCCAC AAUdTdT	A-1683649.1	556	AUUGUGGC UUGUGGUA ACCdTdT	GGUUACCA CAAGCCAC AAU	3006
AD-887188	A-1683650.1	257	GUUACCAC AAGCCACA AUAdTdT	A-1683651.1	557	UAUUGUGG CUUGUGGU AACdTdT	GUUACCAC AAGCCACA AUA	3007
AD-887189	A-1683652.1	258	AAAAGCAU AACUUCUA AAGdTdT	A-1683653.1	558	CUUUAGAA GUUAUGCU UUUdTdT	AAAAGCAU AACUUCUA AAG	3008
AD-887190	A-1683654.1	259	AAAGCAUA	A-1683655.1	559	CCUUUAGA	AAAGCAUA	3009

			ACUUCUAA AGGdTdT			AGUUAUGC UUUdTdT	ACUUCUAA AGG	
AD-887191	A-1683656.1	260	AAGCAUAA CUUCUAAA GGAdTdT	A-1683657.1	560	UCCUUUAG AAGUUAUG CUUdTdT	AAGCAUAA CUUCUAAA GGA	3010
AD-887192	A-1683658.1	261	AGCAUAAC UUCUAAAG GAAdTdT	A-1683659.1	561	UUCCUUUA GAAGUUAU GCUdTdT	AGCAUAAC UUCUAAAG GAA	3011
AD-887193	A-1683660.1	262	GCAUAACU UCUAAAGG AAGdTdT	A-1683661.1	562	CUUCCUUU AGAAGUUA UGCdTdT	GCAUAACU UCUAAAGG AAG	3012
AD-887194	A-1683662.1	263	CAUAACUU CUAAAGGA AGCdTdT	A-1683663.1	563	GCUUCCUU UAGAAGUU AUGdTdT	CAUAACUU CUAAAGGA AGC	3013
AD-887195	A-1683664.1	264	AUAACUUC UAAAGGAA GCAdTdT	A-1683665.1	564	UGCUUCCU UUAGAAGU UAUdTdT	AUAACUUC UAAAGGAA GCA	3014
AD-887196	A-1683666.1	265	ACUUCUAA AGGAAGCA GAAdTdT	A-1683667.1	565	UUCUGCUU CCUUUAGA AGUdTdT	ACUUCUAA AGGAAGCA GAA	3015
AD-887197	A-1683668.1	266	UUCUAAAG GAAGCAGA AUAdTdT	A-1683669.1	566	UAUUCUGC UUCCUUUA GAAdTdT	UUCUAAAG GAAGCAGA AUA	3016

AD-887198	A-1683670.1	267	UCUAAAGG AAGCAGAA UAGdTdT	A-1683671.1	567	CUAUUCUG CUUCCUUU AGAdTdT	UCUAAAGG AAGCAGAA UAG	3017
AD-887199	A-1683672.1	268	CUAAAGGA AGCAGAAU AGCdTdT	A-1683673.1	568	GCUAUUCU GCUUCCUU UAGdTdT	CUAAAGGA AGCAGAAU AGC	3018
AD-887200	A-1683674.1	269	AAAGGAAG CAGAAUAG CUCdTdT	A-1683675.1	569	GAGCUAUU CUGCUUCC UUUdTdT	AAAGGAAG CAGAAUAG CUC	3019
AD-887201	A-1683676.1	270	AUAAGUAA GAUGCAUU UACdTdT	A-1683677.1	570	GUAAAUGC AUCUUACU UAUdTdT	AUAAGUAA GAUGCAUU UAC	3020
AD-887202	A-1683678.1	271	UAAGUAAG AUGCAUUU ACUdTdT	A-1683679.1	571	AGUAAAUG CAUCUUAC UUAdTdT	UAAGUAAG AUGCAUUU ACU	3021
AD-887203	A-1683680.1	272	AAGUAAGA UGCAUUUA CUAdTdT	A-1683681.1	572	UAGUAAAU GCAUCUUA CUUdTdT	AAGUAAGA UGCAUUUA CUA	3022
AD-887204	A-1683682.1	273	AGUAAGAU GCAUUUAC UACdTdT	A-1683683.1	573	GUAGUAAA UGCAUCUU ACUdTdT	AGUAAGAU GCAUUUAC UAC	3023
AD-887205	A-1683684.1	274	GUAAGAUG CAUUUACU	A-1683685.1	574	UGUAGUAA AUGCAUCU	GUAAGAUG CAUUUACU	3024

			ACAdTdT			UACdTdT	ACA	
AD-887206	A-1683686.1	275	UAAGAUGC AUUUACUA CAGdTdT	A-1683687.1	575	CUGUAGUA AAUGCAUC UUAAdTdT	UAAGAUGC AUUUACUA CAG	3025
AD-887207	A-1683688.1	276	UUGGCUUC UAAUGCUU CAGdTdT	A-1683689.1	576	CUGAAGCA UUAGAAGC CAAdTdT	UUGGCUUC UAAUGCUU CAG	3026
AD-887208	A-1683690.1	277	UGGCUUCU AAUGCUUC AGAdTdT	A-1683691.1	577	UCUGAAGC AUUAGAAG CCAdTdT	UGGCUUCU AAUGCUUC AGA	3027
AD-887209	A-1683692.1	278	GGCUUCUA AUGCUUCA GAUdTdT	A-1683693.1	578	AUCUGAAG CAUUAGAA GCCdTdT	GGCUUCUA AUGCUUCA GAU	3028
AD-887210	A-1683694.1	279	GCUUCUAA UGCUUCAG AUAdTdT	A-1683695.1	579	UAUCUGAA GCAUUAGA AGCdTdT	GCUUCUAA UGCUUCAG AUA	3029
AD-887211	A-1683696.1	280	UCUAAUGC UUCAGAU GAAdTdT	A-1683697.1	580	UUCUAUCU GAAGCAUU AGAdTdT	UCUAAUGC UUCAGAU GAA	3030
AD-887212	A-1683698.1	281	CUAAUGCU UCAGAUAG AAUdTdT	A-1683699.1	581	AUUCUAUC UGAAGCAU UAGdTdT	CUAAUGCU UCAGAUAG AAU	3031
AD-887213	A-1683700.1	282	UAAUGCUU	A-1683701.1	582	UAUUCUAU	UAAUGCUU	3032

			CAGAUAGA AUAdTdT			CUGAAGCA UUAdTdT	CAGAUAGA AUA	
AD-887214	A-1683702.1	283	AAUGCUUC AGAUAGAA UACdTdT	A-1683703.1	583	GUAUUCUA UCUGAAGC AUUdTdT	AAUGCUUC AGAUAGAA UAC	3033
AD-887215	A-1683704.1	284	AUGCUUCA GAUAGAAU ACAdTdT	A-1683705.1	584	UGUAUUCU AUCUGAAG CAUdTdT	AUGCUUCA GAUAGAAU ACA	3034
AD-887216	A-1683706.1	285	UGCUUCAG AUAGAAUA CAGdTdT	A-1683707.1	585	CUGUAUUC UAUCUGAA GCAdTdT	UGCUUCAG AUAGAAUA CAG	3035
AD-887217	A-1683708.1	286	GCUUCAGA UAGAAUAC AGUdTdT	A-1683709.1	586	ACUGUAUU CUAUCUGA AGCdTdT	GCUUCAGA UAGAAUAC AGU	3036
AD-887218	A-1683710.1	287	CUUCAGAU AGAAUACA GUUdTdT	A-1683711.1	587	AACUGUAU UCUAUCUG AAGdTdT	CUUCAGAU AGAAUACA GUU	3037
AD-887219	A-1683712.1	288	UUCAGAU GAAUACAG UUGdTdT	A-1683713.1	588	CAACUGUA UUCUAUCU GAAdTdT	UUCAGAU GAAUACAG UUG	3038
AD-887220	A-1683714.1	289	UCAGAUAG AAUACAGU UGGdTdT	A-1683715.1	589	CCAACUGU AUUCUAUC UGAdTdT	UCAGAUAG AAUACAGU UGG	3039

AD-887221	A-1683716.1	290	CAGAUAGA AUACAGUU GGGdTdT	A-1683717.1	590	CCCAACUG UAUUCUAU CUGdTdT	CAGAUAGA AUACAGUU GGG	3040
AD-887222	A-1683718.1	291	CAUUGUGA AAUAAAAU UUUdTdT	A-1683719.1	591	AAAAUUUU AUUUCACA AUGdTdT	CAUUGUGA AAUAAAAU UUU	3041
AD-887223	A-1683720.1	292	AUUGUGAA AUAAAAUU UUCdTdT	A-1683721.1	592	GAAAAUUU UAUUUCAC AAUdTdT	AUUGUGAA AUAAAAUU UUC	3042
AD-887224	A-1683722.1	293	UUGUGAAA UAAAAUUU UCUdTdT	A-1683723.1	593	AGAAAAUU UUAUUUCA CAAdTdT	UUGUGAAA UAAAAUUU UCU	3043
AD-887225	A-1683724.1	294	UGUGAAAU AAAAUUUU CUUdTdT	A-1683725.1	594	AAGAAAAU UUUAUUUC ACAdTdT	UGUGAAAU AAAAUUUU CUU	3044
AD-887226	A-1683726.1	295	GUGAAUA AAAUUUUC UUAdTdT	A-1683727.1	595	UAAGAAAA UUUUAUUU CACdTdT	GUGAAUA AAAUUUUC UUA	3045
AD-887227	A-1683728.1	296	UGAAAUAA AAUUUUCU UACdTdT	A-1683729.1	596	GUAAGAAA AUUUUAUU UCAdTdT	UGAAAUAA AAUUUUCU UAC	3046
AD-887228	A-1683730.1	297	GAAAUAAA AUUUUCUU	A-1683731.1	597	GGUAAGAA AAUUUUAU	GAAAUAAA AUUUUCUU	3047

			ACCdTdT			UUCdTdT	ACC	
AD-887229	A-1683732.1	298	AAAUAAAA UUUUCUUA CCCdTdT	A-1683733.1	598	GGGUAAGA AAAUUUUA UUUdTdT	AAAUAAAA UUUUCUUA CCC	3048
AD-887230	A-1683734.1	299	AAUAAAAU UUUCUUAC CCAdTdT	A-1683735.1	599	UGGGUAAG AAAAUUUU AUUdTdT	AAUAAAAU UUUCUUAC CCA	3049
AD-887231	A-1683736.1	300	AUAAAAUU UUCUUACC CAAdTdT	A-1683737.1	600	UUGGGUAA GAAAAUUU UAUdTdT	AUAAAAUU UUCUUACC CAA	3050

Таблица 2В

Иллюстративные немодифицированные последовательности одиночных цепей и дуплексов миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	Название последовательности смысловой цепи	SEQ ID NO: (смысловая цепь)	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	Название антисмысловой последовательности	SEQ ID NO: (антисмысловая цепь)	Последовательность антисмысловой цепи	диапазоны миРНК-мишени
AD-886932	A-1683138.1	601	CAGUCCCAAUG AAUCCAGC	A-1683139.1	901	GCUGGAUUCAU GGGACUG	239-257
AD-886933	A-1683140.1	602	AGUCCCAAUGA AUCCAGCU	A-1683141.1	902	AGCUGGAUUCAU UGGGACU	240-258
AD-886934	A-1683142.1	603	GUCCCAAUGAA UCCAGCUG	A-1683143.1	903	CAGCUGGAUUCA UUGGGAC	241-259
AD-886935	A-1683144.1	604	CCAUGUCAGUC AUCCAUA	A-1683145.1	904	UUAUGGAUGACU GACAUGG	277-295
AD-886936	A-1683146.1	605	AUGUCAGUCAU CCAUAACU	A-1683147.1	905	AGUUAUGGAUGA CUGACAU	279-297
AD-886937	A-1683148.1	606	GCUGGAAACCC AAACCAGA	A-1683149.1	906	UCUGGUUUGGGU UUCCAGC	467-485
AD-886938	A-1683150.1	607	AAACCCAAACC AGAGAGUU	A-1683151.1	907	AACUCUCUGGUU UGGGUUU	472-490
AD-886939	A-1683152.1	608	AACCCAAACCA GAGAGUUG	A-1683153.1	908	CAACUCUCUGGU UUGGGUU	473-491

AD-886940	A-1683154.1	609	CCGAGACAAGU CAGUUCUG	A-1683155.1	909	CAGAACUGACUU GUCUCGG	515-533
AD-886941	A-1683156.1	610	GAGACAAGUCA GUUCUGGA	A-1683157.1	910	UCCAGAACUGAC UUGUCUC	517-535
AD-886942	A-1683158.1	611	AGACAAGUCAG UUCUGGAG	A-1683159.1	911	CUCCAGAACUGA CUUGUCU	518-536
AD-886943	A-1683160.1	612	CAGUUCUGGAG GAAGAGAA	A-1683161.1	912	UUCUCUUCCUCC AGAACUG	526-544
AD-886944	A-1683162.1	613	AGUUCUGGAGG AAGAGAAG	A-1683163.1	913	CUUCUCUUCCUC CAGAAACU	527-545
AD-886945	A-1683164.1	614	UCUGGAGGAAG AGAAGAAG	A-1683165.1	914	CUUCUUCUCUUC CUCCAGA	530-548
AD-886946	A-1683166.1	615	AGGCUCCAGAG AAGUUUCU	A-1683167.1	915	AGAAACUUCUCU GGAGCCU	668-686
AD-886947	A-1683168.1	616	GGCUCCAGAGA AGUUUCUA	A-1683169.1	916	UAGAAACUUCUC UGGAGCC	669-687
AD-886948	A-1683170.1	617	GCUCCAGAGAA GUUUCUAC	A-1683171.1	917	GUAGAAACUUCU CUGGAGC	670-688
AD-886949	A-1683172.1	618	CUCCAGAGAAG UUUCUACG	A-1683173.1	918	CGUAGAAACUUC UCUGGAG	671-689
AD-886950	A-1683174.1	619	UGAAGUCCGAG CUAACUGA	A-1683175.1	919	UCAGUUAGCUCG GACUUCA	721-739

AD-886951	A-1683176.1	620	GUCCGAGCUAA CUGAAGUU	A-1683177.1	920	AACUUCAGUUAG CUCGGAC	725-743
AD-886952	A-1683178.1	621	UCCGAGCUAAC UGAAGUUC	A-1683179.1	921	GAACUUCAGUUA GCUCGGA	726-744
AD-886953	A-1683180.1	622	CCGAGCUAACU GAAGUUCC	A-1683181.1	922	GGAACUUCAGUU AGCUCGG	727-745
AD-886954	A-1683182.1	623	CGAGCUAACUG AAGUUCCU	A-1683183.1	923	AGGAACUUCAGU UAGCUCG	728-746
AD-886955	A-1683184.1	624	GAGCUAACUGA AGUUCCUG	A-1683185.1	924	CAGGAACUUCAG UUAGCUC	729-747
AD-886956	A-1683186.1	625	AGCUAACUGAA GUUCCUGC	A-1683187.1	925	GCAGGAACUUCA GUUAGCU	730-748
AD-886957	A-1683188.1	626	GCUAACUGAAG UUCCUGCU	A-1683189.1	926	AGCAGGAACUUC AGUUAGC	731-749
AD-886958	A-1683190.1	627	GUUCCUGCUUC CCGAAUUU	A-1683191.1	927	AAAUUCGGGAAG CAGGAAC	741-759
AD-886959	A-1683192.1	628	UUCCUGCUUCC CGAAUUUU	A-1683193.1	928	AAAAUUCGGGAA GCAGGAA	742-760
AD-886960	A-1683194.1	629	UCCUGCUUCCC GAAUUUUG	A-1683195.1	929	CAAAAUUCGGGA AGCAGGA	743-761
AD-886961	A-1683196.1	630	CCUGCUUCCCG AAUUUUGA	A-1683197.1	930	UCAAAAUUCGGG AAGCAGG	744-762

AD-886962	A-1683198.1	631	CUGCUUCCCGA AUUUUGAA	A-1683199.1	931	UUCAAAAUUCGG GAAGCAG	745-763
AD-886963	A-1683200.1	632	UGCUUCCCGAA UUUUGAAG	A-1683201.1	932	CUUCAAAAUUCG GGAAGCA	746-764
AD-886964	A-1683202.1	633	GCUUCCCGAAU UUUGAAGG	A-1683203.1	933	CCUUCAAAAUUC GGGAAGC	747-765
AD-886965	A-1683204.1	634	CUUCCCGAAUU UUGAAGGA	A-1683205.1	934	UCCUUCAAAAUU CGGGAAG	748-766
AD-886966	A-1683206.1	635	UUCCCGAAUUU UGAAGGAG	A-1683207.1	935	CUCCUUCAAAAU UCGGGAA	749-767
AD-886967	A-1683208.1	636	UCCCGAAUUUU GAAGGAGA	A-1683209.1	936	UCUCCUUCAAAA UUCGGGA	750-768
AD-886968	A-1683210.1	637	CCCGAAUUUUG AAGGAGAG	A-1683211.1	937	CUCUCCUUCAAA AUUCGGG	751-769
AD-886969	A-1683212.1	638	CGGAUGUGGAG AACUAGUU	A-1683213.1	938	AACUAGUUCUCC ACAUCCG	806-824
AD-886970	A-1683214.1	639	GGAUGUGGAG AACUAGUUU	A-1683215.1	939	AAACUAGUUCUC CACAUC	807-825
AD-886971	A-1683216.1	640	GAUGUGGAGA ACUAGUUUG	A-1683217.1	940	CAAACUAGUUCU CCACAUC	808-826
AD-886972	A-1683218.1	641	AUGUGGAGAAC UAGUUUGG	A-1683219.1	941	CCAAACUAGUUC UCCACAU	809-827

AD-886973	A-1683220.1	642	UGUGGAGAACU AGUUUGGG	A-1683221.1	942	CCCAAACUAGUU CUCCACA	810-828
AD-886974	A-1683222.1	643	GUGGAGAACUA GUUUGGGU	A-1683223.1	943	ACCCAAACUAGU UCUCCAC	811-829
AD-886975	A-1683224.1	644	UGGAGAACUAG UUUGGGUA	A-1683225.1	944	UACCCAAACUAG UUCUCCA	812-830
AD-886976	A-1683226.1	645	GGAGAACUAGU UUGGGUAG	A-1683227.1	945	CUACCCAAACUA GUUCUCC	813-831
AD-886977	A-1683228.1	646	GAGAACUAGUU UGGGUAGG	A-1683229.1	946	CCUACCCAAACU AGUUCUC	814-832
AD-886978	A-1683230.1	647	ACGCUGAGAAC AGCAGAAA	A-1683231.1	947	UUUCUGCUGUUC UCAGCGU	843-861
AD-886979	A-1683232.1	648	GCUGAGAACAG CAGAAACA	A-1683233.1	948	UGUUUCUGCUGU UCUCAGC	845-863
AD-886980	A-1683234.1	649	CUGAGAACAGC AGAAACAA	A-1683235.1	949	UUGUUUCUGCUG UUCUCAG	846-864
AD-886981	A-1683236.1	650	UGAGAACAGCA GAAACAAU	A-1683237.1	950	AUUGUUUCUGCU GUUCUCA	847-865
AD-886982	A-1683238.1	651	GAGAACAGCAG AAACAAUU	A-1683239.1	951	AAUUGUUUCUGC UGUUCUC	848-866
AD-886983	A-1683240.1	652	AGAACAGCAGA AACAAUUA	A-1683241.1	952	UAAUUGUUUCUG CUGUUCU	849-867

AD-886984	A-1683242.1	653	GAACAGCAGAA ACAAUUAC	A-1683243.1	953	GUAAUUGUUUCU GCUGUUC	850-868
AD-886985	A-1683244.1	654	AACAGCAGAAA CAAUUACU	A-1683245.1	954	AGUAAUUGUUUC UGCUGUU	851-869
AD-886986	A-1683246.1	655	ACAGCAGAAAC AAUUACUG	A-1683247.1	955	CAGUAAUUGUUU CUGCUGU	852-870
AD-886987	A-1683248.1	656	CAGCAGAAACA AUUACUGG	A-1683249.1	956	CCAGUAAUUGUU UCUGCUG	853-871
AD-886988	A-1683250.1	657	AGCAGAAACAA UUACUGGC	A-1683251.1	957	GCCAGUAAUUGU UUCUGCU	854-872
AD-886989	A-1683252.1	658	GCAGAAACAAU UACUGGCA	A-1683253.1	958	UGCCAGUAAUUG UUUCUGC	855-873
AD-886990	A-1683254.1	659	CAGAAACAAUU ACUGGCAA	A-1683255.1	959	UUGCCAGUAAUU GUUUCUG	856-874
AD-886991	A-1683256.1	660	AGAAACAAUUA CUGGCAAG	A-1683257.1	960	CUUGCCAGUAAU UGUUUCU	857-875
AD-886992	A-1683258.1	661	GAAACAAUUAC UGGCAAGU	A-1683259.1	961	ACUUGCCAGUAA UUGUUUC	858-876
AD-886993	A-1683260.1	662	AACAAUUACUG GCAAGUAU	A-1683261.1	962	AUACUUGCCAGU AAUUGUU	860-878
AD-886994	A-1683262.1	663	ACAAUUACUGG CAAGUAUG	A-1683263.1	963	CAUACUUGCCAG UAAUUGU	861-879

AD-886995	A-1683264.1	664	CAAUUACUGGC AAGUAUGG	A-1683265.1	964	CCAUACUUGCCA GUAAUUG	862-880
AD-886996	A-1683266.1	665	AAUUACUGGCA AGUAUGGU	A-1683267.1	965	ACCAUACUUGCC AGUAAUU	863-881
AD-886997	A-1683268.1	666	UACUGGCAAGU AUGGUGUG	A-1683269.1	966	CACACCAUACUU GCCAGUA	866-884
AD-886998	A-1683270.1	667	AUGUCCGCCAG GUUUUUGA	A-1683271.1	967	UCAAAAACCUGG CGGACAU	958-976
AD-886999	A-1683272.1	668	UGUCCGCCAGG UUUUUGAG	A-1683273.1	968	CUCAAAAACCUG GCGGACA	959-977
AD-887000	A-1683274.1	669	GUCCGCCAGGU UUUUGAGU	A-1683275.1	969	ACUCAAAAACCU GGCGGAC	960-978
AD-887001	A-1683276.1	670	UCCGCCAGGUU UUUGAGUA	A-1683277.1	970	UACUCAAAAACC UGGCGGA	961-979
AD-887002	A-1683278.1	671	CCGCCAGGUUU UUGAGUAU	A-1683279.1	971	AUACUCAAAAAC CUGGCGG	962-980
AD-887003	A-1683280.1	672	CGCCAGGUUUU UGAGUAUG	A-1683281.1	972	CAUACUCAAAAA CCUGGCG	963-981
AD-887004	A-1683282.1	673	GCCAGGUUUUU GAGUAUGA	A-1683283.1	973	UCAUACUCAAAA ACCUGGC	964-982
AD-887005	A-1683284.1	674	CCAGGUUUUUG AGUAUGAC	A-1683285.1	974	GUCAUACUCAAA AACCUGG	965-983

AD-887006	A-1683286.1	675	CAGGUUUUGA GUAUGACC	A-1683287.1	975	GGUCAUACUCAA AAACCUG	966-984
AD-887007	A-1683288.1	676	AGGUUUUUGA GUAUGACCU	A-1683289.1	976	AGGUCAUACUCA AAAACCU	967-985
AD-887008	A-1683290.1	677	GGUUUUUGAG UAUGACCUC	A-1683291.1	977	GAGGUCAUACUC AAAAACC	968-986
AD-887009	A-1683292.1	678	GUUUUUGAGU AUGACCUC	A-1683293.1	978	UGAGGUCAUACU CAAAAAC	969-987
AD-887010	A-1683294.1	679	GACCUCAUCAG CCAGUUUA	A-1683295.1	979	UAAACUGGCUGA UGAGGUC	981-999
AD-887011	A-1683296.1	680	ACCUCAUCAGC CAGUUUAU	A-1683297.1	980	AUAAACUGGCUG AUGAGGU	982-1000
AD-887012	A-1683298.1	681	CCUCAUCAGCC AGUUUAUG	A-1683299.1	981	CAUAAACUGGCU GAUGAGG	983-1001
AD-887013	A-1683300.1	682	CUCAUCAGCCA GUUUAUGC	A-1683301.1	982	GCAUAAACUGGC UGAUGAG	984-1002
AD-887014	A-1683302.1	683	UCAUCAGCCAG UUUAUGCA	A-1683303.1	983	UGCAUAAACUGG CUGAUGA	985-1003
AD-887015	A-1683304.1	684	UCAGCCAGUUU AUGCAGGG	A-1683305.1	984	CCCUGCAUAAAC UGGCUGA	988-1006
AD-887016	A-1683306.1	685	GGCUACCCUUC UAAGGUUC	A-1683307.1	985	GAACCUUAGAAG GGUAGCC	1005-1023

AD-887017	A-1683308.1	686	GCUACCCUUCU AAGGUUCA	A-1683309.1	986	UGAACCUUAGAA GGGUAGC	1006- 1024
AD-887018	A-1683310.1	687	CUACCCUUCUA AGGUUCAC	A-1683311.1	987	GUGAACCUUAGA AGGGUAG	1007- 1025
AD-887019	A-1683312.1	688	UACCCUUCUAA GGUUCACA	A-1683313.1	988	UGUGAACCUUAG AAGGGUA	1008- 1026
AD-887020	A-1683314.1	689	ACCCUUCUAAG GUUCACAU	A-1683315.1	989	AUGUGAACCUUA GAAGGGU	1009- 1027
AD-887021	A-1683316.1	690	CCCUUCUAAGG UUCACAU	A-1683317.1	990	UAUGUGAACCUU AGAAGGG	1010- 1028
AD-887022	A-1683318.1	691	CCUUCUAAGGU UCACAUAC	A-1683319.1	991	GUAUGUGAACCU UAGAAGG	1011- 1029
AD-887023	A-1683320.1	692	CUUCUAAGGUU CACAUACU	A-1683321.1	992	AGUAUGUGAACC UUAGAAG	1012- 1030
AD-887024	A-1683322.1	693	UUCUAAGGUUC ACAUACUG	A-1683323.1	993	CAGUAUGUGAAC CUUAGAA	1013- 1031
AD-887025	A-1683324.1	694	CUAAGGUUCAC AUACUGCC	A-1683325.1	994	GGCAGUAUGUGA ACCUUAG	1015- 1033
AD-887026	A-1683326.1	695	UAAGGUUCACA UACUGCCU	A-1683327.1	995	AGGCAGUAUGUG AACCUUA	1016- 1034
AD-887027	A-1683328.1	696	GAGUCCAGAAC UGUCAUAA	A-1683329.1	996	UUAUGACAGUUC UGGACUC	1095- 1113

AD-887028	A-1683330.1	697	AGUCCAGAACU GUCAUAAG	A-1683331.1	997	CUUAUGACAGUU CUGGACU	1096- 1114
AD-887029	A-1683332.1	698	GUCCAGAACUG UCAUAAGA	A-1683333.1	998	UCUUAUGACAGU UCUGGAC	1097- 1115
AD-887030	A-1683334.1	699	UCCAGAACUGU CAUAAGAU	A-1683335.1	999	AUCUUAUGACAG UUCUGGA	1098- 1116
AD-887031	A-1683336.1	700	CCAGAACUGUC AUAAGAU	A-1683337.1	1000	UAUCUUAUGACA GUUCUGG	1099- 1117
AD-887032	A-1683338.1	701	CAGAACUGUCA UAAGAU	A-1683339.1	1001	AUAUCUUAUGAC AGUUCUG	1100- 1118
AD-887033	A-1683340.1	702	AGAACUGUCAU AAGAU	A-1683341.1	1002	CAUAUCUUAUGA CAGUUCU	1101- 1119
AD-887034	A-1683342.1	703	GAACUGUCAUA AGAU	A-1683343.1	1003	UCAUAUCUUAUG ACAGUUC	1102- 1120
AD-887035	A-1683344.1	704	AACUGUCAUAA GAUAUGAG	A-1683345.1	1004	CUCAUAUCUUAU GACAGUU	1103- 1121
AD-887036	A-1683346.1	705	ACUGUCAUAAG AUAUGAGC	A-1683347.1	1005	GCUCAUAUCUUA UGACAGU	1104- 1122
AD-887037	A-1683348.1	706	CUGUCAUAAGA UAUGAGCU	A-1683349.1	1006	AGCUCAUAUCUU AUGACAG	1105- 1123
AD-887038	A-1683350.1	707	UGUCAUAAGAU AUGAGCUG	A-1683351.1	1007	CAGCUCAUAUCU UAUGACA	1106- 1124

AD-887039	A-1683352.1	708	GUCAUAAGAU UGAGCUGA	A-1683353.1	1008	UCAGCUCAUAUC UUAUGAC	1107- 1125
AD-887040	A-1683354.1	709	AAGAU AUGAGC UGAAUACC	A-1683355.1	1009	GGUAUUCAGCUC AUAUCUU	1112- 1130
AD-887041	A-1683356.1	710	UGAAUACCGAG ACAGUGAA	A-1683357.1	1010	UUCACUGUCUCG GUAUUCA	1123- 1141
AD-887042	A-1683358.1	711	UGAAGGCUGAG AAGGAAAU	A-1683359.1	1011	AUUUCCUUCUCA GCCUUCA	1138- 1156
AD-887043	A-1683360.1	712	GGCUGAGAAGG AAAUCCCU	A-1683361.1	1012	AGGGAUUUCCUU CUCAGCC	1142- 1160
AD-887044	A-1683362.1	713	CGGACAGUUC CGUAUUCU	A-1683363.1	1013	AGAAUACGGGAA CUGUCCG	1175- 1193
AD-887045	A-1683364.1	714	GGACAGUUCCC GUAUUCUU	A-1683365.1	1014	AAGAAUACGGGA ACUGUCC	1176- 1194
AD-887046	A-1683366.1	715	GACAGUUCCCG UAUUCUUG	A-1683367.1	1015	CAAGAAUACGGG AACUGUC	1177- 1195
AD-887047	A-1683368.1	716	ACAGUUCCCGU AUUCUUGG	A-1683369.1	1016	CCAAGAAUACGG GAACUGU	1178- 1196
AD-887048	A-1683370.1	717	GCCUCUGGGUC AUUUACAG	A-1683371.1	1017	CUGUAAAUGACC CAGAGGC	1237- 1255
AD-887049	A-1683372.1	718	CCAUUGUCCUC UCCAAACU	A-1683373.1	1018	AGUUUGGAGAGG ACAAUGG	1276- 1294

AD-887050	A-1683374.1	719	CAUUGUCCUCU CCAAACUG	A-1683375.1	1019	CAGUUUGGAGAG GACAAUG	1277- 1295
AD-887051	A-1683376.1	720	AUUGUCCUCUC CAAACUGA	A-1683377.1	1020	UCAGUUUGGAGA GGACAAU	1278- 1296
AD-887052	A-1683378.1	721	UUGUCCUCUCC AAACUGAA	A-1683379.1	1021	UUCAGUUUGGAG AGGACAA	1279- 1297
AD-887053	A-1683380.1	722	UCUCCAAACUG AACCCAGA	A-1683381.1	1022	UCUGGGUUCAGU UUGGAGA	1285- 1303
AD-887054	A-1683382.1	723	CAAACUGAACC CAGAGAAU	A-1683383.1	1023	AUUCUCUGGGU CAGUUUG	1289- 1307
AD-887055	A-1683384.1	724	AAACUGAACCC AGAGAAUC	A-1683385.1	1024	GAUUCUCUGGGU UCAGUUU	1290- 1308
AD-887056	A-1683386.1	725	CCCAGAGAAUC UGGAACUC	A-1683387.1	1025	GAGUUC CAGAUU CUCUGGG	1298- 1316
AD-887057	A-1683388.1	726	GUCGCCAAUGC CUUCAUCA	A-1683389.1	1026	UGAUGAAGGCAU UGGCGAC	1353- 1371
AD-887058	A-1683390.1	727	CCAAUGCCUUC AUCAUCUG	A-1683391.1	1027	CAGAUGAUGAAG GCAUUGG	1357- 1375
AD-887059	A-1683392.1	728	AAUGCCUUCAU CAUCUGUG	A-1683393.1	1028	CACAGAUGAUGA AGGCAUU	1359- 1377
AD-887060	A-1683394.1	729	AUGCCUUCAUC AUCUGUGG	A-1683395.1	1029	CCACAGAUGAUG AAGGCAU	1360- 1378

AD-887061	A-1683396.1	730	GUGGCACCUUG UACACCGU	A-1683397.1	1030	ACGGUGUACAAG GUGCCAC	1375- 1393
AD-887062	A-1683398.1	731	ACCGUCAACUU UGC UUAUG	A-1683399.1	1031	CAUAAGCAAAGU UGACGGU	1419- 1437
AD-887063	A-1683400.1	732	CCGUCAACUUU GCUUAUGA	A-1683401.1	1032	UCAUAAGCAAAG UUGACGG	1420- 1438
AD-887064	A-1683402.1	733	CGUCAACUUUG CUUAUGAC	A-1683403.1	1033	GUCAUAAGCAAA GUUGACG	1421- 1439
AD-887065	A-1683404.1	734	GUCAACUUUGC UUAUGACA	A-1683405.1	1034	UGUCAUAAGCAA AGUUGAC	1422- 1440
AD-887066	A-1683406.1	735	UCAACUUUGCU UAUGACAC	A-1683407.1	1035	GUGUCAUAAGCA AAGUUGA	1423- 1441
AD-887067	A-1683408.1	736	CCCUGACCAUC CCAUUCAA	A-1683409.1	1036	UUGAAUGGGGAUG GUCAGGG	1462- 1480
AD-887068	A-1683410.1	737	CCUGACCAUCC CAUUCAAG	A-1683411.1	1037	CUUGAAUGGGAU GGUCAGG	1463- 1481
AD-887069	A-1683412.1	738	CUGACCAUCCC AUUCAAGA	A-1683413.1	1038	UCUUGAAUGGGA UGGUCAG	1464- 1482
AD-887070	A-1683414.1	739	CCAUCCCAUUC AAGAACCG	A-1683415.1	1039	CGGUUCUUGAAU GGGAUGG	1468- 1486
AD-887071	A-1683416.1	740	AUCCCAUUCAA GAACCGCU	A-1683417.1	1040	AGCGGUUCUUGA AUGGGAU	1470- 1488

AD-887072	A-1683418.1	741	UCCCAUUCAAG AACCGCUA	A-1683419.1	1041	UAGCGGUUCUUG AAUGGGA	1471- 1489
AD-887073	A-1683420.1	742	CCCAUUCAAGA ACCGCUAU	A-1683421.1	1042	AUAGCGGUUCUU GAAUGGG	1472- 1490
AD-887074	A-1683422.1	743	AAGUACAGCAG CAUGAUUG	A-1683423.1	1043	CAAUCAUGCUGC UGUACUU	1491- 1509
AD-887075	A-1683424.1	744	AGUACAGCAGC AUGAUUGA	A-1683425.1	1044	UCAAUCAUGCUG CUGUACU	1492- 1510
AD-887076	A-1683426.1	745	ACAGCAGCAUG AUUGACUA	A-1683427.1	1045	UAGUCAAUCAUG CUGCUGU	1495- 1513
AD-887077	A-1683428.1	746	CAGCAGCAUGA UUGACUAC	A-1683429.1	1046	GUAGUCAAUCAU GCUGCUG	1496- 1514
AD-887078	A-1683430.1	747	AGCAGCAUGAU UGACUACA	A-1683431.1	1047	UGUAGUCAAUCA UGCUGCU	1497- 1515
AD-887079	A-1683432.1	748	GCAGCAUGAUU GACUACAA	A-1683433.1	1048	UUGUAGUCAAU AUGCUGC	1498- 1516
AD-887080	A-1683434.1	749	CAGCAUGAUUG ACUACAAC	A-1683435.1	1049	GUUGUAGUCAAU CAUGCUG	1499- 1517
AD-887081	A-1683436.1	750	AGCAUGAUUGA CUACAACC	A-1683437.1	1050	GGUUGUAGUCA UCAUGCU	1500- 1518
AD-887082	A-1683438.1	751	GCAUGAUUGAC UACAACCC	A-1683439.1	1051	GGGUUGUAGUCA AUCAUGC	1501- 1519

AD-887083	A-1683440.1	752	UCUUUGCCUGG GACAACUU	A-1683441.1	1052	AAGUUGUCCCAG GCAAAGA	1534- 1552
AD-887084	A-1683442.1	753	UUGCCUGGGAC AACUUGAA	A-1683443.1	1053	UUCAAGUUGUCC CAGGCAA	1537- 1555
AD-887085	A-1683444.1	754	CCUGGGACAAC UUGAACAU	A-1683445.1	1054	AUGUUCAAGUUG UCCCAGG	1540- 1558
AD-887086	A-1683446.1	755	CUGGGACAACU UGAACAU	A-1683447.1	1055	CAUGUUCAAGUU GUCCCAG	1541- 1559
AD-887087	A-1683448.1	756	UGGGACAACUU GAACAUGG	A-1683449.1	1056	CCAUGUUCAAGU UGUCCCA	1542- 1560
AD-887088	A-1683450.1	757	GGGACAACUUG AACAUUGGU	A-1683451.1	1057	ACCAUGUUCAAG UUGUCCC	1543- 1561
AD-887089	A-1683452.1	758	GGACAACUUGA ACAUGGUC	A-1683453.1	1058	GACCAUGUUCAA GUUGUCC	1544- 1562
AD-887090	A-1683454.1	759	GACAACUUGAA CAUGGUCA	A-1683455.1	1059	UGACCAUGUUCA AGUUGUC	1545- 1563
AD-887091	A-1683456.1	760	ACAACUUGAAC AUGGUCAC	A-1683457.1	1060	GUGACCAUGUUC AAGUUGU	1546- 1564
AD-887092	A-1683458.1	761	CAACUUGAACA UGGUCACU	A-1683459.1	1061	AGUGACCAUGUU CAAGUUG	1547- 1565
AD-887093	A-1683460.1	762	ACUUGAACAUG GUCACUUA	A-1683461.1	1062	UAAGUGACCAUG UUCAAGU	1549- 1567

AD-887094	A-1683462.1	763	CUUGAACAUGG UCACUUAU	A-1683463.1	1063	AUAAGUGACCAU GUUCAAG	1550- 1568
AD-887095	A-1683464.1	764	UUGAACAUGGU CACUUAUG	A-1683465.1	1064	CAUAAGUGACCA UGUUCAA	1551- 1569
AD-887096	A-1683466.1	765	UGAACAUGGUC ACUUAUGA	A-1683467.1	1065	UCAUAAGUGACC AUGUUCA	1552- 1570
AD-887097	A-1683468.1	766	GAACAUGGUCA CUUAUGAC	A-1683469.1	1066	GUCAUAAGUGAC CAUGUUC	1553- 1571
AD-887098	A-1683470.1	767	AACAUGGUCAC UUAUGACA	A-1683471.1	1067	UGUCAUAAGUGA CCAUGUU	1554- 1572
AD-887099	A-1683472.1	768	ACAUGGUCACU UAUGACAU	A-1683473.1	1068	AUGUCAUAAGUG ACCAUGU	1555- 1573
AD-887100	A-1683474.1	769	CAUGGUCACUU AUGACAUC	A-1683475.1	1069	GAUGUCAUAAGU GACCAUG	1556- 1574
AD-887101	A-1683476.1	770	UGGUCACUUAU GACAUCAA	A-1683477.1	1070	UUGAUGUCAUAA GUGACCA	1558- 1576
AD-887102	A-1683478.1	771	GGUCACUUAUG ACAUCAAG	A-1683479.1	1071	CUUGAUGUCAUA AGUGACC	1559- 1577
AD-887103	A-1683480.1	772	GUCACUUAUGA CAUCAAGC	A-1683481.1	1072	GCUUGAUGUCAU AAGUGAC	1560- 1578
AD-887104	A-1683482.1	773	ACAUCAAGCUC UCCAAGAU	A-1683483.1	1073	AUCUUGGAGAGC UUGAUGU	1570- 1588

AD-887105	A-1683484.1	774	AUCAAGCUCUC CAAGAUGU	A-1683485.1	1074	ACAUCUUGGAGA GCUUGAU	1572- 1590
AD-887106	A-1683486.1	775	UCAAGCUCUCC AAGAUGUG	A-1683487.1	1075	CACAUCUUGGAG AGCUUGA	1573- 1591
AD-887107	A-1683488.1	776	AGCUCUCCAAG AUGUGAAA	A-1683489.1	1076	UUUCACAUCUUG GAGAGCU	1576- 1594
AD-887108	A-1683490.1	777	GCUCUCCAAGA UGUGAAAA	A-1683491.1	1077	UUUUCACAUCUU GGAGAGC	1577- 1595
AD-887109	A-1683492.1	778	CUCUCCAAGAU GUGAAAAG	A-1683493.1	1078	CUUUUCACAUCU UGGAGAG	1578- 1596
AD-887110	A-1683494.1	779	UCUCCAAGAUG UGAAAAGC	A-1683495.1	1079	GCUUUUCACAUC UUGGAGA	1579- 1597
AD-887111	A-1683496.1	780	UCCAAGAUGUG AAAAGCCU	A-1683497.1	1080	AGGCUUUUCACA UCUUGGA	1581- 1599
AD-887112	A-1683498.1	781	CCAAGAUGUGA AAAGCCUC	A-1683499.1	1081	GAGGCUUUUCAC AUCUUGG	1582- 1600
AD-887113	A-1683500.1	782	GGAUGAACAU GUCACCAU	A-1683501.1	1082	AUGGUGACCAUG UUCAUCC	1726- 1744
AD-887114	A-1683502.1	783	CAGGAAUUGUA GUCUGAGG	A-1683503.1	1083	CCUCAGACUACA AUUCCUG	1754- 1772
AD-887115	A-1683504.1	784	AGGAAUUGUA GUCUGAGGG	A-1683505.1	1084	CCCUCAGACUAC AAUUCCU	1755- 1773

AD-887116	A-1683506.1	785	UCUUCUGUCAG CAUUUAUG	A-1683507.1	1085	CAUAAAUGCUGA CAGAAGA	1806- 1824
AD-887117	A-1683508.1	786	CUUCUGUCAGC AUUUAUGG	A-1683509.1	1086	CCAUAAAUGCUG ACAGAAG	1807- 1825
AD-887118	A-1683510.1	787	UUCUGUCAGCA UUUAUGGG	A-1683511.1	1087	CCCAUAAAUGCU GACAGAA	1808- 1826
AD-887119	A-1683512.1	788	CUGUCAGCAUU UAUGGGAU	A-1683513.1	1088	AUCCCAUAAAUG CUGACAG	1810- 1828
AD-887120	A-1683514.1	789	UGUCAGCAUUU AUGGGAUG	A-1683515.1	1089	CAUCCCAUAAAU GCUGACA	1811- 1829
AD-887121	A-1683516.1	790	GUCAGCAUUUA UGGGAUGU	A-1683517.1	1090	ACAUCCCAUAAA UGCUGAC	1812- 1830
AD-887122	A-1683518.1	791	UCAGCAUUUAU GGGAUGUU	A-1683519.1	1091	AACAUCCCAUAA AUGCUGA	1813- 1831
AD-887123	A-1683520.1	792	CAGCAUUUAUG GGAUGUUU	A-1683521.1	1092	AAACAUCCCAUA AAUGCUG	1814- 1832
AD-887124	A-1683522.1	793	AGCAUUUAUGG GAUGUUUA	A-1683523.1	1093	UAAACAUCCCAU AAAUGCU	1815- 1833
AD-887125	A-1683524.1	794	GCAUUUAUGGG AUGUUUAA	A-1683525.1	1094	UUAAACAUCCCA UAA AUGC	1816- 1834
AD-887126	A-1683526.1	795	CAUUUAUGGGA UGUUUAAU	A-1683527.1	1095	AUUAACAUCUCC AUAAAUG	1817- 1835

AD- 887127	A-1683528.1	796	AUUUAUGGGA UGUUUAAUG	A-1683529.1	1096	CAUUAACAUC CAUAAAU	1818- 1836
AD- 887128	A-1683530.1	797	UUUAUGGGAU GUUUAAUGA	A-1683531.1	1097	UCAUUAACAUC CCAUAAA	1819- 1837
AD- 887129	A-1683532.1	798	UUAUGGGAUG UUUAAUGAC	A-1683533.1	1098	GUCAUUAACA CCCAUAA	1820- 1838
AD- 887130	A-1683534.1	799	AUGGGAUGUU UAAUGACAU	A-1683535.1	1099	AUGUCAUAAAC AUCCCAU	1822- 1840
AD- 887131	A-1683536.1	800	UGGGAUGUUU AAUGACAUA	A-1683537.1	1100	UAUGUCAUAAA CAUCCCA	1823- 1841
AD- 887132	A-1683538.1	801	GGGAUGUUUA AUGACAUAG	A-1683539.1	1101	CUAUGUCAUAA ACAUCCC	1824- 1842
AD- 887133	A-1683540.1	802	GGAUGUUUAA UGACAUAGU	A-1683541.1	1102	ACUAUGUCAUA AACAUCC	1825- 1843
AD- 887134	A-1683542.1	803	GAUGUUUAAU GACAUAGUU	A-1683543.1	1103	AACUAUGUCAU AAACAUC	1826- 1844
AD- 887135	A-1683544.1	804	AUGUUUAAUG ACAUAGUUC	A-1683545.1	1104	GAACUAUGUCA UAAACA	1827- 1845
AD- 887136	A-1683546.1	805	UGUUUAAUGAC AUAGUUCA	A-1683547.1	1105	UGAACUAUGUCA UUAAACA	1828- 1846
AD- 887137	A-1683548.1	806	GUUUAAUGACA UAGUUCAA	A-1683549.1	1106	UUGAACUAUGUC AUUAAAC	1829- 1847

AD-887138	A-1683550.1	807	UUUAAUGACAU AGUUCAAG	A-1683551.1	1107	CUUGAACUAUGU CAUUAAA	1830- 1848
AD-887139	A-1683552.1	808	UUA AUGACAU GUUCAAGU	A-1683553.1	1108	ACUUGAACUAUG UCAUUAA	1831- 1849
AD-887140	A-1683554.1	809	UAAUGACAUAG UUCAAGUU	A-1683555.1	1109	AACUUGAACUAU GUCAUUA	1832- 1850
AD-887141	A-1683556.1	810	AAUGACAUAGU UCAAGUUU	A-1683557.1	1110	AAACUUGAACUA UGUCAUU	1833- 1851
AD-887142	A-1683558.1	811	AUGACAUAGUU CAAGUUUU	A-1683559.1	1111	AAAACUUGAACU AUGUCAU	1834- 1852
AD-887143	A-1683560.1	812	UGACAUAGUUC AAGUUUUC	A-1683561.1	1112	GAAAACUUGAAC UAUGUCA	1835- 1853
AD-887144	A-1683562.1	813	GACAUAGUUCA AGUUUUCU	A-1683563.1	1113	AGAAAACUUGAA CUAUGUC	1836- 1854
AD-887145	A-1683564.1	814	ACAUAGUUCAA GUUUUCUU	A-1683565.1	1114	AAGAAAACUUGA ACUAUGU	1837- 1855
AD-887146	A-1683566.1	815	CAUAGUUCAAG UUUUCUUG	A-1683567.1	1115	CAAGAAAACUUG AACUAUG	1838- 1856
AD-887147	A-1683568.1	816	AUAGUUCAAGU UUUCUUGU	A-1683569.1	1116	ACAAGAAAACUU GAACUAU	1839- 1857
AD-887148	A-1683570.1	817	UAGUUCAAGUU UUCUUGUG	A-1683571.1	1117	CACAAGAAAACU UGAACUA	1840- 1858

AD- 887149	A-1683572.1	818	AGUUCAAGUUU UCUUGUGA	A-1683573.1	1118	UCACAAGAAAAC UUGAACU	1841- 1859
AD- 887150	A-1683574.1	819	GUUCAAGUUUU CUUGUGAU	A-1683575.1	1119	AUCACAAGAAAA CUUGAAC	1842- 1860
AD- 887151	A-1683576.1	820	UUCAAGUUUUC UUGUGAUU	A-1683577.1	1120	AAUCACAAGAAA ACUUGAA	1843- 1861
AD- 887152	A-1683578.1	821	UCAAGUUUUCU UGUGAUUU	A-1683579.1	1121	AAAUCACAAGAA AACUUGA	1844- 1862
AD- 887153	A-1683580.1	822	CAAGUUUUCUU GUGAUUUG	A-1683581.1	1122	CAAAUCACAAGA AAACUUG	1845- 1863
AD- 887154	A-1683582.1	823	AAGUUUUCUUG UGAUUUGG	A-1683583.1	1123	CCAAAUCACAAG AAAACUU	1846- 1864
AD- 887155	A-1683584.1	824	AGUUUUCUUGU GAUUUGGG	A-1683585.1	1124	CCCAAUUCACAA GAAAACU	1847- 1865
AD- 887156	A-1683586.1	825	GUUUUCUUGUG AUUUGGGG	A-1683587.1	1125	CCCCAAUUCACA AGAAAAC	1848- 1866
AD- 887157	A-1683588.1	826	UGUGAUUUGG GGCAAAGC	A-1683589.1	1126	GCUUUUGCCCCA AAUCACA	1855- 1873
AD- 887158	A-1683590.1	827	GUGAUUUGGG GCAAAGCU	A-1683591.1	1127	AGCUUUUGCCCC AAAUCAC	1856- 1874
AD- 887159	A-1683592.1	828	UGAUUUGGGGC AAAAGCUG	A-1683593.1	1128	CAGCUUUUGCCC CAAUCA	1857- 1875

AD-887160	A-1683594.1	829	UAGUUUCUUCC UGAAAACC	A-1683595.1	1129	GGUUUUCAGGAA GAAACUA	1886- 1904
AD-887161	A-1683596.1	830	AGUUUCUUCCU GAAAACCA	A-1683597.1	1130	UGGUUUUCAGGA AGAAACU	1887- 1905
AD-887162	A-1683598.1	831	GUUUCUUCCUG AAAACCAU	A-1683599.1	1131	AUGGUUUUCAGG AAGAAAC	1888- 1906
AD-887163	A-1683600.1	832	UUUCUUCCUGA AAACCAUU	A-1683601.1	1132	AAUGGUUUUCAG GAAGAAA	1889- 1907
AD-887164	A-1683602.1	833	UUCUUCCUGAA AACCAUUG	A-1683603.1	1133	CAAUGGUUUUCA GGAAGAA	1890- 1908
AD-887165	A-1683604.1	834	UCUUCCUGAAA ACCAUUGC	A-1683605.1	1134	GCAAUGGUUUUC AGGAAGA	1891- 1909
AD-887166	A-1683606.1	835	CUUCCUGAAAA CCAUUGCU	A-1683607.1	1135	AGCAAUGGUUUU CAGGAAG	1892- 1910
AD-887167	A-1683608.1	836	UUCCUGAAAAC CAUUGCUC	A-1683609.1	1136	GAGCAAUGGUUU UCAGGAA	1893- 1911
AD-887168	A-1683610.1	837	UCCUGAAAACC AUUGCUCU	A-1683611.1	1137	AGAGCAAUGGUU UUCAGGA	1894- 1912
AD-887169	A-1683612.1	838	CCUGAAAACCA UUGCUCUU	A-1683613.1	1138	AAGAGCAAUGGU UUUCAGG	1895- 1913
AD-887170	A-1683614.1	839	CUGAAAACCAU UGCUCUUG	A-1683615.1	1139	CAAGAGCAAUGG UUUUCAG	1896- 1914

AD-887171	A-1683616.1	840	AACCAUUGCUC UUGCAUGU	A-1683617.1	1140	ACAUGCAAGAGC AAUGGUU	1901- 1919
AD-887172	A-1683618.1	841	CCAUUGCUCUU GCAUGUUA	A-1683619.1	1141	UAACAUGCAAGA GCAAUGG	1903- 1921
AD-887173	A-1683620.1	842	CAUUGCUCUUG CAUGUUAC	A-1683621.1	1142	GUAACAUGCAAG AGCAAUG	1904- 1922
AD-887174	A-1683622.1	843	AUUGCUCUUGC AUGUUACA	A-1683623.1	1143	UGUAACAUGCAA GAGCAAU	1905- 1923
AD-887175	A-1683624.1	844	UUGCUCUUGCA UGUUACAU	A-1683625.1	1144	AUGUAACAUGCA AGAGCAA	1906- 1924
AD-887176	A-1683626.1	845	UGCUCUUGCAU GUUACAUG	A-1683627.1	1145	CAUGUAACAUGC AAGAGCA	1907- 1925
AD-887177	A-1683628.1	846	GCUCUUGCAUG UUACAUGG	A-1683629.1	1146	CCAUGUAACAUG CAAGAGC	1908- 1926
AD-887178	A-1683630.1	847	CUCUUGCAUGU UACAUGGU	A-1683631.1	1147	ACCAUGUAACAU GCAAGAG	1909- 1927
AD-887179	A-1683632.1	848	UCUUGCAUGUU ACAUGGUU	A-1683633.1	1148	AACCAUGUAACA UGCAAGA	1910- 1928
AD-887180	A-1683634.1	849	CUUGCAUGUUA CAUGGUUA	A-1683635.1	1149	UAACCAUGUAAC AUGCAAG	1911- 1929
AD-887181	A-1683636.1	850	UUGCAUGUUAC AUGGUUAC	A-1683637.1	1150	GUAACCAUGUAA CAUGCAA	1912- 1930

AD-887182	A-1683638.1	851	UGCAUGUUACA UGGUUACC	A-1683639.1	1151	GGUAACCAUGUA ACAUGCA	1913- 1931
AD-887183	A-1683640.1	852	GCAUGUUACAU GGUUACCA	A-1683641.1	1152	UGGUAACCAUGU AACAUGC	1914- 1932
AD-887184	A-1683642.1	853	AUGUUACAUGG UUACCACA	A-1683643.1	1153	UGUGGUAACCAU GUAACAU	1916- 1934
AD-887185	A-1683644.1	854	UGUUACAUGGU UACCACAA	A-1683645.1	1154	UUGUGGUAACCA UGUAACA	1917- 1935
AD-887186	A-1683646.1	855	UGGUUACCACA AGCCACAA	A-1683647.1	1155	UUGUGGCUUGUG GUAACCA	1924- 1942
AD-887187	A-1683648.1	856	GGUUACCACAA GCCACAAU	A-1683649.1	1156	AUUGUGGCUUGU GGUAACC	1925- 1943
AD-887188	A-1683650.1	857	GUUACCACAAG CCACAAUA	A-1683651.1	1157	UAUUGUGGCUUG UGGUAAC	1926- 1944
AD-887189	A-1683652.1	858	AAAAGCAUAAC UUCUAAAG	A-1683653.1	1158	CUUUAGAAGUUA UGCUIIU	1945- 1963
AD-887190	A-1683654.1	859	AAAGCAUAACU UCUAAAGG	A-1683655.1	1159	CCUUUAGAAGUU AUGCUUU	1946- 1964
AD-887191	A-1683656.1	860	AAGCAUAACUU CUAAAGGA	A-1683657.1	1160	UCCUUUAGAAGU UAUGCUU	1947- 1965
AD-887192	A-1683658.1	861	AGCAUAACUUC UAAAGGAA	A-1683659.1	1161	UUCUUUAGAAG UUAUGCU	1948- 1966

AD-887193	A-1683660.1	862	GCAUAACUUCU AAAGGAAG	A-1683661.1	1162	CUUCCUUUAGAA GUUAUGC	1949- 1967
AD-887194	A-1683662.1	863	CAUAACUUCUA AAGGAAGC	A-1683663.1	1163	GCUUCCUUUAGA AGUUAUG	1950- 1968
AD-887195	A-1683664.1	864	AUAACUUCUAA AGGAAGCA	A-1683665.1	1164	UGCUUCCUUUAG AAGUUAU	1951- 1969
AD-887196	A-1683666.1	865	ACUUCUAAAGG AAGCAGAA	A-1683667.1	1165	UUCUGCUUCCUU UAGAAGU	1954- 1972
AD-887197	A-1683668.1	866	UUCUAAAGGAA GCAGAAUA	A-1683669.1	1166	UAUUCUGCUUCC UUUAGAA	1956- 1974
AD-887198	A-1683670.1	867	UCUAAAGGAAG CAGAAUAG	A-1683671.1	1167	CUAUUCUGCUUC CUUUAGA	1957- 1975
AD-887199	A-1683672.1	868	CUAAAGGAAGC AGAAUAGC	A-1683673.1	1168	GCUAUUCUGCUU CCUUUAG	1958- 1976
AD-887200	A-1683674.1	869	AAAGGAAGCAG AAUAGCUC	A-1683675.1	1169	GAGCUAUUCUGC UUCCUUU	1960- 1978
AD-887201	A-1683676.1	870	AUAAGUAAGA UGCAUUUAC	A-1683677.1	1170	GUAAAUGCAUCU UACUUAU	1997- 2015
AD-887202	A-1683678.1	871	UAAGUAAGAU GCAUUUACU	A-1683679.1	1171	AGUAAAUGCAUC UUACUUA	1998- 2016
AD-887203	A-1683680.1	872	AAGUAAGAUGC AUUUACUA	A-1683681.1	1172	UAGUAAAUGCAU CUUACUU	1999- 2017

AD-887204	A-1683682.1	873	AGUAAGAUGCA UUUACUAC	A-1683683.1	1173	GUAGUAAAUGCA UCUUACU	2000-2018
AD-887205	A-1683684.1	874	GUAAGAUGCAU UUACUACA	A-1683685.1	1174	UGUAGUAAAUGC AUCUUAC	2001-2019
AD-887206	A-1683686.1	875	UAAGAUGCAUU UACUACAG	A-1683687.1	1175	CUGUAGUAAAUG CAUCUUA	2002-2020
AD-887207	A-1683688.1	876	UUGGCUUCUAA UGCUCAG	A-1683689.1	1176	CUGAAGCAUUAG AAGCCAA	2021-2039
AD-887208	A-1683690.1	877	UGGCUUCUAAU GCUUCAGA	A-1683691.1	1177	UCUGAAGCAUUA GAAGCCA	2022-2040
AD-887209	A-1683692.1	878	GGCUUCUAAUG CUUCAGAU	A-1683693.1	1178	AUCUGAAGCAUU AGAAGCC	2023-2041
AD-887210	A-1683694.1	879	GCUUCUAAUGC UUCAGAU	A-1683695.1	1179	UAUCUGAAGCAU UAGAAGC	2024-2042
AD-887211	A-1683696.1	880	UCUAAUGCUUC AGAUAGAA	A-1683697.1	1180	UUCUAUCUGAAG CAUUAGA	2027-2045
AD-887212	A-1683698.1	881	CUAAUGCUUCA GAUAGAAU	A-1683699.1	1181	AUUCUAUCUGAA GCAUUAG	2028-2046
AD-887213	A-1683700.1	882	UAAUGCUUCAG AUAGAAUA	A-1683701.1	1182	UAUUCUAUCUGA AGCAUUA	2029-2047
AD-887214	A-1683702.1	883	AAUGCUUCAGA UAGAAUAC	A-1683703.1	1183	GUAUUCUAUCUG AAGCAUU	2030-2048

AD-887215	A-1683704.1	884	AUGCUUCAGAU AGAAUACA	A-1683705.1	1184	UGUAUUCUAUCU GAAGCAU	2031- 2049
AD-887216	A-1683706.1	885	UGCUUCAGAU GAAUACAG	A-1683707.1	1185	CUGUAUUCUAUC UGAAGCA	2032- 2050
AD-887217	A-1683708.1	886	GCUUCAGAUAG AAUACAGU	A-1683709.1	1186	ACUGUAUUCUAU CUGAAGC	2033- 2051
AD-887218	A-1683710.1	887	CUUCAGAUAGA AUACAGUU	A-1683711.1	1187	AACUGUAUUCUA UCUGAAG	2034- 2052
AD-887219	A-1683712.1	888	UUCAGAUAGAA UACAGUUG	A-1683713.1	1188	CAACUGUAUUCU AUCUGAA	2035- 2053
AD-887220	A-1683714.1	889	UCAGAUAGAAU ACAGUUGG	A-1683715.1	1189	CCAACUGUAUUC UAUCUGA	2036- 2054
AD-887221	A-1683716.1	890	CAGAUAGAAUA CAGUUGGG	A-1683717.1	1190	CCCAACUGUAUU CUAUCUG	2037- 2055
AD-887222	A-1683718.1	891	CAUUGUGAAAU AAAAUUUU	A-1683719.1	1191	AAAAUUUUAUUU CACAAUG	2073- 2091
AD-887223	A-1683720.1	892	AUUGUGAAAU AAAAUUUUC	A-1683721.1	1192	GAAAAUUUUAUU UCACAAU	2074- 2092
AD-887224	A-1683722.1	893	UUGUGAAUA AAAUUUUCU	A-1683723.1	1193	AGAAAAUUUUAU UUCACAA	2075- 2093
AD-887225	A-1683724.1	894	UGUGAAAUAA AAUUUUCUU	A-1683725.1	1194	AAGAAAAUUUUA UUUCACA	2076- 2094

AD- 887226	A-1683726.1	895	GUGAAAUAAA AUUUUCUUA	A-1683727.1	1195	UAAGAAAAUUUU AUUUCAC	2077- 2095
AD- 887227	A-1683728.1	896	UGAAAUAAAA UUUUCUUAUAC	A-1683729.1	1196	GUAAGAAAAUUU UAUUUCA	2078- 2096
AD- 887228	A-1683730.1	897	GAAAUAAAAU UUUCUUAACC	A-1683731.1	1197	GGUAAGAAAAUU UUAUUUC	2079- 2097
AD- 887229	A-1683732.1	898	AAAUAAAAUU UUCUUACCC	A-1683733.1	1198	GGGUAAGAAAAU UUUAUUU	2080- 2098
AD- 887230	A-1683734.1	899	AAUAAAAUUU UCUUACCCA	A-1683735.1	1199	UGGGUAAGAAAA UUUUAAU	2081- 2099
AD- 887231	A-1683736.1	900	AUAAAAUUUUC UUACCCAA	A-1683737.1	1200	UUGGGUAAGAAA AUUUUAU	2082- 2100

Таблица 3А

Иллюстративные модифицированные последовательности одиночных цепей и дуплексов миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	Название последовательности смысловой цепи	SEQ ID NO: (смысловая цепь)	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	Название антисмысловой последовательности	SEQ ID NO: (антисмысловая цепь)	Последовательность антисмысловой цепи	Последовательность миРНК-мишени	SEQ ID NO:
AD-954362.1	A-1801568.1	1201	csasgca(Chd)AfgCfA fGfagcuuuccaaL96	A-1801569.1	1336	VPusUfsggaAfaGf CfucugCfuGfugcug sasg	CUCAGCAC AGCAGAGC UUUCCAG	3051
AD-954363.1	A-1801570.1	1202	asgscac(Ahd)GfcAfG fAfgcuuuccagaL96	A-1801571.1	1337	VPusCfsuggAfaAf GfcucuGfcUfgugcu sgsa	UCAGCACA GCAGAGCU UUCCAGA	3052
AD-954410.1	A-1801664.1	1203	asgsguu(Chd)UfuCfU fGfugcacguugaL96	A-1801665.1	1338	VPusCfsaacGfuGf CfacagAfaGfaaccu scsa	UGAGGUUC UUCUGUGC ACGUUGC	3053
AD-954411.1	A-1801666.1	1204	gsgsuuc(Uhd)UfcUfG fUfgcacguugcaL96	A-1801667.1	1339	VPusGfscaaCfgUf GfcacaGfaAfgaacc susc	GAGGUUCU UCUGUGCA CGUUGCU	3054
AD-954548.1	A-1801939.1	1205	gscscag(Uhd)CfcCfA fAfugaauccagaL96	A-1801940.1	1340	VPusCfsuggAfuUf CfauugGfgAfcuggc scsa	UGGCCAGU CCCAAUGA AUCCAGC	3055

AD-954684.1	A-1802210.1	1206	csasgcu(Ghd)GfaAfA fCfccaaaccagaL96	A-1577549.1	1341	VPusCfsuggUfuUf GfgguuUfcCfagcug sgsu	ACCAGCUG GAAACCCA AACCAGA	3056
AD-954771.1	A-1802382.1	1207	uscscga(Ghd)AfcAfA fGfucaguucugaL96	A-1802383.1	1342	VPusCfsagaAfcUf GfacuuGfuCfucgga sgsg	CCUCCGAG ACAAGUCA GUUCUGG	3057
AD-954772.1	A-1802384.1	1208	cscsgag(Ahd)CfaAfG fUfcaguucuggaL96	A-1802385.1	1343	VPusCfscagAfaCf UfgacuUfgUfcucgg sasg	CUCCGAGA CAAGUCAG UUCUGGA	3058
AD-954891.1	A-1802621.1	1209	asgsgcu(Chd)CfaGfA fGfaaguuucuaaL96	A-1802622.1	1344	VPusUfsagaAfaCf UfucucUfgGfagccu sgsg	CCAGGCUC CAGAGAAG UUUCUAC	3059
AD-954892.1	A-1802623.1	1210	gsgscuc(Chd)AfgAfG fAfaguuucuacaL96	A-1802624.1	1345	VPusGfsuagAfaAf CfuucuCfuGfgagcc susg	CAGGCUCC AGAGAAGU UUCUACG	3060
AD-954912.1	A-1802663.1	1211	gsusgga(Ahd)UfuUf GfGfacacuuuggaL96	A-1802664.1	1346	VPusCfscaaAfgUf GfuccaAfaUfuccac sgsu	ACGUGGAA UUUGGACA CUUUGGC	3061
AD-954913.1	A-1802665.1	1212	usgsgaa(Uhd)UfuGfG fAfcacuuuggcaL96	A-1802666.1	1347	VPusGfsccaAfaGf UfguccAfaAfuucca scsg	CGUGGAAU UUGGACAC UUUGGCC	3062
AD-954914.	A-1802667.1	1213	gsgsaau(Uhd)UfgGfA fCfacuuuggccaL96	A-1802668.1	1348	VPusGfsgccAfaAf GfugucCfaAfauucc	GUGGAAUU UGGACACU	3063

1						sasc	UUGGCCU	
AD-954915.1	A-1802669.1	1214	gsasauu(Uhd)GfgAfCfAfcuuuggccuaL96	A-1802670.1	1349	VPusAfsggcCfaAfAfguguCfcAfaauucscsa	UGGAAUUU GGACACUU UGGCCUU	3064
AD-954921.1	A-1802681.1	1215	gsgsaca(Chd)UfuUfGfGfccuuccaggaL96	A-1802682.1	1350	VPusCfscugGfaAfGfgccaAfaGfuguccsasa	UUGGACAC UUUGGCCU UCCAGGA	3065
AD-954934.1	A-1802707.1	1216	uscscag(Ghd)AfaCfUfGfaaguccgagaL96	A-1802708.1	1351	VPusCfsucgGfaCfUfucagUfuCfcuggasasg	CUUCCAGG AACUGAAG UCCGAGC	3066
AD-954937.1	A-1802713.1	1217	gsusccg(Ahd)GfcUfAfAfcugaaguucaL96	A-1577559.1	1352	VPusGfsaacUfuCfAfguuaGfcUfcggacsusu	AAGUCCGA GCUAACUG AAGUCC	3067
AD-954939.1	A-1802715.1	1218	ususccu(Ghd)CfuUfCfCfcgaauuuugaL96	A-1577523.1	1353	VPusCfsaaaAfuUfCfgggaAfgCfaggaa scsu	AGUUCCUG CUUCCCGA AUUUUGA	3068
AD-954944.1	A-1802724.1	1219	ascsuga(Ahd)GfuCfCfGfagcuaacugaL96	A-1802725.1	1354	VPusCfsaguUfaGfCfucggAfcUfucagususc	GAACUGAA GUCCGAGC UACUGA	3069
AD-954951.1	A-1802738.1	1220	csgsagc(Uhd)AfaCfUfGfaaguuccugaL96	A-1802739.1	1355	VPusCfsaggAfaCfUfucagUfuAfgcucgsgsa	UCCGAGCU AACUGAAG UUCCUGC	3070
AD-	A-1802752.1	1221	ascsuga(Ahd)GfuUfC	A-1802753.1	1356	VPusCfsgggAfaGf	UACUGAA	3071

954958. 1			fCfugcuucccgAL96			CfaggaAfcUfucagu susa	GUUCCUGC UUCCCGA	
AD- 954964. 1	A-1802764.1	1222	gsusucc(Uhd)GfcUfU fCfccgaauuuuaL96	A-1802765.1	1357	VPusAfsaaaUfuCf GfggaaGfcAfggaac susu	AAGUCCCU GCUUCCCG AAUUUUG	3072
AD- 954965. 1	A-1802766.1	1223	uscscug(Chd)UfuCfC fCfgaauuuugaaL96	A-1802767.1	1358	VPusUfscaaAfaUf UfcgggAfaGfcagga sasc	GUUCCUGC UUCCCGAA UUUUGAA	3073
AD- 954966. 1	A-1802768.1	1224	cscsugc(Uhd)UfcCfC fGfaauuuugaaaL96	A-1802769.1	1359	VPusUfsucaAfaAf UfucggGfaAfgcagg sasa	UUCCUGCU UCCCGAAU UUUGAAG	3074
AD- 954967. 1	A-1802770.1	1225	csusgcu(Uhd)CfcCfG fAfaauuuugaagaL96	A-1802771.1	1360	VPusCfsuucAfaAf AfuucgGfgAfacgag sgsa	UCCUGCUU CCCGAAUU UUGAAGG	3075
AD- 954968. 1	A-1802772.1	1226	usgscuu(Chd)CfcGfA fAfuuuugaaggaL96	A-1802773.1	1361	VPusCfscuuCfaAf AfauucGfgGfaagca sgsg	CCUGCUUC CCGAAUUU UGAAGGA	3076
AD- 954970. 1	A-1802776.1	1227	csusucc(Chd)GfaAfU fUfuugaaggagaL96	A-1802777.1	1362	VPusCfsuccUfuCf AfaaaUfcGfggaag scsa	UGCUUCCC GAAUUUUG AAGGAGA	3077
AD- 954992. 1	A-1802818.1	1228	csgsgau(Ghd)UfgGfA fGfaacuaguuuuL96	A-1577507.1	1363	VPusAfsaacUfaGf UfucucCfaCfauccg sgsu	ACCGGAUG UGGAGAAC UAGUUUG	3078

AD-954993.1	A-1802819.1	1229	gsgsaug(Uhd)GfgAfGfAfacuaguuugaL96	A-1577525.1	1364	VPusCfsaaaCfuAfGfuucuCfcAfcauccsgsg	CCGGAUGUGGAGAACUAGUUUGG	3079
AD-955030.1	A-1802892.1	1230	gsasugu(Ghd)GfaGfAfAfcuaguuuggaL96	A-1802893.1	1365	VPusCfscaaAfcUfAfguucUfcCfacaucscsg	CGGAUGUGGAGAACUAGUUUGGG	3080
AD-955031.1	A-1802894.1	1231	asusgug(Ghd)AfgAfAfCfuaguuugggaL96	A-1802895.1	1366	VPusCfsccaAfaCfUfaguuCfuCfcacau scsc	GGAUGUGGAGAACUAGUUUGGGU	3081
AD-955032.1	A-1802896.1	1232	usgsugg(Ahd)GfaAfCfUfaguuuggguaL96	A-1802897.1	1367	VPusAfscccAfaAfCfuaguUfcUfccaca susc	GAUGUGGAGAACUAGUUUGGGUA	3082
AD-955034.1	A-1802900.1	1233	usgsgag(Ahd)AfcUfAfGfuuuuggguagaL96	A-1802901.1	1368	VPusCfsuacCfcAfAfacuaGfuUfcucca scsa	UGUGGAGAACUAGUUUGGGUAGG	3083
AD-955035.1	A-1802902.1	1234	gsgsaga(Ahd)CfuAfGfUfuuggguagguaL96	A-1802903.1	1369	VPusCfscuaCfcCfAfaacuAfgUfucucc sasc	GUGGAGAA CUAGUUUGGUAGGA	3084
AD-955037.1	A-1802906.1	1235	asgsaac(Uhd)AfgUfUfUfggguaggagaL96	A-1802907.1	1370	VPusCfsuccUfaCfCfcaaaCfuAfguucu scsc	GGAGAACUAGUUUGGUAGGAGA	3085
AD-955074.	A-1802979.1	1236	asascag(Chd)AfgAfAfAfaaaauacugaL96	A-1802980.1	1371	VPusCfsaguAfaUfUfguuuUfcGfcugu	AGAACAGCAGAAACAA	3086

1						uscsu	UUACUGG	
AD-955075.1	A-1802981.1	1237	ascsagc(Ahd)GfaAfA fCfaauuacuggaL96	A-1802982.1	1372	VPusCfscagUfaAf UfuguuUfcUfgcug ususc	GAACAGCA GAAACAAU UACUGGC	3087
AD-955082.1	A-1802995.1	1238	asasca(Uhd)UfaCfU fGfgcaaguaL96	A-1802996.1	1373	VPusCfsauaCfuUf GfccagUfaAfuuguu susc	GAAACAAU UACUGGCA AGUAUGG	3088
AD-955083.1	A-1802997.1	1239	ascsaau(Uhd)AfcUfG fGfcaaguaL96	A-1802998.1	1374	VPusCfscAuAfcUf UfgccaGfuAfaugu susu	AAACAAUU ACUGGCAA GUAUGGU	3089
AD-955084.1	A-1802999.1	1240	csasaau(Ahd)CfuGfG fCfaaguaL96	A-1803000.1	1375	VPusAfsccaUfaCf UfugccAfgUfaauug susu	AACAAUUA CUGGCAAG UAUGGUG	3090
AD-955085.1	A-1803001.1	1241	asasuua(Chd)UfgGfC fAfaguaL96	A-1803002.1	1376	VPusCfsaccAfuAf CfuugcCfaGfuaauu sgsu	ACAAUUAC UGGCAAGU AUGGUGU	3091
AD-955086.1	A-1803003.1	1242	asusuac(Uhd)GfgCfA fAfaguaL96	A-1803004.1	1377	VPusAfsccAcfaUf AfcuugCfcAfguaau susg	CAAUUACU GGCAAGUA UGGUGUG	3092
AD-955087.1	A-1803005.1	1243	ususacu(Ghd)GfcAfA fGfuaL96	A-1803006.1	1378	VPusCfsacaCfcAf UfacuuGfcCfaguaa susu	AAUUACUG GCAAGUAU GGUGUGU	3093
AD-	A-1803025.1	1244	gsusaug(Ghd)UfgUf	A-1803026.1	1379	VPusCfsucgCfaUf	AAGUAUGG	3094

955097. 1			GfUfggaugcgagaL96			CfcacaCfaCfcuacs usu	UGUGUGGA UGCGAGA	
AD- 955144. 1	A-1803119.1	1245	gsasugu(Chd)CfgCfC fAfpguuuuugaaL96	A-1803120.1	1380	VPusUfscaaAfaAf CfcuggCfgGfacauc scsg	CGGAUGUC CGCCAGGU UUUUGAG	3095
AD- 955146. 1	A-1803122.1	1246	cscsgcc(Ahd)GfgUfU fUfuugaguaugaL96	A-1577537.1	1381	VPusCfsauaCfuCf AfaaaaCfcUfggcgg sasc	GUCCGCCA GGUUUUUG AGUAUGA	3096
AD- 955148. 1	A-1803124.1	1247	gsasccu(Chd)AfuCfA fGfccaguuuaual96	A-1577573.1	1382	VPusAfsuaaAfcUf GfgcugAfuGfaggu csasu	AUGACCUC AUCAGCCA GUUUAUG	3097
AD- 955165. 1	A-1803152.1	1248	ususuga(Ghd)UfaUfG fAfccucaucagaL96	A-1803153.1	1383	VPusCfsugaUfgAf GfgucaUfaCfucaaa sasa	UUUUUGAG UAUGACCU CAUCAGC	3098
AD- 955174. 1	A-1803170.1	1249	ascscuc(Ahd)UfcAfG fCfcaguuuaugaL96	A-1803171.1	1384	VPusCfsauaAfaCf UfggcuGfaUfgagg uscsa	UGACCUCA UCAGCCAG UUUAUGC	3099
AD- 955175. 1	A-1803172.1	1250	cscsuca(Uhd)CfaGfC fCfaguuuaugcaL96	A-1803173.1	1385	VPusGfscAuAfaAf CfuggcUfgAfugag gsusc	GACCUCAU CAGCCAGU UUAUGCA	3100
AD- 955177. 1	A-1803176.1	1251	uscsauc(Ahd)GfcCfA fGfuuuuaugcagaL96	A-1803177.1	1386	VPusCfsugcAfuAf AfacugGfcUfgauga sgsg	CCUCAUCA GCCAGUUU AUGCAGG	3101

AD-955193.1	A-1803208.1	1252	gscsagg(Ghd)CfuAfC fCfcuucuaaggaL96	A-1803209.1	1387	VPusCfscuuAfgAf AfggggUfaGfccugc sas	AUGCAGGG CUACCCUU CUAAGGU	3102
AD-955194.1	A-1803210.1	1253	csasggg(Chd)UfaCfC fCfuucuaagguaL96	A-1803211.1	1388	VPusAfsccuUfaGf AfagggUfaGfccug scsa	UGCAGGGC UACCCUUC UAAGGUU	3103
AD-955196.1	A-1803214.1	1254	gsgsgcu(Ahd)CfcCfU fUfcuaagguucaL96	A-1803215.1	1389	VPusGfsaacCfuUf AfgaagGfgUfagccc susg	CAGGGCUA CCCUUCUA AGGUUCA	3104
AD-955199.1	A-1803220.1	1255	csusucu(Ahd)AfgGfU fUfcacauacugaL96	A-1803221.1	1390	VPusCfsaguAfuGf UfgaacCfuUfagaag sgsg	CCCUUCUA AGGUUCAC AUACUGC	3105
AD-955200.1	A-1803222.1	1256	ususcu(Ahd)GfgUfU fCfacauacugcaL96	A-1803223.1	1391	VPusGfscagUfaUf GfugaaCfcUfuagaa sgsg	CCUUCUAA GGUUCACA UACUGCC	3106
AD-955255.1	A-1803331.1	1257	gsasguc(Chd)AfgAfA fCfugucauaagaL96	A-1577519.1	1392	VPusCfsuuaUfgAf CfaguuCfuGfgacuc sasg	CUGAGUCC AGAACUGU CAUAAGA	3107
AD-955266.1	A-1803352.1	1258	gsuscca(Ghd)AfaCfU fGfucuaagauaL96	A-1803353.1	1393	VPusAfsucuUfaUf GfacagUfuCfuggac susc	GAGUCCAG AACUGUCA UAAGAUA	3108
AD-955269.1	A-1803358.1	1259	csasgaa(Chd)UfgUfC fAfuaagauaugaL96	A-1803359.1	1394	VPusCfsauaUfcUf UfaugaCfaGfuucug	UCCAGAAC UGUCAUAA	3109

1						sgsa	GAUAUGA	
AD-955270.1	A-1803360.1	1260	asgsaac(Uhd)GfuCfA fUfaagauaugaaL96	A-1803361.1	1395	VPusUfscAuAfuCf UfuaugAfcAfguuc usgsg	CCAGAACU GUCAUAAG AUAUGAG	3110
AD-955271.1	A-1803362.1	1261	gsasacu(Ghd)UfcAfU fAfagauaugagaL96	A-1803363.1	1396	VPusCfsucaUfaUf CfuauGfaCfaguuc susg	CAGAACUG UCAUAAGA UAUGAGC	3111
AD-955272.1	A-1803364.1	1262	asascug(Uhd)CfaUfA fAfgauaugagcaL96	A-1803365.1	1397	VPusGfscucAfuAf UfcuuaUfgAfcaguu scsu	AGAACUGU CAUAAGAU AUGAGCU	3112
AD-955281.1	A-1803382.1	1263	asasgau(Ahd)UfgAfG fCfugaauaccgaL96	A-1803383.1	1398	VPusCfsgguAfuUf CfagcuCfaUfaucuu sasuu	AUAAGAU UGAGCUGA AUACCGA	3113
AD-955282.1	A-1803384.1	1264	asgsaua(Uhd)GfaGfC fUfgauuaccgaaL96	A-1803385.1	1399	VPusUfscggUfaUf UfcagcUfcAfuaucuu susa	UAAGAU GAGCUGAA UACCGAG	3114
AD-955283.1	A-1803386.1	1265	gsasuau(Ghd)AfgCfU fGfaauaccgagaL96	A-1803387.1	1400	VPusCfsucgGfuAf UfucagCfuCfauauc susu	AAGAU AGCUGAAU ACCGAGA	3115
AD-955292.1	A-1803404.1	1266	usgsaa(Uhd)CfcGfA fGfacagugaagaL96	A-1803405.1	1401	VPusCfsuucAfcUf GfucucGfgUfauuca sgsc	GCUGAAUA CCGAGACA GUGAAGG	3116
AD-	A-1803406.1	1267	gsasaua(Chd)CfGfG	A-1803407.1	1402	VPusCfscuuCfaCf	CUGAAUAC	3117

955293. 1			fAfcagugaaggaL96			UfgucuCfgGfuauuc sasg	CGAGACAG UGAAGGC	
AD- 955308. 1	A-1803434.1	1268	cscsacg(Ghd)AfcAfG fUfucccguaauaL96	A-1577539.1	1403	VPusAfsauaCfgGf GfaacuGfuCfcgugg susa	UACCACGG ACAGUUC CGUAUUC	3118
AD- 955309. 1	A-1803435.1	1269	csascgg(Ahd)CfaGfU fUfcccguauucaL96	A-1577529.1	1404	VPusGfsaauAfcGf GfgaacUfgUfccgug sgsu	ACCACGGA CAGUCCCC GUAUUCU	3119
AD- 955310. 1	A-1803436.1	1270	ascsgga(Chd)AfgUfU fCfccguauucuaL96	A-1577521.1	1405	VPusAfsgaaUfaCf GfggaaCfuGfuccgu sgsg	CCACGGAC AGUCCCCG UAUUCUU	3120
AD- 955343. 1	A-1803501.1	1271	ascscac(Ghd)GfaCfA fGfuucccguaual96	A-1803502.1	1406	VPusAfsuacGfgGf AfacugUfcCfuggu sasg	CUACCACG GACAGUUC CCGUAUU	3121
AD- 955344. 1	A-1803503.1	1272	csgsgac(Ahd)GfuUfC fCfcguauucuaL96	A-1803504.1	1407	VPusAfsagaAfuAf CfgggaAfcUfguccg susg	CACGGACA GUUCCCGU AUUCUUG	3122
AD- 955345. 1	A-1803505.1	1273	gsgsaca(Ghd)UfuCfC fCfguauucuugaL96	A-1803506.1	1408	VPusCfsaagAfaUf AfcgggAfaCfugucc sgsu	ACGGACAG UUCCCGUA UUCUUGG	3123
AD- 955346. 1	A-1803507.1	1274	gsascag(Uhd)UfcCfC fGfuauucuuggaL96	A-1803508.1	1409	VPusCfscaaGfaAf UfacggGfaAfcuguc scsg	CGGACAGU UCCCGUAU UCUUGGG	3124

AD-955385.1	A-1803585.1	1275	csasggc(Chd)UfcUfGfGfgucauuuacaL96	A-1803586.1	1410	VPusGfsuaaAfuGfAfcccaGfaGfgccugscsu	AGCAGGCCUCUGGGUCAUUUACA	3125
AD-955386.1	A-1803587.1	1276	asgsgcc(Uhd)CfuGfGfGfucauuuacaaL96	A-1803588.1	1411	VPusUfsguaAfaUfGfaccAfgAfggccusgsc	GCAGGCCUCUGGGUCAUUUACAG	3126
AD-955387.1	A-1803589.1	1277	gsgsccu(Chd)UfgGfGfUfcuuuacagaL96	A-1803590.1	1412	VPusCfsuguAfaAfUfgaccCfaGfaggccsusg	CAGGCCUCUGGGUCAUUUACAGC	3127
AD-955415.1	A-1803645.1	1278	asgsgcc(Ahd)AfaGfGfUfgccauugucaL96	A-1803646.1	1413	VPusGfsacaAfuGfGfcaccUfuUfggccuscsa	UGAGGCCAAAGGUGCCAUUGUCC	3128
AD-955427.1	A-1803669.1	1279	cscsauu(Ghd)UfcCfUfCfuccaaacugaL96	A-1803670.1	1414	VPusCfsaguUfuGfGfagagGfaCfauggscsa	UGCCAUUGUCCUCUCCAAACUGA	3129
AD-955504.1	A-1803823.1	1280	gsuscgc(Chd)AfaUfGfCfcuucaucauaL96	A-1803824.1	1415	VPusAfsugaUfgAfAfggcaUfuGfgcgacsusg	CAGUCGCCAAUGCCUCCAUC	3130
AD-955570.1	A-1803953.1	1281	usascg(Uhd)CfaAfCfUfuugcuuaugaL96	A-1803954.1	1416	VPusCfsauaAfgCfAfaaguUfgAfcgguasgsc	GCUACCGUCAACUUUGCUUAUGA	3131
AD-955571.1	A-1803955.1	1282	ascscgu(Chd)AfaCfUfUfugcuuaugaal96	A-1803956.1	1417	VPusUfscauAfaGfCfaaagUfuGfacgggu	CUACCGUCAACUUUGC	3132

1						sasg	UUAUGAC	
AD-955572.1	A-1803957.1	1283	cscsguc(Ahd)AfcUfUfUfgcuuaugacaL96	A-1803958.1	1418	VPusGfsucaUfaAfGfcaaaGfuUfgacggsusa	UACCGUCA ACUUUGCU UAUGACA	3133
AD-955586.1	A-1803985.1	1284	usasuga(Chd)AfcAfGfGfcacagguauaL96	A-1803986.1	1419	VPusAfsuacCfuGfUfgccuGfuGfucauasasg	CUUAUGAC ACAGGCAC AGGUAUC	3134
AD-955612.1	A-1804037.1	1285	ascscu(Ghd)AfcCfAfUfccauucaaaL96	A-1804038.1	1420	VPusUfsugaAfuGfGfgaugGfuCfaggguscsu	AGACCCUG ACCAUCCC AUUCAAG	3135
AD-955615.1	A-1804041.1	1286	csasucc(Chd)AfuUfCfAfagaaccgcuaL96	A-1577531.1	1421	VPusAfsgcgGfuUfCfuugaAfuGfggaugsgsu	ACCAUCCC AUUCAAGA ACCGCUA	3136
AD-955617.1	A-1804043.1	1287	cscscug(Ahd)CfcAfUfCfccauucaagaL96	A-1804044.1	1422	VPusCfsuugAfaUfGfggauGfgUfcagggsusc	GACCCUGA CCAUCCCA UUCAAGA	3137
AD-955620.1	A-1804049.1	1288	ascscau(Chd)CfcAfUfUfcaagaaccgaL96	A-1804050.1	1423	VPusCfsgguUfcUfUfgaauGfgGfaugguscsa	UGACCAUC CCAUUCAA GAACCGC	3138
AD-955621.1	A-1804051.1	1289	cscsauc(Chd)CfaUfUfCfaagaaccgcaL96	A-1804052.1	1424	VPusGfscggUfuCfUfugaaUfgGfgauggsusc	GACCAUCC CAUUCAAG AACCGCU	3139
AD-	A-1804091.1	1290	usasagu(Ahd)CfaGfC	A-1804092.1	1425	VPusCfsaauCfaUf	UAUAAGUA	3140

955641. 1			fAfgcaugauugaL96			GfcugcUfgUfacuua susa	CAGCAGCA UGAUUGA	
AD- 955642. 1	A-1804093.1	1291	asasgua(Chd)AfgCfA fGfcaugauugaaL96	A-1804094.1	1426	VPusUfscaaUfcAf UfgcugCfuGfuacuu sasus	AUAAGUAC AGCAGCAU GAUUGAC	3141
AD- 955644. 1	A-1804097.1	1292	gsusaca(Ghd)CfaGfC fAfugauugacuaL96	A-1804098.1	1427	VPusAfsgucAfaUf CfaugcUfgCfuguac susu	AAGUACAG CAGCAUGA UUGACUA	3142
AD- 955664. 1	A-1804137.1	1293	uscsuuu(Ghd)CfcUfG fGfgacaacuugaL96	A-1804138.1	1428	VPusCfsaagUfuGf UfcccaGfgCfaaaga sgsc	GCUCUUUG CCUGGGAC AACUUGA	3143
AD- 955668. 1	A-1804144.1	1294	csusuga(Ahd)CfaUfG fGfucacuuaugaL96	A-1577509.1	1429	VPusCfsauaAfgUf GfaccaUfgUfucaag susu	AACUUGAA CAUGGUCA CUUAUGA	3144
AD- 955669. 1	A-1804145.1	1295	ususgaa(Chd)AfuGfG fUfcacuuaugaaL96	A-1577563.1	1430	VPusUfscauAfaGf UfgaccAfuGfucaaa sgsu	ACUUGAAC AUGGUCAC UUAUGAC	3145
AD- 955682. 1	A-1804170.1	1296	usgsaac(Ahd)UfgGfU fCfacuuaugacaL96	A-1804171.1	1431	VPusGfsucaUfaAf GfugacCfaUfguuca sasg	CUUGAACA UGGUCACU UAUGACA	3146
AD- 955702. 1	A-1804210.1	1297	asuscaa(Ghd)CfuCfU fCfcaaugugaL96	A-1804211.1	1432	VPusCfsacaUfcUf UfggagAfgCfuuga usgsu	ACAUCAAG CUCUCCAA GAUGUGA	3147

AD- 955703. 1	A-1804212.1	1298	uscsaag(Chd)UfcUfC fCfaaugugaaL96	A-1804213.1	1433	VPusUfscacAfuCf UfuggaGfaGfcuuga susg	CAUCAAGC UCUCCAAG AUGUGAA	3148
AD- 955851. 1	A-1804508.1	1299	ususcag(Ghd)AfaUfU fGfuagucugagaL96	A-1804509.1	1434	VPusCfsucaGfaCf UfacaaUfuCfcugaa susa	UAUUCAGG AAUUGUAG UCUGAGG	3149
AD- 955886. 1	A-1804578.1	1300	usasucu(Uhd)CfuGfU fCfagcauuuauaL96	A-1804579.1	1435	VPusAfsuaaAfuGf CfugacAfgAfagaua sasa	UUUAUCUU CUGUCAGC AUUUAUG	3150
AD- 955887. 1	A-1804580.1	1301	asuscuu(Chd)UfgUfC fAfgcauuuaugaL96	A-1804581.1	1436	VPusCfsauaAfaUf GfcugaCfaGfaagau sasa	UUAUCUUC UGUCAGCA UUUAUGG	3151
AD- 955888. 1	A-1804582.1	1302	uscsuuc(Uhd)GfuCfA fGfcauuuauggaL96	A-1804583.1	1437	VPusCfscauAfaAf UfgcugAfcAfgaaga susa	UAUCUUCU GUCAGCAU UUAUGGG	3152
AD- 955889. 1	A-1804584.1	1303	csusucu(Ghd)UfcAfG fCfauuuauugggaL96	A-1804585.1	1438	VPusCfsccaUfaAf AfugcuGfaCfagaag sasu	AUCUUCUG UCAGCAUU UAUGGGA	3153
AD- 955891. 1	A-1804588.1	1304	uscsugu(Chd)AfgCfA fUfuuaugggaugaL96	A-1804589.1	1439	VPusAfsuccCfaUf AfaaugCfuGfacaga sasg	CUUCUGUC AGCAUUUA UGGGAUG	3154
AD- 955892.	A-1804590.1	1305	csusguc(Ahd)GfcAfU fUfuaugggaugaL96	A-1804591.1	1440	VPusCfsaucCfcAf UfaaaUGfcUfgacag	UUCUGUCA GCAUUUAU	3155

1						sasa	GGGAUGU	
AD-955899.1	A-1804604.1	1306	csasuuu(Ahd)UfgGfGfAfuguuuuaugaL96	A-1804605.1	1441	VPusCfsauuAfaAfCfauccCfaUfaaaugscsu	AGCAUUUAUGGGAUGUUUAAUGA	3156
AD-955900.1	A-1804606.1	1307	asusuua(Uhd)GfgGfAfUfguuuaaugaaL96	A-1804607.1	1442	VPusUfscauUfaAfAfcaucCfcAfuaaausgsc	GCAUUUAUGGGAUGUUUAAUGAC	3157
AD-955901.1	A-1804608.1	1308	ususuau(Ghd)GfgAfUfGfuuuuaugacaL96	A-1804609.1	1443	VPusGfsucaUfuAfAfacauCfcCfauaausug	CAUUUAUGGGAUGUUUAAUGACA	3158
AD-955908.1	A-1804622.1	1309	gsasugu(Uhd)UfaAfUfGfacauaguucaL96	A-1804623.1	1444	VPusGfsaacUfaUfGfucauUfaAfacaucscsc	GGGAUGUUUAAUGACAUAGUUCA	3159
AD-955917.1	A-1804640.1	1310	usgsaca(Uhd)AfgUfUfCfaaguuuucuaL96	A-1804641.1	1445	VPusAfsгааAfaCfUfugaaCfuAfugucausu	AAUGACAUAGUUCAAGUUUUCUU	3160
AD-955918.1	A-1804642.1	1311	gsascau(Ahd)GfuUfCfAfaguuuucuaL96	A-1804643.1	1446	VPusAfsagaAfaAfCfuugaAfcUfaugucsas	AUGACAUAUGUCAAGUUUCUUG	3161
AD-955919.1	A-1804644.1	1312	ascsaau(Ghd)UfuCfAfAfguuuucuugaL96	A-1804645.1	1447	VPusCfsaagAfaAfAfcuugAfaCfuauguscsa	UGACAUAGUUCAAGUUUCUUGU	3162
AD-	A-1804646.1	1313	uscsuuc(Chd)UfgAfA	A-1577515.1	1448	VPusAfsгсаAfuGf	UUUCUCC	3163

955920. 1			fAfaccauugcuaL96			GfuuuuCfaGfgaaga sasa	UGAAAACC AUUGCUC	
AD- 955921. 1	A-1804647.1	1314	csasuag(Uhd)UfcAfA fGfuuuucuuguaL96	A-1804648.1	1449	VPusAfscaaGfaAf AfacuuGfaAfcuaug susc	GACAUAGU UCAAGUUU UCUUGUG	3164
AD- 955922. 1	A-1804649.1	1315	asusagu(Uhd)CfaAfG fUfuuuucuugugaL96	A-1804650.1	1450	VPusCfsacaAfgAf AfaacuUfgAfacuau sgsu	ACAUAGUU CAAGUUUU CUUGUGA	3165
AD- 955923. 1	A-1804651.1	1316	usasguu(Chd)AfaGfU fUfuucuugugaaL96	A-1804652.1	1451	VPusUfscacAfaGf AfaaacUfuGfaacua susg	CAUAGUUC AAGUUUUC UUGUGAU	3166
AD- 955924. 1	A-1804653.1	1317	asgsuuc(Ahd)AfgUfU fUfucuugugauaL96	A-1804654.1	1452	VPusAfsucaCfaAf GfaaaaCfuUfgaacu sas	AUAGUUCA AGUUUUCU UGUGAUU	3167
AD- 955927. 1	A-1804659.1	1318	uscsaag(Uhd)UfuUfC fUfugugauuugaL96	A-1804660.1	1453	VPusCfsaaaUfcAf CfaagaAfaAfcuuga sasc	GUUCAAGU UUUCUUGU GAUUUGG	3168
AD- 955962. 1	A-1804729.1	1319	gsasaaa(Chd)CfaUfU fGfcucuugcauaL96	A-1804730.1	1454	VPusAfsugcAfaGf AfgcaaUfgGfuuuuc sasg	CUGAAAAC CAUUGCUC UUGCAUG	3169
AD- 955963. 1	A-1804731.1	1320	asasaac(Chd)AfuUfG fCfucuugcaugaL96	A-1804732.1	1455	VPusCfsaugCfaAf GfagcaAfuGfguuu uscsa	UGAAAACC AUUGCUCU UGCAUGU	3170

AD-955969.1	A-1804743.1	1321	asusugc(Uhd)CfuUfGfCfauguuacauaL96	A-1804744.1	1456	VPusAfsuguAfaCfAfuGcaAfgAfgcaausgsg	CCAUUGCU CUUGCAUG UUACAUG	3171
AD-955970.1	A-1804745.1	1322	ususgcu(Chd)UfuGfCfAfuuguacaugaL96	A-1804746.1	1457	VPusCfsaugUfaAfCfaugcAfaGfagcaasusg	CAUUGCUC UUGCAUGU UACAUGG	3172
AD-955971.1	A-1804747.1	1323	csusugc(Ahd)UfgUfUfAfaugguuacaL96	A-1577565.1	1458	VPusGfsuaaCfcAfUfguaaCfaUfgcaagsasg	CUCUUGCA UGUUACAU GGUUACC	3173
AD-955979.1	A-1804757.1	1324	csuscuu(Ghd)CfaUfGfUfuacaugguuaL96	A-1804758.1	1459	VPusAfsaccAfuGfUfaacaUfgCfaagagscsa	UGCUCUUG CAUGUUAC AUGGUUA	3174
AD-955980.1	A-1804759.1	1325	uscsuug(Chd)AfuGfUfUfacaugguuaaL96	A-1804760.1	1460	VPusUfsaacCfaUfGfuaacAfuGfcaagsgsc	GCUCUUGC AUGUUACA UGGUUAC	3175
AD-956010.1	A-1804819.1	1326	asasaag(Chd)AfuAfAfCfuucuaaaggaL96	A-1804820.1	1461	VPusCfscuuUfaGfAfauguAfuGfcuuuuususa	UAAAAAGC AUAACUUC UAAAGGA	3176
AD-956011.1	A-1804821.1	1327	asasagc(Ahd)UfaAfCfUfucuaaaggaaL96	A-1804822.1	1462	VPusUfscuuUfuAfGfaaguUfaUfgcuuuusu	AAAAAGCA UAACUUCU AAAGGAA	3177
AD-956021.1	A-1804841.1	1328	uscsuaa(Ahd)GfgAfAfGfcagaauagcaL96	A-1804842.1	1463	VPusGfscuaUfuCfUfgcuuCfcUfuuga	CUUCUAAA GGAAGCAG	3178

1						sasg	AAUAGCU	
AD-956022.1	A-1804843.1	1329	csusaaa(Ghd)GfaAfGfCfagaauagcuaL96	A-1804844.1	1464	VPusAfsgcuAfuUfCfugcuUfcCfuuuag sasa	UUCUAAAG GAAGCAGA AUAGCUC	3179
AD-956063.1	A-1804925.1	1330	asasgua(Ahd)GfaUfGfCfauuuacuacaL96	A-1804926.1	1465	VPusGfsuagUfaAfAfugcaUfcUfuacuu sas	AUAAGUAA GAUGCAUU UACUACA	3180
AD-956079.1	A-1804955.1	1331	ususcag(Ahd)UfaGfAfAfuacaguuggaL96	A-1577555.1	1466	VPusCfscaaCfuGfUfauucUfaUfcugaa sgsc	GCUUCAGA UAGAAUAC AGUUGGG	3181
AD-956087.1	A-1804970.1	1332	gsusugg(Chd)UfuCfUfAfaugcuucagaL96	A-1804971.1	1467	VPusCfsugaAfgCfAfuuagAfaGfccaac susg	CAGUUGGC UUCUAAUG CUUCAGA	3182
AD-956092.1	A-1804980.1	1333	uscsuaa(Uhd)GfcUfUfCfagauagaauaL96	A-1804981.1	1468	VPusAfsuucUfaUfCfugaaGfcAfuuaga sasg	CUUCUAAU GCUUCAGA UAGAAUA	3183
AD-956096.1	A-1804988.1	1334	asusgcu(Uhd)CfaGfAfUfagaauacagaL96	A-1804989.1	1469	VPusCfsuguAfuUfCfuauCufgAfagcau susa	UAAUGCUU CAGAUAGA AUACAGU	3184
AD-956099.1	A-1804994.1	1335	csusuca(Ghd)AfuAfGfAfaucaguugaL96	A-1804995.1	1470	VPusCfsaacUfgUfAfuucuAfuCfugaag scsa	UGCUUCAG AUAGAAUA CAGUUGG	3185

Таблица 3В

Иллюстративные немодифицированные последовательности одиночных цепей и дуплексов миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	Название антисмыслового олигонуклеотида	SEQ ID NO: (смысловая цепь)	Смысловая цепь	Диапазоны	Название антисмыслового олигонуклеотида	SEQ ID NO: (антисмысловая цепь)	Последовательность антисмысловой цепи	Диапазоны мРНК-мишеней
AD-954362.1	A-1801568.1	1471	CAGCACAGCA GAGCUUUGCA A	33-53	A-1801569.1	1606	UUGGAAAGCU CUGCUGUGCU GAG	31-53
AD-954363.1	A-1801570.1	1472	AGCACAGCAG AGCUUUGCAG A	34-54	A-1801571.1	1607	UCUGGAAAGC UCUGCUGUGC UGA	32-54
AD-954410.1	A-1801664.1	1473	AGGUUCUUCU GUGCACGUUG A	81-101	A-1801665.1	1608	UCAACGUGCAC AGAAGAACCUC A	79-101
AD-954411.1	A-1801666.1	1474	GGUUCUUCUG UGCACGUUGC A	82-102	A-1801667.1	1609	UGCAACGUGC ACAGAAGAACC CUC	80-102
AD-954548.1	A-1801939.1	1475	GCCAGUCCCA AUGAAUCCAG A	237-257	A-1801940.1	1610	UCUGGAUUCA UUGGGACUGG CCA	235-257
AD-	A-1802210.1	1476	CAGCUGGAAA	465-485	A-1577549.1	1611	UCUGGUUUGG	463-

954684.1			CCCAAACCAG A				GUUUCCAGCU GGU	485
AD- 954771.1	A-1802382.1	1477	UCCGAGACAA GUCAGUUCUG A	514-534	A-1802383.1	1612	UCAGAACUGA CUUGUCUCGG AGG	512- 534
AD- 954772.1	A-1802384.1	1478	CCGAGACAAG UCAGUUCUGG A	515-535	A-1802385.1	1613	UCCAGAACUG ACUUGUCUCG GAG	513- 535
AD- 954891.1	A-1802621.1	1479	AGGCUCCAGA GAAGUUUCUA A	668-688	A-1802622.1	1614	UUAGAAACUU CUCUGGAGCCU GG	666- 688
AD- 954892.1	A-1802623.1	1480	GGCUCCAGAG AAGUUUCUAC A	669-689	A-1802624.1	1615	UGUAGAAACU UCUCUGGAGCC UG	667- 689
AD- 954912.1	A-1802663.1	1481	GUGGAAUUU GGACACUUUG GA	689-709	A-1802664.1	1616	UCCAAAGUGU CCAAAUCCAC GU	687- 709
AD- 954913.1	A-1802665.1	1482	UGGAAUUUG GACACUUUGG CA	690-710	A-1802666.1	1617	UGCCAAAGUG UCCAAAUCCA CG	688- 710
AD- 954914.1	A-1802667.1	1483	GGAAUUUGG ACACUUUGGC CA	691-711	A-1802668.1	1618	UGGCCAAAGU GUCCAAAUCC AC	689- 711

AD- 954915.1	A-1802669.1	1484	GAAUUUGGAC ACUUUGGCCU A	692-712	A-1802670.1	1619	UAGGCCAAAG UGUCCAAAUU CCA	690- 712
AD- 954921.1	A-1802681.1	1485	GGACACUUUG GCCUUCAGG A	698-718	A-1802682.1	1620	UCCUGGAAGG CCAAAGUGUCC AA	696- 718
AD- 954934.1	A-1802707.1	1486	UCCAGGAACU GAAGUCCGAG A	712-732	A-1802708.1	1621	UCUCGGACUUC AGUUCCUGGA AG	710- 732
AD- 954937.1	A-1802713.1	1487	GUCCGAGCUA ACUGAAGUUC A	725-745	A-1577559.1	1622	UGAACUUCAG UUAGCUCGGA CUU	723- 745
AD- 954939.1	A-1802715.1	1488	UUCCUGCUUC CCGAAUUUUG A	742-762	A-1577523.1	1623	UCAAAAUUCG GGAAGCAGGA ACU	740- 762
AD- 954944.1	A-1802724.1	1489	ACUGAAGUCC GAGCUAACUG A	719-739	A-1802725.1	1624	UCAGUUAGCU CGGACUUCAG UUC	717- 739
AD- 954951.1	A-1802738.1	1490	CGAGCUAACU GAAGUCCUG A	728-748	A-1802739.1	1625	UCAGGAACUU CAGUUAGCUC GGA	726- 748
AD- 954958.1	A-1802752.1	1491	ACUGAAGUUC CUGCUUCCCG	735-755	A-1802753.1	1626	UCGGGAAGCA GGAACUUCAG	733- 755

			A				UUA	
AD- 954964.1	A-1802764.1	1492	GUUCCUGCUU CCCGAAUUUU A	741-761	A-1802765.1	1627	UAAAAUUCGG GAAGCAGGAA CUU	739- 761
AD- 954965.1	A-1802766.1	1493	UCCUGCUUCC CGAAUUUUGA A	743-763	A-1802767.1	1628	UUCAAAAUUC GGGAAGCAGG AAC	741- 763
AD- 954966.1	A-1802768.1	1494	CCUGCUUCCC GAAUUUUGA AA	744-764	A-1802769.1	1629	UUUCAAAAUU CGGGAAGCAG GAA	742- 764
AD- 954967.1	A-1802770.1	1495	CUGCUUCCCG AAUUUUGAA GA	745-765	A-1802771.1	1630	UCUUCAAAAU UCGGGAAGCA GGA	743- 765
AD- 954968.1	A-1802772.1	1496	UGCUUCCCGA AUUUUGAAG GA	746-766	A-1802773.1	1631	UCCUUCAAAA UUCGGGAAGC AGG	744- 766
AD- 954970.1	A-1802776.1	1497	CUUCCCGAAU UUUGAAGGA GA	748-768	A-1802777.1	1632	UCUCCUUCAAA AUUCGGGAAG CA	746- 768
AD- 954992.1	A-1802818.1	1498	CGGAUGUGGA GAACUAGUUU A	806-826	A-1577507.1	1633	UAAACUAGUU CUCCACAUCCG GU	804- 826
AD-	A-1802819.1	1499	GGAUGUGGA	807-827	A-1577525.1	1634	UCAAACUAGU	805-

954993.1			GAACUAGUUU GA				UCUCCACAUCC GG	827
AD- 955030.1	A-1802892.1	1500	GAUGUGGAG AACUAGUUUG GA	808-828	A-1802893.1	1635	UCCAAACUAG UUCUCCACAUC CG	806- 828
AD- 955031.1	A-1802894.1	1501	AUGUGGAGA ACUAGUUUGG GA	809-829	A-1802895.1	1636	UCCCAAACUAG UUCUCCACAUC C	807- 829
AD- 955032.1	A-1802896.1	1502	UGUGGAGAAC UAGUUUGGG UA	810-830	A-1802897.1	1637	UACCCAAACUA GUUCUCCACAU C	808- 830
AD- 955034.1	A-1802900.1	1503	UGGAGAACUA GUUUGGGUA GA	812-832	A-1802901.1	1638	UCUACCCAAAC UAGUUCUCCAC A	810- 832
AD- 955035.1	A-1802902.1	1504	GGAGAACUAG UUUGGGUAG GA	813-833	A-1802903.1	1639	UCCUACCCAAA CUAGUUCUCCA C	811- 833
AD- 955037.1	A-1802906.1	1505	AGAACUAGUU UGGGUAGGA GA	815-835	A-1802907.1	1640	UCUCCUACCCA AACUAGUUCU CC	813- 835
AD- 955074.1	A-1802979.1	1506	AACAGCAGAA ACAAUUACUG A	851-871	A-1802980.1	1641	UCAGUAAUUG UUUCUGCUGU UCU	849- 871

AD- 955075.1	A-1802981.1	1507	ACAGCAGAAA CAAUUACUGG A	852-872	A-1802982.1	1642	UCCAGUAAUU GUUUCUGCUG UUC	850- 872
AD- 955082.1	A-1802995.1	1508	AACAAUUACU GGCAAGUAUG A	860-880	A-1802996.1	1643	UCAUACUUGCC AGUAAUUGUU UC	858- 880
AD- 955083.1	A-1802997.1	1509	ACAAUUACUG GCAAGUAUGG A	861-881	A-1802998.1	1644	UCCAUACUUGC CAGUAAUUGU UU	859- 881
AD- 955084.1	A-1802999.1	1510	CAAUUACUGG CAAGUAUGGU A	862-882	A-1803000.1	1645	UACCAUACUU GCCAGUAAUU GUU	860- 882
AD- 955085.1	A-1803001.1	1511	AAUUACUGGC AAGUAUGGU GA	863-883	A-1803002.1	1646	UCACCAUACUU GCCAGUAAUU GU	861- 883
AD- 955086.1	A-1803003.1	1512	AUUACUGGCA AGUAUGGUG UA	864-884	A-1803004.1	1647	UACACCAUACU UGCCAGUAAU UG	862- 884
AD- 955087.1	A-1803005.1	1513	UUACUGGCAA GUAUGGUGU GA	865-885	A-1803006.1	1648	UCACACCAUAC UUGCCAGUAA UU	863- 885
AD- 955097.1	A-1803025.1	1514	GUAUGGUGU GUGGAUGCGA	875-895	A-1803026.1	1649	UCUCGCAUCCA CACACCAUACU	873- 895

			GA				U	
AD- 955144.1	A-1803119.1	1515	GAUGUCCGCC AGGUUUUUG AA	957-977	A-1803120.1	1650	UUCAAAAACC UGGCGGACAU CCG	955- 977
AD- 955146.1	A-1803122.1	1516	CCGCCAGGUU UUUGAGUAU GA	962-982	A-1577537.1	1651	UCAUACUCAA AAACCUGGCG GAC	960- 982
AD- 955148.1	A-1803124.1	1517	GACCUCAUCA GCCAGUUUAU A	981-1001	A-1577573.1	1652	UAUAAACUGG CUGAUGAGGU CAU	979- 1001
AD- 955165.1	A-1803152.1	1518	UUUGAGUAU GACCUCAUCA GA	972-992	A-1803153.1	1653	UCUGAUGAGG UCAUACUCAA AAA	970- 992
AD- 955174.1	A-1803170.1	1519	ACCUCAUCAG CCAGUUUAUG A	982-1002	A-1803171.1	1654	UCAUAAACUG GCUGAUGAGG UCA	980- 1002
AD- 955175.1	A-1803172.1	1520	CCUCAUCAGC CAGUUUAUGC A	983-1003	A-1803173.1	1655	UGCAUAAACU GGCUGAUGAG GUC	981- 1003
AD- 955177.1	A-1803176.1	1521	UCAUCAGCCA GUUUAUGCAG A	985-1005	A-1803177.1	1656	UCUGCAUAAA CUGGCUGAUG AGG	983- 1005
AD-	A-1803208.1	1522	GCAGGGCUAC	1001-1021	A-1803209.1	1657	UCCUUAGAAG	999-

955193.1			CCUUCUAAGG A				GGUAGCCCUGC AU	1021
AD- 955194.1	A-1803210.1	1523	CAGGGCUACC CUUCUAAGGU A	1002-1022	A-1803211.1	1658	UACCUUAGAA GGGUAGCCCU GCA	1000- 1022
AD- 955196.1	A-1803214.1	1524	GGGCUACCCU UCUAAGGUUC A	1004-1024	A-1803215.1	1659	UGAACCUUAG AAGGGUAGCC CUG	1002- 1024
AD- 955199.1	A-1803220.1	1525	CUUCUAAGGU UCACAUACUG A	1012-1032	A-1803221.1	1660	UCAGUAUGUG AACCUUAGAA GGG	1010- 1032
AD- 955200.1	A-1803222.1	1526	UUCUAAGGUU CACAUACUGC A	1013-1033	A-1803223.1	1661	UGCAGUAUGU GAACCUUAGA AGG	1011- 1033
AD- 955255.1	A-1803331.1	1527	GAGUCCAGAA CUGUCAUAAG A	1095-1115	A-1577519.1	1662	UCUUAUGACA GUUCUGGACU CAG	1093- 1115
AD- 955266.1	A-1803352.1	1528	GUCCAGAACU GUCAUAAGAU A	1097-1117	A-1803353.1	1663	UAUCUUAUGA CAGUUCUGGA CUC	1095- 1117
AD- 955269.1	A-1803358.1	1529	CAGAACUGUC AUAAGAUAU GA	1100-1120	A-1803359.1	1664	UCAUAUCUUA UGACAGUUCU GGA	1098- 1120

AD- 955270.1	A-1803360.1	1530	AGAACUGUCA UAAGAU AUG AA	1101-1121	A-1803361.1	1665	UUCAUAUCUU AUGACAGUUC UGG	1099- 1121
AD- 955271.1	A-1803362.1	1531	GAACUGUCAU AAGAU AUGA GA	1102-1122	A-1803363.1	1666	UCUCAUAUCU UAUGACAGUU CUG	1100- 1122
AD- 955272.1	A-1803364.1	1532	AACUGUCAUA AGAU AUGAGC A	1103-1123	A-1803365.1	1667	UGCUCAUAUC UUAUGACAGU UCU	1101- 1123
AD- 955281.1	A-1803382.1	1533	AAGAU AUGA GCUGAAUACC GA	1112-1132	A-1803383.1	1668	UCGGUAUUCA GCUCAUAUCU UAU	1110- 1132
AD- 955282.1	A-1803384.1	1534	AGAU AUGAGC UGAAU ACCGA A	1113-1133	A-1803385.1	1669	UUCGGUAUUC AGCUCAUAUC UUA	1111- 1133
AD- 955283.1	A-1803386.1	1535	GAUAUGAGCU GAAU ACCGAG A	1114-1134	A-1803387.1	1670	UCUCGGUAUU CAGCUCAUAUC UU	1112- 1134
AD- 955292.1	A-1803404.1	1536	UGAAU ACCGA GACAGUGAAG A	1123-1143	A-1803405.1	1671	UCUUCACUGUC UCGGUAUUCA GC	1121- 1143
AD- 955293.1	A-1803406.1	1537	GAAU ACCGAG ACAGUGAAGG	1124-1144	A-1803407.1	1672	UCCUUCACUGU CUCGGUAUUC	1122- 1144

			A				AG	
AD-955308.1	A-1803434.1	1538	CCACGGACAG UUCCCGUAUU A	1172-1192	A-1577539.1	1673	UAAUACGGGA ACUGUCCGUG GUA	1170-1192
AD-955309.1	A-1803435.1	1539	CACGGACAGU UCCCGUAUUC A	1173-1193	A-1577529.1	1674	UGAAUACGGG AACUGUCCGU GGU	1171-1193
AD-955310.1	A-1803436.1	1540	ACGGACAGUU CCCGUAUUCU A	1174-1194	A-1577521.1	1675	UAGAAUACGG GAACUGUCCG UGG	1172-1194
AD-955343.1	A-1803501.1	1541	ACCACGGACA GUUCCCGUAU A	1171-1191	A-1803502.1	1676	UAUACGGGAA CUGUCCGUGG UAG	1169-1191
AD-955344.1	A-1803503.1	1542	CGGACAGUUC CCGUAUUCUU A	1175-1195	A-1803504.1	1677	UAAGAAUACG GGAACUGUCC GUG	1173-1195
AD-955345.1	A-1803505.1	1543	GGACAGUUCC CGUAUUCUUG A	1176-1196	A-1803506.1	1678	UCAAGAAUAC GGGAACUGUC CGU	1174-1196
AD-955346.1	A-1803507.1	1544	GACAGUUCCC GUAUUCUUGG A	1177-1197	A-1803508.1	1679	UCCAAGAAUA CGGGAACUGU CCG	1175-1197
AD-	A-1803585.1	1545	CAGGCCUCUG	1234-1254	A-1803586.1	1680	UGUAAAUGAC	1232-

955385.1			GGUCAUUUAC A				CCAGAGGCCUG CU	1254
AD- 955386.1	A-1803587.1	1546	AGGCCUCUGG GUCAUUUACA A	1235-1255	A-1803588.1	1681	UUGUAAAUGA CCCAGAGGCCU GC	1233- 1255
AD- 955387.1	A-1803589.1	1547	GGCCUCUGGG UCAUUUACAG A	1236-1256	A-1803590.1	1682	UCUGUAAAUG ACCCAGAGGCC UG	1234- 1256
AD- 955415.1	A-1803645.1	1548	AGGCCAAAGG UGCCAUUGUC A	1264-1284	A-1803646.1	1683	UGACAAUGGC ACCUUUGGCCU CA	1262- 1284
AD- 955427.1	A-1803669.1	1549	CCAUUGUCCU CUCCAAACUG A	1276-1296	A-1803670.1	1684	UCAGUUUGGA GAGGACAAUG GCA	1274- 1296
AD- 955504.1	A-1803823.1	1550	GUCGCCAAUG CCUUCAUCAU A	1353-1373	A-1803824.1	1685	UAUGAUGAAG GCAUUGGCGA CUG	1351- 1373
AD- 955570.1	A-1803953.1	1551	UACCGUCAAC UUUGCUUAUG A	1418-1438	A-1803954.1	1686	UCAUAAGCAA AGUUGACGGU AGC	1416- 1438
AD- 955571.1	A-1803955.1	1552	ACCGUCAACU UUUGCUUAUGA A	1419-1439	A-1803956.1	1687	UUCAUAAGCA AAGUUGACGG UAG	1417- 1439

AD- 955572.1	A-1803957.1	1553	CCGUCAACUU UGCUUAUGAC A	1420-1440	A-1803958.1	1688	UGUCAUAAGC AAAGUUGACG GUA	1418- 1440
AD- 955586.1	A-1803985.1	1554	UAUGACACAG GCACAGGUAU A	1434-1454	A-1803986.1	1689	UAUACCUGUG CCUGUGUCAU AAG	1432- 1454
AD- 955612.1	A-1804037.1	1555	ACCCUGACCA UCCCAUUCAA A	1461-1481	A-1804038.1	1690	UUUGAAUGGG AUGGUCAGGG UCU	1459- 1481
AD- 955615.1	A-1804041.1	1556	CAUCCCAUUC AAGAACCGCU A	1469-1489	A-1577531.1	1691	UAGCGGUUCU UGAAUGGGAU GGU	1467- 1489
AD- 955617.1	A-1804043.1	1557	CCCUGACCAU CCCAUUCAAG A	1462-1482	A-1804044.1	1692	UCUUGAAUGG GAUGGUCAGG GUC	1460- 1482
AD- 955620.1	A-1804049.1	1558	ACCAUCCCAU UCAAGAACCG A	1467-1487	A-1804050.1	1693	UCGGUUCUUG AAUGGGAUGG UCA	1465- 1487
AD- 955621.1	A-1804051.1	1559	CCAUCCCAU CAAGAACCGC A	1468-1488	A-1804052.1	1694	UGCGGUUCUU GAAUGGGAUG GUC	1466- 1488
AD- 955641.1	A-1804091.1	1560	UAAGUACAGC AGCAUGAUUG	1490-1510	A-1804092.1	1695	UCAAUCAUGC UGCUGUACUU	1488- 1510

			A				AUA	
AD-955642.1	A-1804093.1	1561	AAGUACAGCA GCAUGAUUGA A	1491-1511	A-1804094.1	1696	UUCAAUCAUG CUGCUGUACU UAU	1489-1511
AD-955644.1	A-1804097.1	1562	GUACAGCAGC AUGAUUGACU A	1493-1513	A-1804098.1	1697	UAGUCAAUCA UGCUGCUGUA CUU	1491-1513
AD-955664.1	A-1804137.1	1563	UCUUUGCCUG GGACAACUUG A	1534-1554	A-1804138.1	1698	UCAAGUUGUC CCAGGCAAAG AGC	1532-1554
AD-955668.1	A-1804144.1	1564	CUUGAACAUG GUCACUUAUG A	1550-1570	A-1577509.1	1699	UCAUAAGUGA CCAUGUUCAA GUU	1548-1570
AD-955669.1	A-1804145.1	1565	UUGAACAUGG UCACUUAUGA A	1551-1571	A-1577563.1	1700	UUCAUAAGUG ACCAUGUUCA AGU	1549-1571
AD-955682.1	A-1804170.1	1566	UGAACAUGGU CACUUAUGAC A	1552-1572	A-1804171.1	1701	UGUCAUAAGU GACCAUGUUC AAG	1550-1572
AD-955702.1	A-1804210.1	1567	AUCAAGCUCU CCAAGAUGUG A	1572-1592	A-1804211.1	1702	UCACAUCUUG GAGAGCUUGA UGU	1570-1592
AD-	A-1804212.1	1568	UCAAGCUCUC	1573-1593	A-1804213.1	1703	UUCACAUCUU	1571-

955703.1			CAAGAUGUGA A				GGAGAGCUUG AUG	1593
AD- 955851.1	A-1804508.1	1569	UUCAGGAAUU GUAGUCUGAG A	1752-1772	A-1804509.1	1704	UCUCAGACUAC AAUUCCUGAA UA	1750- 1772
AD- 955886.1	A-1804578.1	1570	UAUCUUCUGU CAGCAUUUAU A	1804-1824	A-1804579.1	1705	UAUAAAUGCU GACAGAAGAU AAA	1802- 1824
AD- 955887.1	A-1804580.1	1571	AUCUUCUGUC AGCAUUUAUG A	1805-1825	A-1804581.1	1706	UCAUAAAUGC UGACAGAAGA UAA	1803- 1825
AD- 955888.1	A-1804582.1	1572	UCUUCUGUCA GCAUUUAUGG A	1806-1826	A-1804583.1	1707	UCCAUAAAUG CUGACAGAAG AUA	1804- 1826
AD- 955889.1	A-1804584.1	1573	CUUCUGUCAG CAUUUAUGGG A	1807-1827	A-1804585.1	1708	UCCCAUAAAU GCUGACAGAA GAU	1805- 1827
AD- 955891.1	A-1804588.1	1574	UCUGUCAGCA UUUAUGGGA UA	1809-1829	A-1804589.1	1709	UAUCCCAUAA AUGCUGACAG AAG	1807- 1829
AD- 955892.1	A-1804590.1	1575	CUGUCAGCAU UUAUGGGAU GA	1810-1830	A-1804591.1	1710	UCAUCCCAUAA AUGCUGACAG AA	1808- 1830

AD-955899.1	A-1804604.1	1576	CAUUUAUGGG AUGUUUAAU GA	1817-1837	A-1804605.1	1711	UCAUUAAACA UCCCAUAAAU GCU	1815-1837
AD-955900.1	A-1804606.1	1577	AUUUAUGGG AUGUUUAAU GAA	1818-1838	A-1804607.1	1712	UUCAUUAAAC AUCCCAUAAA UGC	1816-1838
AD-955901.1	A-1804608.1	1578	UUUAUGGGA UGUUUAAUG ACA	1819-1839	A-1804609.1	1713	UGUCAUUAAA CAUCCCAUAAA UG	1817-1839
AD-955908.1	A-1804622.1	1579	GAUGUUUAA UGACAUAGUU CA	1826-1846	A-1804623.1	1714	UGAACUAUGU CAUUAACAUC CCC	1824-1846
AD-955917.1	A-1804640.1	1580	UGACAUAGUU CAAGUUUUCU A	1835-1855	A-1804641.1	1715	UAGAAAACUU GAACUAUGUC AUU	1833-1855
AD-955918.1	A-1804642.1	1581	GACAUAGUUC AAGUUUUCUU A	1836-1856	A-1804643.1	1716	UAAGAAAACU UGAACUAUGU CAU	1834-1856
AD-955919.1	A-1804644.1	1582	ACAUAGUUCA AGUUUUCUUG A	1837-1857	A-1804645.1	1717	UCAAGAAAAC UUGAACUAUG UCA	1835-1857
AD-955920.1	A-1804646.1	1583	UCUUCCUGAA AACCAUUGCU	1891-1911	A-1577515.1	1718	UAGCAAUGGU UUUCAGGAAG	1889-1911

			A				AAA	
AD- 955921.1	A-1804647.1	1584	CAUAGUUCAA GUUUUCUUGU A	1838-1858	A-1804648.1	1719	UACAAGAAAA CUUGAACUAU GUC	1836- 1858
AD- 955922.1	A-1804649.1	1585	AUAGUUCAAG UUUUCUUGUG A	1839-1859	A-1804650.1	1720	UCACAAGAAA ACUUGAACUA UGU	1837- 1859
AD- 955923.1	A-1804651.1	1586	UAGUUCAAGU UUUCUUGUGA A	1840-1860	A-1804652.1	1721	UUCACAAGAA AACUUGAACU AUG	1838- 1860
AD- 955924.1	A-1804653.1	1587	AGUUCAAGUU UUCUUGUGAU A	1841-1861	A-1804654.1	1722	UAUCACAAGA AAACUUGAAC UAU	1839- 1861
AD- 955927.1	A-1804659.1	1588	UCAAGUUUUC UUGUGAUUU GA	1844-1864	A-1804660.1	1723	UCAAUUCACA AGAAAACUUG AAC	1842- 1864
AD- 955962.1	A-1804729.1	1589	GAAAACCAUU GCUCUUGCAU A	1898-1918	A-1804730.1	1724	UAUGCAAGAG CAAUGGUUUU CAG	1896- 1918
AD- 955963.1	A-1804731.1	1590	AAAACCAUUG CUCUUGCAUG A	1899-1919	A-1804732.1	1725	UCAUGCAAGA GCAAUGGUUU UCA	1897- 1919
AD-	A-1804743.1	1591	AUUGCUCUUG	1905-1925	A-1804744.1	1726	UAUGUAACAU	1903-

955969.1			CAUGUUACAU A				GCAAGAGCAA UGG	1925
AD- 955970.1	A-1804745.1	1592	UUGCUCUUGC AUGUUACAUG A	1906-1926	A-1804746.1	1727	UCAUGUAACA UGCAAGAGCA AUG	1904- 1926
AD- 955971.1	A-1804747.1	1593	CUUGCAUGUU ACAUGGUUAC A	1911-1931	A-1577565.1	1728	UGUAACCAUG UAACAUGCAA GAG	1909- 1931
AD- 955979.1	A-1804757.1	1594	CUCUUGCAUG UUACAUGGUU A	1909-1929	A-1804758.1	1729	UAACCAUGUA ACAUGCAAGA GCA	1907- 1929
AD- 955980.1	A-1804759.1	1595	UCUUGCAUGU UACAUGGUUA A	1910-1930	A-1804760.1	1730	UUAACCAUGU AACAUGCAAG AGC	1908- 1930
AD- 956010.1	A-1804819.1	1596	AAAAGCAUAA CUUCUAAAGG A	1945-1965	A-1804820.1	1731	UCCUUUAGAA GUUAUGCUUU UUA	1943- 1965
AD- 956011.1	A-1804821.1	1597	AAAGCAUAAC UUCUAAAGGA A	1946-1966	A-1804822.1	1732	UUCCUUUAGA AGUUAUGCUU UUU	1944- 1966
AD- 956021.1	A-1804841.1	1598	UCUAAAGGAA GCAGAAUAGC A	1957-1977	A-1804842.1	1733	UGCUAUUCUG CUUCCUUUAG AAG	1955- 1977

AD-956022.1	A-1804843.1	1599	CUAAAGGAAG CAGAAUAGCU A	1958-1978	A-1804844.1	1734	UAGCUAUUCU GCUUCCUUUA GAA	1956-1978
AD-956063.1	A-1804925.1	1600	AAGUAAGAU GCAUUUACUA CA	1999-2019	A-1804926.1	1735	UGUAGUAAAU GCAUCUUACU UAU	1997-2019
AD-956079.1	A-1804955.1	1601	UUCAGAUAGA AUACAGUUGG A	2035-2055	A-1577555.1	1736	UCCAACUGUA UUCUAUCUGA AGC	2033-2055
AD-956087.1	A-1804970.1	1602	GUUGGCUUCU AAUGCUUCAG A	2020-2040	A-1804971.1	1737	UCUGAAGCAU UAGAAGCCAA CUG	2018-2040
AD-956092.1	A-1804980.1	1603	UCUAAUGCUU CAGAUAGAAU A	2027-2047	A-1804981.1	1738	UAUUCUAUCU GAAGCAUUAG AAG	2025-2047
AD-956096.1	A-1804988.1	1604	AUGCUUCAGA UAGAAUACAG A	2031-2051	A-1804989.1	1739	UCUGUAUUCU AUCUGAAGCA UUA	2029-2051
AD-956099.1	A-1804994.1	1605	CUUCAGAUAG AAUACAGUUG A	2034-2054	A-1804995.1	1740	UCAACUGUAU UCUAUCUGAA GCA	2032-2054

Таблица 4А

Иллюстративные модифицированные последовательности одиночных цепей и дуплексов миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	Название последовательности смысловой цепи	SEQ ID NO: (смысловая цепь)	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	Название антисмысловой последовательности	SEQ ID NO: (антисмысловая цепь)	Последовательность антисмысловой цепи	Последовательность мРНК-мишени	SEQ ID NO:
AD-956571.1	A-1802311.1	1741	csgsaga(Chd)AfaGfUfCfaguucuggaaL96	A-1805498.1	1875	VPusUfscag(Agn)acugacUfuGfucucgsgsa	UCCGAGACAAGUCAGUUCUGGAG	3186
AD-956690.1	A-1802623.1	1742	gsgscuc(Chd)AfgAfGfAfaguuucuacaL96	A-1805617.1	1876	VPusGfsuaga(Agn)acuuCuCfuGfgagccsusg	CAGGCUCCAGAGAAGUUUCUACG	3187
AD-956709.1	A-1802661.1	1743	csgsugg(Ahd)AfuUfUfGfgacacuuugaL96	A-1805636.1	1877	VPusCfsaaag(Tgn)guccaaAfuUfccacgsusa	UACGUGGA AUUUGGACACUUUGG	3188
AD-956710.1	A-1802663.1	1744	gsusgga(Ahd)UfuUfGfGfacacuuuggaL96	A-1805637.1	1878	VPusCfscaaa(Ggn)uguccaAfaUfuccacsgsu	ACGUGGAAUUUGGACACUUUGGC	3189
AD-956732.1	A-1802705.1	1745	ususcca(Ghd)GfaAfCfUfgaaguccgaaL96	A-1805659.1	1879	VPusUfscgga(Cgn)uucaGuUfcCfuggaasgsg	CCUCCAGGAACUGAAGUCCGAG	3190
AD-	A-1802726.1	1746	csusgaa(Ghd)UfcCf	A-1805668.1	1880	VPusUfscagu(Tgn)agcu	AACUGAAG	3191

956741.1			GfAfgcuaacugaaL9 6			cgGfaCfuucagsusu	UCCGAGCU AACUGAA	
AD- 956744.1	A-1802732.1	1747	asasguc(Chd)GfaGf CfUfaacugaaguaL9 6	A-1805671.1	1881	VPusAfscuuc(Agn)guua gcUfcGfgacuuscsa	UGAAGUCC GAGCUAAC UGAAGUU	3192
AD- 956745.1	A-1802734.1	1748	asgsucc(Ghd)AfgCf UfAfacugaaguuaL9 6	A-1805672.1	1882	VPusAfsacuu(Cgn)agu agCfuCfpggacususc	GAAGUCCG AGCUAACU GAAGUUC	3193
AD- 956746.1	A-1802713.1	1749	gsusccg(Ahd)GfcUf AfAfcugaaguucaL9 6	A-1805673.1	1883	VPusGfsaacu(Tgn)cagu uaGfcUfcggacsusu	AAGUCCGA GCUAACUG AAGUUC	3194
AD- 956747.1	A-1802714.1	1750	uscscga(Ghd)CfuAf AfCfugaaguuccaL9 6	A-1805674.1	1884	VPusGfsgaac(Tgn)ucag uuAfgCfucggascsu	AGUCCGAG CUAACUGA AGUUCCU	3195
AD- 956748.1	A-1802736.1	1751	cscsgag(Chd)UfaAf CfUfgaaguuccuaL9 6	A-1805675.1	1885	VPusAfsggaa(Cgn)uua guUfaGfcucggsasc	GUCCGAGC UAAUGAA GUUCCUG	3196
AD- 956749.1	A-1802738.1	1752	csgsagc(Uhd)AfaCf UfGfaaguuccugaL9 6	A-1805676.1	1886	VPusCfsagga(Agn)cuuc agUfuAfgcucgsgsa	UCCGAGCU AACUGAAG UUCCUGC	3197
AD- 956760.1	A-1802760.1	1753	asasguu(Chd)CfuGf CfUfucccgaaauuaL9 6	A-1805687.1	1887	VPusAfsauuc(Ggn)ggaa gcAfgGfaacuuscsa	UGAAGUUC CUGCUUCC CGAAUUU	3198

AD-956761.1	A-1802762.1	1754	asgsuuc(Chd)UfgCf UfUfccccgaauuuuL9 6	A-1805688.1	1888	VPusAfsaaau(Cgn)ggga agCfaGfgaacususc	GAAGUUCC UGCUUCCC GAAUUUU	3199
AD-956762.1	A-1802764.1	1755	gsusucc(Uhd)GfcUf UfCfccgaauuuuL9 6	A-1805689.1	1889	VPusAfsaaau(Tgn)cggg aaGfcAfggaacsusu	AAGUUCCU GCUUCCCG AAUUUUG	3200
AD-956763.1	A-1802715.1	1756	ususccu(Ghd)CfuUf CfCfcgaauuuugaL9 6	A-1805690.1	1890	VPusCfsaaaa(Tgn)ucgg gaAfgCfaggaascsu	AGUUCCUG CUUCCCGA AUUUUGA	3201
AD-956764.1	A-1802766.1	1757	uscscug(Chd)UfuCf CfCfgaauuuugaaL9 6	A-1805691.1	1891	VPusUfscaaa(Agn)uucg ggAfaGfcaggasasc	GUUCCUGC UUCCCGAA UUUUGAA	3202
AD-956765.1	A-1802768.1	1758	cscsugc(Uhd)UfcCf CfGfaauuuugaaaL9 6	A-1805692.1	1892	VPusUfsucaa(Agn)auuc ggGfaAfgcaggsasa	UUCCUGCU UCCCGAAU UUUGAAG	3203
AD-956766.1	A-1802770.1	1759	csusgcu(Uhd)CfcCf GfAfaauuuugaagaL9 6	A-1805693.1	1893	VPusCfsuua(Agn)aaau cgGfgAfagcagsgsa	UCCUGCUU CCCGAAUU UUGAAGG	3204
AD-956769.1	A-1802776.1	1760	csusucc(Chd)GfaAf UfUfuugaaggagaL9 6	A-1805696.1	1894	VPusCfsuccu(Tgn)caaa auUfcGfggaagscsa	UGCUUCCC GAAUUUUG AAGGAGA	3205
AD-956827.1	A-1802818.1	1761	csgsgau(Ghd)UfgG fAfGfaacuaguuuuL	A-1805754.1	1895	VPusAfsaacu(Agn)guuc ucCfaCfauccgsgsu	ACCGGAUG UGGAGAAC	3206

			96				UAGUUUG	
AD-956828.1	A-1802819.1	1762	gsgsaug(Uhd)GfgA fGfAfacuaguuugaL 96	A-1805755.1	1896	VPusCfsaaac(Tgn)aguu cuCfcAfcauccsgsg	CCGGAUGU GGAGAACU AGUUUGG	3207
AD-956831.1	A-1802896.1	1763	usgsugg(Ahd)GfaA fCfUfaguuuggguaL 96	A-1805758.1	1897	VPusAfsccca(Agn)acua guUfcUfccacasusc	GAUGUGGA GAACUAGU UUGGGUA	3208
AD-956872.1	A-1802979.1	1764	asascag(Chd)AfgAf AfAfcauuacugaL9 6	A-1805799.1	1898	VPusCfsagua(Agn)uugu uuCfuGfcuguuscsu	AGAACAGC AGAAACAA UUACUGG	3209
AD-956873.1	A-1802981.1	1765	ascsgac(Ahd)GfaAf AfCfaauuacuggaL9 6	A-1805800.1	1899	VPusCfscagu(Agn)auug uuUfcUfgcugususc	GAACAGCA GAAACAAU UACUGGC	3210
AD-956874.1	A-1802983.1	1766	csasgca(Ghd)AfaAf CfAfauuacuggcaL9 6	A-1805801.1	1900	VPusGfscag(Tgn)aaau guUfuCfugcugsusu	AACAGCAG AAACAAUU ACUGGCA	3211
AD-956877.1	A-1802920.1	1767	csasgaa(Ahd)CfaAf UfUfacuggcaagaL9 6	A-1805804.1	1901	VPusCfsuugc(Cgn)agua auUfgUfuucugscsu	AGCAGAAA CAAUUACU GGCAAGU	3212
AD-956880.1	A-1802993.1	1768	asasaca(Ahd)UfuAf CfUfggcaaguauaL9 6	A-1805807.1	1902	VPusAfsuacu(Tgn)gcca guAfaUfuguuuscsu	AGAAACAA UUACUGGC AAGUAUG	3213
AD-	A-1802995.1	1769	asascaa(Uhd)UfaCf	A-1805808.1	1903	VPusCfsauac(Tgn)ugcc	GAAACAAU	3214

956881.1			UfGfgcaaguaL9 6			agUfaAfuuguususc	UACUGGCA AGUAUGG	
AD- 956887.1	A-1803007.1	1770	usascug(Ghd)CfaAf GfUfaugguguguaL9 6	A-1805814.1	1904	VPusAfsca(Cgn)caua cuUfgCfcaguasasu	AUUACUGG CAAGUAUG GUGUGUG	3215
AD- 956947.1	A-1803121.1	1771	uscscgc(Chd)AfgGf UfUfuugaguauaL9 6	A-1805874.1	1905	VPusAfsuacu(Cgn)aaaa acCfuGfgcgascsa	UGUCCGCC AGGUUUUU GAGUAUG	3216
AD- 956949.1	A-1803123.1	1772	csgscca(Ghd)GfuUf UfUfugaguaugaaL9 6	A-1805876.1	1906	VPusUfscaua(Cgn)ucaa aaAfcCfuggcgsgsa	UCCGCCAG GUUUUUGA GUAUGAC	3217
AD- 956958.1	A-1803152.1	1773	ususuga(Ghd)UfaU fGfAfccucaucagaL 96	A-1805885.1	1907	VPusCfsugau(Ggn)aggu caUfaCfucaaasasa	UUUUUGAG UAUGACCU CAUCAGC	3218
AD- 956967.1	A-1803124.1	1774	gsascu(Chd)AfuCf AfGfccaguuuauaL9 6	A-1805894.1	1908	VPusAfsuaaa(Cgn)uggc ugAfuGfaggucsasu	AUGACCUC AUCAGCCA GUUUAUG	3219
AD- 956968.1	A-1803170.1	1775	ascscuc(Ahd)UfcAf GfCfcaguuuauaL9 6	A-1805895.1	1909	VPusCfsauaa(Agn)cugg cuGfaUfgagguscsa	UGACCUCA UCAGCCAG UUUAUGC	3220
AD- 956992.1	A-1803125.1	1776	gscsuac(Chd)CfuUf CfUfaagguucacaL9 6	A-1805919.1	1910	VPusGfsugaa(Cgn)cuua gaAfgGfguagcscsc	GGGCUACC CUUCUAAG GUUCACA	3221

AD-956998.1	A-1803220.1	1777	csusucu(Ahd)AfgGfUfUfcacauacugaL96	A-1805925.1	1911	VPusCfsagua(Tgn)gugaacCfuUfagaagsgsg	CCCUUCUAAGGUUCACAUACUGC	3222
AD-956999.1	A-1803222.1	1778	ususcua(Ahd)GfgUfUfCfacauacugcaL96	A-1805926.1	1912	VPusGfscagu(Agn)ugugaaCfcUfuagaasgsg	CCUUCUAAAGGUUCACAUACUGCC	3223
AD-957000.1	A-1803224.1	1779	uscsuaa(Ghd)GfuUfCfAfcauacugccaL96	A-1805927.1	1913	VPusGfsgcag(Tgn)augugaAfcCfuugasasg	CUUCUAAGGUUCACAUACUGCCU	3224
AD-957063.1	A-1803331.1	1780	gsasguc(Chd)AfgAfAfCfugucauaagaL96	A-1805990.1	1914	VPusCfsuuau(Ggn)acaguCfuGfgacucsasg	CUGAGUCCAGAACUGUCAUAAGA	3225
AD-957064.1	A-1803350.1	1781	asgsucc(Ahd)GfaAfCfUfgucauaagaaL96	A-1805991.1	1915	VPusUfscuuu(Tgn)gacaguUfcUfggacuscsa	UGAGUCCAGAACUGUCAUAAGAU	3226
AD-957065.1	A-1803352.1	1782	gsuscca(Ghd)AfaCfUfGfucuaagauaL96	A-1805992.1	1916	VPusAfsucuu(Agn)ugacagUfuCfuggacsusc	GAGUCCAGAACUGUCAUAAGAUA	3227
AD-957068.1	A-1803358.1	1783	csasgaa(Chd)UfgUfCfAfuaagauaugaL96	A-1805995.1	1917	VPusCfsauau(Cgn)uuauaCfaGfuucugsgsa	UCCAGAACUGUCAUAAGAUA	3228
AD-957069.1	A-1803360.1	1784	asgsaac(Uhd)GfuCfAfUfaagauaugaL96	A-1805996.1	1918	VPusUfscuuu(Tgn)cuuaugAfcAfguucusgsg	CCAGAACUGUCAUAAG	3229

			6				AUAUGAG	
AD-957070.1	A-1803362.1	1785	gsasacu(Ghd)UfcAf UfAfagauaugagaL9 6	A-1805997.1	1919	VPusCfsucau(Agn)ucuu auGfaCfaguucsusg	CAGAACUG UCAUAAGA UAUGAGC	3230
AD-957071.1	A-1803364.1	1786	asascug(Uhd)CfaUf AfAfgauaugagcaL9 6	A-1805998.1	1920	VPusGfscuca(Tgn)aucu uaUfgAfcaguuscsu	AGAACUGU CAUAAGAU AUGAGCU	3231
AD-957073.1	A-1803368.1	1787	csusguc(Ahd)UfaAf GfAfuaugagcugaL9 6	A-1806000.1	1921	VPusCfsagcu(Cgn)auau cuUfaUfgacagsusu	AACUGUCA UAAGAUAU GAGCUGA	3232
AD-957079.1	A-1803380.1	1788	usasaga(Uhd)AfuGf AfGfcugaauaccaL9 6	A-1806006.1	1922	VPusGfsguau(Tgn)cagc ucAfuAfucuuasusg	CAUAAGAU AUGAGCUG AAUACCG	3233
AD-957081.1	A-1803384.1	1789	asgsaua(Uhd)GfaGf CfUfgaaauaccgaaL9 6	A-1806008.1	1923	VPusUfscggu(Agn)uuca gcUfcAfuaucususa	UAAGAUAU GAGCUGAA UACCGAG	3234
AD-957083.1	A-1803388.1	1790	asusaug(Ahd)GfcUf GfAfauaccgagaaL9 6	A-1806010.1	1924	VPusUfscucg(Ggn)uauu caGfcUfcauauscsu	AGAUAUGA GCUGAAUA CCGAGAC	3235
AD-957141.1	A-1803435.1	1791	csascgg(Ahd)CfaGf UfUfcccguauucaL9 6	A-1806068.1	1925	VPusGfsaaua(Cgn)ggga acUfgUfcccugsgsu	ACCACGGA CAGUUCCC GUAUUCU	3236
AD-	A-1803436.1	1792	ascsgga(Chd)AfgUf	A-1806069.1	1926	VPusAfsgaau(Agn)cggg	CCACGGAC	3237

957142.1			UfCfccguauucuaL9 6			aaCfuGfuccgusgsg	AGUUCCCG UAUUCUU	
AD- 957144.1	A-1803505.1	1793	gsgsaca(Ghd)UfuCf CfCfguauucuugaL9 6	A-1806071.1	1927	VPusCfsaaga(Agn)uacg ggAfaCfuguccsgsu	ACGGACAG UUCCCGUA UUCUUGG	3238
AD- 957368.1	A-1803953.1	1794	usascg(Uhd)CfaAf CfUfuugcuuaugaL9 6	A-1806295.1	1928	VPusCfsauaa(Ggn)caaa guUfgAfcgguasgsc	GCUACCGU CAACUUUG CUUAUGA	3239
AD- 957369.1	A-1803955.1	1795	ascscgu(Chd)AfaCf UfUfugcuuaugaaL9 6	A-1806296.1	1929	VPusUfscaua(Agn)gcaa agUfuGfacggusag	CUACCGUC AACUUUGC UUAUGAC	3240
AD- 957370.1	A-1803957.1	1796	cscsguc(Ahd)AfcUf UfUfgcuuaugacaL9 6	A-1806297.1	1930	VPusGfsucau(Agn)agca aaGfuUfgacggsusa	UACCGUCA ACUUUGCU UAUGACA	3241
AD- 957371.1	A-1803959.1	1797	csgsuca(Ahd)CfuUf UfGfcuuaugacaaL9 6	A-1806298.1	1931	VPusUfsguca(Tgn)aagc aaAfgUfugacgsgsu	ACCGUCAA CUUUGCUU AUGACAC	3242
AD- 957439.1	A-1804089.1	1798	asusaag(Uhd)AfcAf GfCfagcaugauuaL9 6	A-1806366.1	1932	VPusAfsauca(Tgn)gcug cuGfuAfcuuausag	CUAUAAGU ACAGCAGC AUGAUUG	3243
AD- 957440.1	A-1804091.1	1799	usasagu(Ahd)CfaGf CfAfgcaugauugaL9 6	A-1806367.1	1933	VPusCfsaauc(Agn)ugcu gcUfgUfacuuasusa	UAUAAGUA CAGCAGCA UGAUUGA	3244

AD-957443.1	A-1804097.1	1800	gsusaca(Ghd)CfaGfCfAfugauugacuaL96	A-1806370.1	1934	VPusAfsguca(Agn)ucaugcUfgCfuguacsusu	AAGUACAGCAGCAUGAUUGACUA	3245
AD-957465.1	A-1804141.1	1801	ususugc(Chd)UfgGfGfAfcaacuugaaaL96	A-1806392.1	1935	VPusUfsucaa(Ggn)uuguccCfaGfgcaaasgsa	UCUUUGCCUGGGACAA CUUGAAC	3246
AD-957479.1	A-1804144.1	1802	csusuga(Ahd)CfaUfGfGfucacuuaugaL96	A-1806406.1	1936	VPusCfsauaa(Ggn)ugaccaUfgUfucaagsusu	AACUUGAA CAUGGUCA CUUAUGA	3247
AD-957480.1	A-1804145.1	1803	ususgaa(Chd)AfuGfGfUfcacuuaugaaL96	A-1806407.1	1937	VPusUfscaua(Agn)guga ccAfuGfuucaasgsu	ACUUGAAC AUGGUCAC UUAUGAC	3248
AD-957481.1	A-1804170.1	1804	usgsaac(Ahd)UfgGfUfCfacuuaugacaL96	A-1806408.1	1938	VPusGfsucau(Agn)agugacCfaUfguucasasg	CUUGAACA UGGUCACU UAUGACA	3249
AD-957482.1	A-1804172.1	1805	gsasaca(Uhd)GfgUfCfAfcuuauugacaaL96	A-1806409.1	1939	VPusUfsguca(Tgn)aagugaCfcAfuguucsasa	UUGAACAUGGUCACUUAUGACAU	3250
AD-957487.1	A-1804182.1	1806	usgsguc(Ahd)CfuUfAfUfgacaucaagaL96	A-1806414.1	1940	VPusCfsuuga(Tgn)gucauaAfgUfgaccasusg	CAUGGUCA CUUAUGAC AUCAAGC	3251
AD-957488.1	A-1804184.1	1807	gsgsuca(Chd)UfuAfUfGfacaucagcaL96	A-1806415.1	1941	VPusGfscuug(Agn)ugucauAfaGfugaccsasusu	AUGGUCAC UUAUGACA	3252

			6				UCAAGCU	
AD-957489.1	A-1804186.1	1808	gsuscac(Uhd)UfaUf GfAfcaucaagcuaL9 6	A-1806416.1	1942	VPusAfsgcuu(Ggn)augu caUfaAfgugacscsa	UGGUCACU UAUGACAU CAAGCUC	3253
AD-957490.1	A-1804188.1	1809	uscsacu(Uhd)AfuGf AfCfaucaagcuaL9 6	A-1806417.1	1943	VPusGfsagcu(Tgn)gaug ucAfuAfagugasccsc	GGUCACUU AUGACAUC AAGCUCU	3254
AD-957500.1	A-1804208.1	1810	csasuca(Ahd)GfcUf CfUfccaaauguaL9 6	A-1806427.1	1944	VPusAfascauc(Tgn)ugga gaGfcUfugaugsusc	GACAUCAA GCUCUCCA AGAUGUG	3255
AD-957506.1	A-1804220.1	1811	gscsucu(Chd)CfaAf GfAfugugaaaagaL9 6	A-1806433.1	1945	VPusCfsuuuu(Cgn)acau cuUfgGfagagcsusu	AAGCUCUC CAAGAUGU GAAAAGC	3256
AD-957508.1	A-1804224.1	1812	uscsucc(Ahd)AfgAf UfGfugaaaagccaL9 6	A-1806435.1	1946	VPusGfsgcuu(Tgn)ucac auCfuUfggagasgsc	GCUCUCCA AGAUGUGA AAAGCCU	3257
AD-957650.1	A-1804508.1	1813	ususcag(Ghd)AfaUf UfGfuagucugagaL9 6	A-1806577.1	1947	VPusCfsucag(Agn)cuac aaUfuCfcugaasusa	UAUUCAGG AAUUGUAG UCUGAGG	3258
AD-957685.1	A-1804578.1	1814	usasucu(Uhd)CfuGf UfCfagcauuuauaL9 6	A-1806612.1	1948	VPusAfsuaaa(Tgn)gcug acAfgAfagauasasa	UUUAUCUU CUGUCAGC AUUUAUG	3259
AD-	A-1804580.1	1815	asuscuu(Chd)UfgUf	A-1806613.1	1949	VPusCfsauaa(Agn)ugcu	UUAUCUUC	3260

957686.1			CfAfgcauuuauaL9 6			gaCfaGfaagausasa	UGUCAGCA UUUAUGG	
AD- 957687.1	A-1804582.1	1816	uscsuuc(Uhd)GfuCf AfGfcauuuauuggaL9 6	A-1806614.1	1950	VPusCfscaua(Agn)augc ugAfcAfgaagasusa	UAUCUUCU GUCAGCAU UUAUGGG	3261
AD- 957688.1	A-1804584.1	1817	csusucu(Ghd)UfcAf GfCfauuuauugggaL9 6	A-1806615.1	1951	VPusCfscgau(Agn)aaug cuGfaCfagaagsasu	AUCUUCUG UCAGCAU UAUGGGA	3262
AD- 957690.1	A-1804588.1	1818	uscsugu(Chd)AfgCf AfUfuauugggaL9 6	A-1806617.1	1952	VPusAfsuccc(Agn)uaaa ugCfuGfacagasasg	CUUCUGUC AGCAUUUA UGGGAUG	3263
AD- 957691.1	A-1804590.1	1819	csusguc(Ahd)GfcAf UfUfauugggaL9 6	A-1806618.1	1953	VPusCfsaucc(Cgn)auaa auGfcUfgacagsasa	UUCUGUCA GCAUUUAU GGGAUGU	3264
AD- 957694.1	A-1804596.1	1820	uscsagc(Ahd)UfuUf AfUfgggauguuuL9 6	A-1806621.1	1954	VPusAfsaaca(Tgn)ccca uaAfaUfgcugascsa	UGUCAGCA UUUAUGGG AUGUUUA	3265
AD- 957695.1	A-1804598.1	1821	csasgca(Uhd)UfuAf UfGfggauguuuL9 6	A-1806622.1	1955	VPusUfsaaac(Agn)uccc auAfaAfugcugsasc	GUCAGCAU UUAUGGGA UGUUUAA	3266
AD- 957696.1	A-1804600.1	1822	asgscau(Uhd)UfaUf GfGfgauguuuL9 6	A-1806623.1	1956	VPusUfsuaaa(Cgn)aucc caUfaAfaugcusgsa	UCAGCAU UAUGGGAU GUUUAAU	3267

AD-957698.1	A-1804604.1	1823	csasuuu(Ahd)UfgGfGfAfuguuuuauaL96	A-1806625.1	1957	VPusCfsauua(Agn)acauccCfaUfaaaugscsu	AGCAUUUAUGGGAUGUUAAUGA	3268
AD-957699.1	A-1804606.1	1824	asusuuu(Uhd)GfgGfAfUfguuuauaL96	A-1806626.1	1958	VPusUfscuu(Agn)aacaucCfAfuaaaugsc	GCAUUUAUGGGAUGUUAUGAC	3269
AD-957706.1	A-1804620.1	1825	gsgsaug(Uhd)UfuAfAfUfgacauaguuaL96	A-1806633.1	1959	VPusAfsacua(Tgn)gucauuAfaAfcauccscsa	UGGGAUGUUAAUGACAUAGUUC	3270
AD-957707.1	A-1804622.1	1826	gsasugu(Uhd)UfaAfUfGfacauaguuaL96	A-1806634.1	1960	VPusGfsaacu(Agn)ugucauUfaAfacaucscsc	GGGAUGUUAUGACAUAGUUCA	3271
AD-957708.1	A-1804624.1	1827	asusguu(Uhd)AfaUfGfAfcauaguuaL96	A-1806635.1	1961	VPusUfsgaac(Tgn)augucaUfuAfaacaucscsc	GGAUGUUUAAUGACAUAGUUCAA	3272
AD-957710.1	A-1804628.1	1828	gsusuuu(Ahd)UfgAfCfAfuauguucaagaL96	A-1806637.1	1962	VPusCfsuuga(Agn)cuauGuCfaUfuaaacsasu	AUGUUUUAUGACAUAGUUCAAGU	3273
AD-957711.1	A-1804630.1	1829	ususuuu(Uhd)GfaCfAfUfaguucaaguaL96	A-1806638.1	1963	VPusAfscuug(Agn)acuaugUfcAfuaaaacscsa	UGUUUAAUGACAUAGUUCAAGUU	3274
AD-957716.1	A-1804640.1	1830	usgsaca(Uhd)AfgUfUfCfaaguuuucuaL96	A-1806643.1	1964	VPusAfsgaaa(Agn)cuugaaCfuAfugucasusu	AAUGACAUAGUUCAAG	3275

			6				UUUUCUU	
AD-957717.1	A-1804642.1	1831	gsascau(Ahd)GfuUf CfAfaguuuucuuaL9 6	A-1806644.1	1965	VPusAfsagaa(Agn)acuu gaAfcUfaugucsasu	AUGACAUUA GUUCAAGU UUUCUUG	3276
AD-957718.1	A-1804644.1	1832	ascsaua(Ghd)UfuCf AfAfguuuucuugaL9 6	A-1806645.1	1966	VPusCfsaaga(Agn)aacu ugAfaCfuauguscsa	UGACAUAG UUCAAGUU UUCUUGU	3277
AD-957719.1	A-1804647.1	1833	csasuag(Uhd)UfcAf AfGfuuuucuuguaL9 6	A-1806646.1	1967	VPusAfscaag(Agn)aaac uuGfaAfcuaugsusc	GACAUAGU UCAAGUUU UCUUGUG	3278
AD-957720.1	A-1804649.1	1834	asusagu(Uhd)CfaAf GfUfuuuucuugugaL9 6	A-1806647.1	1968	VPusCfsacaa(Ggn)aaaa cuUfgAfacuausgsu	ACAUAGUU CAAGUUUU CUUGUGA	3279
AD-957721.1	A-1804651.1	1835	usasguu(Chd)AfaGf UfUfuucuugugaaL9 6	A-1806648.1	1969	VPusUfscaca(Agn)gaaa acUfuGfaacuasusg	CAUAGUUC AAGUUUUC UUGUGAU	3280
AD-957722.1	A-1804653.1	1836	asgsuuc(Ahd)AfgU fUfUfucuugugauaL 96	A-1806649.1	1970	VPusAfsucac(Agn)agaa aaCfuUfgaacusasu	AUAGUUCA AGUUUUCU UGUGAUU	3281
AD-957723.1	A-1804655.1	1837	gsusuca(Ahd)GfuU fUfUfcuugugauuaL 96	A-1806650.1	1971	VPusAfsauca(Cgn)aaga aaAfcUfugaacsusa	UAGUUCAA GUUUUCUU GUGAUUU	3282
AD-	A-1804659.1	1838	uscsaag(Uhd)UfuUf	A-1806652.1	1972	VPusCfsaaau(Cgn)acaa	GUUCAAGU	3283

957725.1			CfUfugugauuugaL9 6			gaAfaAfcuugasasc	UUUCUUGU GAUUUGG	
AD- 957748.1	A-1804705.1	1839	asusagu(Uhd)UfcUf UfCfcugaaaaccaL9 6	A-1806675.1	1973	VPusGfsguuu(Tgn)cagg aaGfaAfacuaususa	UAAUAGUU UCUUCCUG AAAACCA	3284
AD- 957753.1	A-1804715.1	1840	ususcuu(Chd)CfuGf AfAfaaccauugcaL9 6	A-1806680.1	1974	VPusGfscaau(Ggn)guuu ucAfgGfaagaasasc	GUUUCUUC CUGAAAAC CAUUGCU	3285
AD- 957754.1	A-1804646.1	1841	uscsuuc(Chd)UfgAf AfAfaccauugcuaL9 6	A-1806681.1	1975	VPusAfsgcaa(Tgn)gguu uuCfaGfgaagasasa	UUUCUUCC UGAAAACC AUUGCUC	3286
AD- 957756.1	A-1804719.1	1842	ususccu(Ghd)AfaAf AfCfcuugcucuaL9 6	A-1806683.1	1976	VPusAfsgagc(Agn)augg uuUfuCfaggaasgsa	UCUUCCUG AAAACCAU UGCUCUU	3287
AD- 957761.1	A-1804729.1	1843	gsasaaa(Chd)CfaUf UfGfcucuugcauaL9 6	A-1806688.1	1977	VPusAfsugca(Agn)gagc aaUfgGfuuuucsasg	CUGAAAAC CAUUGCUC UUGCAUG	3288
AD- 957762.1	A-1804731.1	1844	asasaac(Chd)AfuUf GfCfucuugcaugaL9 6	A-1806689.1	1978	VPusCfsaugc(Agn)agag caAfuGfguuuuscsa	UGAAAACC AUUGCUCU UGCAUGU	3289
AD- 957764.1	A-1804735.1	1845	asasca(Uhd)UfgCf UfCfuugcauguuaL9 6	A-1806691.1	1979	VPusAfsacau(Ggn)caag agCfaAfugguususu	AAAACCAU UGCUCUUG CAUGUUA	3290

AD-957765.1	A-1804737.1	1846	ascscau(Uhd)GfcUfCfUfugcauguuaaL96	A-1806692.1	1980	VPusUfsaaca(Tgn)gcaaGaGfcAfauggusus	AAACCAUUGCUCUUGC AUGUUAC	3291
AD-957766.1	A-1804739.1	1847	cscsauu(Ghd)CfuCfUfUfgcauguuacaL96	A-1806693.1	1981	VPusGfsuaac(Agn)ugcaagAfgCfaauggsus	AACCAUUGCUCUUGCAUGUUACA	3292
AD-957767.1	A-1804741.1	1848	csasuug(Chd)UfcUfUfGfcauguuacaaL96	A-1806694.1	1982	VPusUfsguaa(Cgn)augcaaaGfaGfcaaugsgsu	ACCAUUGCUCUUGCAUGUUACA	3293
AD-957768.1	A-1804743.1	1849	asusugc(Uhd)CfuUfGfCfauguuacauaL96	A-1806695.1	1983	VPusAfsugua(Agn)caugcaAfgAfgcaausgsg	CCAUUGCUCUUGCAUGUUACAUG	3294
AD-957769.1	A-1804745.1	1850	ususgcu(Chd)UfuGfCfAfuguuacaugaL96	A-1806696.1	1984	VPusCfsaugu(Agn)acauGcAfaGfagcaasusg	CAUUGCUCUUGCAUGUACAUGG	3295
AD-957770.1	A-1804753.1	1851	usgscuc(Uhd)UfgCfAfUfguuacauggaL96	A-1806697.1	1985	VPusCfscaug(Tgn)aacaugCfaAfgagcasasu	AUUGCUCUUGCAUGUACAUGGU	3296
AD-957771.1	A-1804755.1	1852	gscsucu(Uhd)GfcAfUfGfuuacaugguaL96	A-1806698.1	1986	VPusAfsccau(Ggn)uaacauGfcAfaagagsasa	UUGCUCUUGCAUGUACAUGGU	3297
AD-957772.1	A-1804757.1	1853	csuscuu(Ghd)CfaUfGfUfuacaugguuaL96	A-1806699.1	1987	VPusAfsacca(Tgn)guaaCaUfgCfaagagsca	UGCUCUUGCAUGUUAC	3298

			6				AUGGUUA	
AD-957773.1	A-1804759.1	1854	uscsuug(Chd)AfuG fUfUfacaugguuaaL 96	A-1806700.1	1988	VPusUfsaacc(Agn)ugua acAfuGfcaagasgsc	GCUCUUGC AUGUUACA UGGUUAC	3299
AD-957774.1	A-1804747.1	1855	csusugc(Ahd)UfgU fUfAfcaugguuacaL 96	A-1806701.1	1989	VPusGfsuaac(Cgn)augu aaCfaUfgcaagsasg	CUCUUGCA UGUUACA GGUUACC	3300
AD-957775.1	A-1804748.1	1856	ususgca(Uhd)GfuU fAfCfaugguuaccaL 96	A-1806702.1	1990	VPusGfsguaa(Cgn)caug uaAfcAfugcaasgsa	UCUUGCAU GUUACAUG GUUACCA	3301
AD-957776.1	A-1804749.1	1857	usgscau(Ghd)UfuA fCfAfugguuaccaaL 96	A-1806703.1	1991	VPusUfsggua(Agn)ccau guAfaCfaugcasasg	CUUGCAUG UUACAUGG UUACCAC	3302
AD-957777.1	A-1804750.1	1858	gscsaug(Uhd)UfaCf AfUfgguuaccacaL9 6	A-1806704.1	1992	VPusGfsuggu(Agn)acca ugUfaAfcaugcsasa	UUGCAUGU UACAUGGU UACCACA	3303
AD-957808.1	A-1804819.1	1859	asasaag(Chd)AfuAf AfCfuucuaaaggaaL9 6	A-1806735.1	1993	VPusCfscuuu(Agn)gaag uuAfuGfcuuuususa	UAAAAAGC AUAACUUC UAAAGGA	3304
AD-957809.1	A-1804821.1	1860	asasagc(Ahd)UfaAf CfUfucuaaaggaaL9 6	A-1806736.1	1994	VPusUfscuu(Tgn)agaa guUfaUfgcuuususu	AAAAAGCA UAACUUCU AAAGGAA	3305
AD-	A-1804823.1	1861	asasgca(Uhd)AfaCf	A-1806737.1	1995	VPusUfsuccu(Tgn)uaga	AAAAGCAU	3306

957810.1			UfUfcuaaaggaaaL9 6			agUfuAfugcuususu	AACUUCUA AAGGAAG	
AD- 957811.1	A-1804752.1	1862	asgscau(Ahd)AfcUf UfCfuaaaggaagaL9 6	A-1806738.1	1996	VPusCfsuucc(Tgn)uuag aaGfuUfaugcususu	AAAGCAUA ACUUCUAA AGGAAGC	3307
AD- 957819.1	A-1804839.1	1863	ususcua(Ahd)AfgG fAfAfgcagaauagaL 96	A-1806746.1	1997	VPusCfsuauu(Cgn)ugcu ucCfuUfuagaasgsu	ACUUCUAA AGGAAGCA GAAUAGC	3308
AD- 957820.1	A-1804841.1	1864	uscsuaa(Ahd)GfgAf AfGfcagaauagcaL9 6	A-1806747.1	1998	VPusGfscuau(Tgn)cugc uuCfcUfuugasasg	CUUCUAAA GGAAGCAG AAUAGCU	3309
AD- 957821.1	A-1804843.1	1865	csusaaa(Ghd)GfaAf GfCfagaauagcuaL9 6	A-1806748.1	1999	VPusAfsgcua(Tgn)ucug cuUfcCfuuuagsasa	UUCUAAAG GAAGCAGA AUAGCUC	3310
AD- 957862.1	A-1804925.1	1866	asasgua(Ahd)GfaUf GfCfauuuacuacaL9 6	A-1806789.1	2000	VPusGfsuagu(Agn)aaug caUfcUfuacuusasu	AUAAGUAA GAUGCAUU UACUACA	3311
AD- 957883.1	A-1804970.1	1867	gsusugg(Chd)UfuC fUfAfaugcuucagaL 96	A-1806810.1	2001	VPusCfsugaa(Ggn)cauu agAfaGfccaacsusg	CAGUUGGC UUCUAAUG CUUCAGA	3312
AD- 957887.1	A-1804953.1	1868	gscsuuc(Uhd)AfaUf GfCfuucagauagaL9 6	A-1806814.1	2002	VPusCfsuauu(Tgn)gaag caUfuAfgaagcscsa	UGGCUUCU AAUGCUUC AGAUAGA	3313

AD-957889.1	A-1804954.1	1869	ususcu(Ahd)UfgCfUfUfcagauagaaaL96	A-1806816.1	2003	VPusUfsucua(Tgn)cugaagCfaUfuagaasgsc	GCUUCUAAUGCUUCAGAUAGAAU	3314
AD-957890.1	A-1804980.1	1870	uscsuaa(Uhd)GfcUfUfCfagauagaauaL96	A-1806817.1	2004	VPusAfsuucu(Agn)ucugaaGfcAfuugasasg	CUUCUAAUGCUUCAGAUAGAAUA	3315
AD-957894.1	A-1804988.1	1871	asusgcu(Uhd)CfaGfAfUfagaauacagaL96	A-1806821.1	2005	VPusCfsugua(Tgn)ucuaucUfgAfagcaususa	UAAUGCUUCAGAUAGAUACAGU	3316
AD-957895.1	A-1804990.1	1872	usgscuu(Chd)AfgAfUfAfgaauacaguaL96	A-1806822.1	2006	VPusAfscugu(Agn)uucuauCfuGfaagcasusu	AAUGCUUCAGAUAGAAUACAGUU	3317
AD-957897.1	A-1804994.1	1873	csusuca(Ghd)AfuAfGfAfauacaguugaL96	A-1806824.1	2007	VPusCfsaacu(Ggn)uauucuaAfuCfugaagscsa	UGCUUCAGAUAGAAUACAGUUGG	3318
AD-957898.1	A-1804955.1	1874	ususcag(Ahd)UfaGfAfAfuacaguuggaL96	A-1806825.1	2008	VPusCfscaac(Tgn)guauucUfaUfcugaasgsc	GCUUCAGAUAGAAUACAGUUGGG	3319

Таблица 4В

Иллюстративные немодифицированные последовательности одиночных цепей и дуплексов миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	Название последовательности смысловой цепи	SEQ ID NO: (смысловая цепь)	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	Диапазоны	SEQ ID NO: (антисмысловая цепь)	Название последовательности антисмысловой цепи	Антисмысловая цепь	Диапазоны мРНК-мишеней
AD-956571.1	A-1802311.1	2009	CGAGACAAG UCAGUUCUG GAA	516-536	2143	A-1805498.1	UCCAGAAC UGACUUGUC UCGGA	514-536
AD-956690.1	A-1802623.1	2010	GGCUCCAGA GAAGUUUCU ACA	669-689	2144	A-1805617.1	UGUAGAAAC UUCUCUGGA GCCUG	667-689
AD-956709.1	A-1802661.1	2011	CGUGGAAUU UGGACACUU UGA	688-708	2145	A-1805636.1	UCAAAGTGU CCAAAUUCC ACGUA	686-708
AD-956710.1	A-1802663.1	2012	GUGGAAUUU GGACACUUU GGA	689-709	2146	A-1805637.1	UCCAAAGUG UCCAAAUUC CACGU	687-709
AD-956732.1	A-1802705.1	2013	UCCAGGAA CUGAAGUCC GAA	711-731	2147	A-1805659.1	UUCGGACUU CAGUUCCUG GAAGG	709-731
AD-	A-1802726.1	2014	CUGAAGUCC	720-740	2148	A-1805668.1	UUCAGUTAG	718-740

956741.1			GAGCUAACU GAA				CUCGGACUU CAGUU	
AD- 956744.1	A-1802732.1	2015	AAGUCCGAG CUAACUGAA GUA	723-743	2149	A-1805671.1	UACUUCAGU UAGCUCGGA CUUCA	721-743
AD- 956745.1	A-1802734.1	2016	AGUCCGAGC UAACUGAAG UUA	724-744	2150	A-1805672.1	UAACUUCAG UUAGCUCGG ACUUC	722-744
AD- 956746.1	A-1802713.1	2017	GUCCGAGCU AACUGAAGU UCA	725-745	2151	A-1805673.1	UGAACUTCA GUUAGCUCG GACUU	723-745
AD- 956747.1	A-1802714.1	2018	UCCGAGCUA ACUGAAGUU CCA	726-746	2152	A-1805674.1	UGGAACTUC AGUUAGCUC GGACU	724-746
AD- 956748.1	A-1802736.1	2019	CCGAGCUAA CUGAAGUUC CUA	727-747	2153	A-1805675.1	UAGGAACUU CAGUUAGCU CGGAC	725-747
AD- 956749.1	A-1802738.1	2020	CGAGCUAAC UGAAGUUCC UGA	728-748	2154	A-1805676.1	UCAGGAACU UCAGUUAGC UCGGA	726-748
AD- 956760.1	A-1802760.1	2021	AAGUUCUG CUUCCCGAA UUA	739-759	2155	A-1805687.1	UAAUUCGGG AAGCAGGAA CUUCA	737-759

AD-956761.1	A-1802762.1	2022	AGUUCCUGC UUCCCGAAU UUA	740-760	2156	A-1805688.1	UAAAUUCGG GAAGCAGGA ACUUC	738-760
AD-956762.1	A-1802764.1	2023	GUUCCUGCU UCCCGAAUU UUA	741-761	2157	A-1805689.1	UAAAAUTCG GGAAGCAGG AACUU	739-761
AD-956763.1	A-1802715.1	2024	UUCCUGCUU CCCGAAUUU UGA	742-762	2158	A-1805690.1	UCAAAATUC GGGAAGCAG GAACU	740-762
AD-956764.1	A-1802766.1	2025	UCCUGCUUC CCGAAUUUU GAA	743-763	2159	A-1805691.1	UUCAAAAUU CGGGAAGCA GGAAC	741-763
AD-956765.1	A-1802768.1	2026	CCUGCUUCCC GAAUUUUGA AA	744-764	2160	A-1805692.1	UUUCAAAAU UCGGGAAGC AGGAA	742-764
AD-956766.1	A-1802770.1	2027	CUGCUUCCC GAAUUUUGA AGA	745-765	2161	A-1805693.1	UCUUCAAAA UUCGGGAAG CAGGA	743-765
AD-956769.1	A-1802776.1	2028	CUUCCCGAA UUUUGAAGG AGA	748-768	2162	A-1805696.1	UCUCCUTCA AAAUUCGGG AAGCA	746-768
AD-956827.1	A-1802818.1	2029	CGGAUGUGG AGAACUAGU	806-826	2163	A-1805754.1	UAAACUAGU UCUCCACAU	804-826

			UUA				CCGGU	
AD-956828.1	A-1802819.1	2030	GGAUGUGGA GAACUAGUU UGA	807-827	2164	A-1805755.1	UCAAAC TAG UUCUCCACA UCCGG	805-827
AD-956831.1	A-1802896.1	2031	UGUGGAGAA CUAGUUUGG GUA	810-830	2165	A-1805758.1	UACCCAAAC UAGUUCUCC ACAUC	808-830
AD-956872.1	A-1802979.1	2032	AACAGCAGA AACAAUUA C UGA	851-871	2166	A-1805799.1	UCAGUAAU U GUUUCUGCU GUUCU	849-871
AD-956873.1	A-1802981.1	2033	ACAGCAGAA ACAAUUA CU GGA	852-872	2167	A-1805800.1	UCCAGUAAU UGUUUCUGC UGUUC	850-872
AD-956874.1	A-1802983.1	2034	CAGCAGAAA CAAUUA CU G GCA	853-873	2168	A-1805801.1	UGCCAGTAA UUGUUUCUG CUGUU	851-873
AD-956877.1	A-1802920.1	2035	CAGAAACAA UUACUGGCA AGA	856-876	2169	A-1805804.1	UCUUGCCAG UAAUUGUU UCUGCU	854-876
AD-956880.1	A-1802993.1	2036	AAACAAUUA CUGGCAAGU AUA	859-879	2170	A-1805807.1	UAUACUTGC CAGUAAUUG UUUCU	857-879
AD-	A-1802995.1	2037	AACAAUUA C	860-880	2171	A-1805808.1	UCAUACTUG	858-880

956881.1			UGGCAAGUA UGA				CCAGUAAUU GUUUC	
AD- 956887.1	A-1803007.1	2038	UACUGGCAA GUAUGGUGU GUA	866-886	2172	A-1805814.1	UACACACCA UACUUGCCA GUAAU	864-886
AD- 956947.1	A-1803121.1	2039	UCCGCCAGG UUUUUGAGU AUA	961-981	2173	A-1805874.1	UAUACUCAA AAACCUGGC GGACA	959-981
AD- 956949.1	A-1803123.1	2040	CGCCAGGUU UUUGAGUAU GAA	963-983	2174	A-1805876.1	UUCAUACUC AAAAACCUG GCGGA	961-983
AD- 956958.1	A-1803152.1	2041	UUUGAGUAU GACCUCAUC AGA	972-992	2175	A-1805885.1	UCUGAUGAG GUCAUACUC AAAAA	970-992
AD- 956967.1	A-1803124.1	2042	GACCUCAUC AGCCAGUUU AUA	981-1001	2176	A-1805894.1	UAUAAACUG GCUGAUGAG GUCAU	979- 1001
AD- 956968.1	A-1803170.1	2043	ACCUCAUCA GCCAGUUUA UGA	982-1002	2177	A-1805895.1	UCAUAAACU GGCUGAUGA GGUCA	980- 1002
AD- 956992.1	A-1803125.1	2044	GCUACCCUU CUAAGGUUC ACA	1006-1026	2178	A-1805919.1	UGUGAACCU UAGAAGGG UAGCCC	1004- 1026

AD- 956998.1	A-1803220.1	2045	CUUCUAAGG UUCACAUAC UGA	1012-1032	2179	A-1805925.1	UCAGUATGU GAACCUUAG AAGGG	1010- 1032
AD- 956999.1	A-1803222.1	2046	UUCUAAGGU UCACAUACU GCA	1013-1033	2180	A-1805926.1	UGCAGUAUG UGAACCUUA GAAGG	1011- 1033
AD- 957000.1	A-1803224.1	2047	UCUAAGGUU CACAUACUG CCA	1014-1034	2181	A-1805927.1	UGGCAGTAU GUGAACCUU AGAAG	1012- 1034
AD- 957063.1	A-1803331.1	2048	GAGUCCAGA ACUGUCAUA AGA	1095-1115	2182	A-1805990.1	UCUUAUGAC AGUUCUGGA CUCAG	1093- 1115
AD- 957064.1	A-1803350.1	2049	AGUCCAGAA CUGUCAUAA GAA	1096-1116	2183	A-1805991.1	UUCUUATGA CAGUUCUGG ACUCA	1094- 1116
AD- 957065.1	A-1803352.1	2050	GUCCAGAAC UGUCAUAAG AUA	1097-1117	2184	A-1805992.1	UAUCUUAUG ACAGUUCUG GACUC	1095- 1117
AD- 957068.1	A-1803358.1	2051	CAGAACUGU CAUAAGAUA UGA	1100-1120	2185	A-1805995.1	UCAUAUCUU AUGACAGUU CUGGA	1098- 1120
AD- 957069.1	A-1803360.1	2052	AGAACUGUC AUAAGAUAU	1101-1121	2186	A-1805996.1	UUCAUATCU UAUGACAGU	1099- 1121

			GAA				UCUGG	
AD-957070.1	A-1803362.1	2053	GAACUGUCA UAAGAU AUG AGA	1102-1122	2187	A-1805997.1	UCUCAUAUC UUAUGACAG UUCUG	1100-1122
AD-957071.1	A-1803364.1	2054	AACUGUCAU AAGAU AUGA GCA	1103-1123	2188	A-1805998.1	UGCUCATAU CUUAUGACA GUUCU	1101-1123
AD-957073.1	A-1803368.1	2055	CUGUCAUAA GAUAUGAGC UGA	1105-1125	2189	A-1806000.1	UCAGCUCAU AUCUUAUGA CAGUU	1103-1125
AD-957079.1	A-1803380.1	2056	UAAGAU AUG AGCUGAAUA CCA	1111-1131	2190	A-1806006.1	UGGUAUTCA GCUCAUAUC UUAUG	1109-1131
AD-957081.1	A-1803384.1	2057	AGAU AUGAG CUGAAUACC GAA	1113-1133	2191	A-1806008.1	UUCGGUAUU CAGCUCAUA UCUUA	1111-1133
AD-957083.1	A-1803388.1	2058	AUAUGAGCU GAAUACCGA GAA	1115-1135	2192	A-1806010.1	UUCUCGGUA UUCAGCUCA UAUCU	1113-1135
AD-957141.1	A-1803435.1	2059	CACGGACAG UUCCCGUAU UCA	1173-1193	2193	A-1806068.1	UGAAUACGG GAACUGUCC GUGGU	1171-1193
AD-	A-1803436.1	2060	ACGGACAGU	1174-1194	2194	A-1806069.1	UAGAAUACG	1172-

957142.1			UCCCGUAUU CUA				GGAACUGUC CGUGG	1194
AD- 957144.1	A-1803505.1	2061	GGACAGUUC CCGUAUUCU UGA	1176-1196	2195	A-1806071.1	UCAAGAAUA CGGGAACUG UCCGU	1174- 1196
AD- 957368.1	A-1803953.1	2062	UACCGUCAA CUUUGCUUA UGA	1418-1438	2196	A-1806295.1	UCAUAAGCA AAGUUGACG GUAGC	1416- 1438
AD- 957369.1	A-1803955.1	2063	ACCGUCAAC UUUGCUUAU GAA	1419-1439	2197	A-1806296.1	UUCAUAAGC AAAGUUGAC GGUAG	1417- 1439
AD- 957370.1	A-1803957.1	2064	CCGUCAACU UUGCUUAUG ACA	1420-1440	2198	A-1806297.1	UGUCAUAAG CAAAGUUGA CGGUA	1418- 1440
AD- 957371.1	A-1803959.1	2065	CGUCAACUU UGCUUAUGA CAA	1421-1441	2199	A-1806298.1	UUGUCATAA GCAAAGUUG ACGGU	1419- 1441
AD- 957439.1	A-1804089.1	2066	AUAAGUACA GCAGCAUGA UUA	1489-1509	2200	A-1806366.1	UAAUCATGC UGCUGUACU UAUAG	1487- 1509
AD- 957440.1	A-1804091.1	2067	UAAGUACAG CAGCAUGAU UGA	1490-1510	2201	A-1806367.1	UCAAUCAUG CUGCUGUAC UUAUA	1488- 1510

AD-957443.1	A-1804097.1	2068	GUACAGCAG CAUGAUUGA CUA	1493-1513	2202	A-1806370.1	UAGUCAAUC AUGCUGCUG UACUU	1491- 1513
AD-957465.1	A-1804141.1	2069	UUUGCCUGG GACAACUUG AAA	1536-1556	2203	A-1806392.1	UUUCAAGUU GUCCCAGGC AAAGA	1534- 1556
AD-957479.1	A-1804144.1	2070	CUUGAACAU GGUCACUUA UGA	1550-1570	2204	A-1806406.1	UCAUAAGUG ACCAUGUUC AAGUU	1548- 1570
AD-957480.1	A-1804145.1	2071	UGAACCAUG GUCACUUAU GAA	1551-1571	2205	A-1806407.1	UUCAUAAGU GACCAUGUU CAAGU	1549- 1571
AD-957481.1	A-1804170.1	2072	UGAACCAUGG UCACUUAUG ACA	1552-1572	2206	A-1806408.1	UGUCAUAAG UGACCAUGU UCAAG	1550- 1572
AD-957482.1	A-1804172.1	2073	GAACAUGGU CACUUAUGA CAA	1553-1573	2207	A-1806409.1	UUGUCATAA GUGACCAUG UUCAA	1551- 1573
AD-957487.1	A-1804182.1	2074	UGGUCACUU AUGACAUCA AGA	1558-1578	2208	A-1806414.1	UCUUGATGU CAUAAGUGA CCAUG	1556- 1578
AD-957488.1	A-1804184.1	2075	GGUCACUUA UGACAUCAA	1559-1579	2209	A-1806415.1	UGCUGAUG UCAUAAGUG	1557- 1579

			GCA				ACCAU	
AD- 957489.1	A-1804186.1	2076	GUCACUUAU GACAUCAAG CUA	1560-1580	2210	A-1806416.1	UAGCUUGAU GUCAUAAGU GACCA	1558- 1580
AD- 957490.1	A-1804188.1	2077	UCACUUAUG ACAUCAAGC UCA	1561-1581	2211	A-1806417.1	UGAGCUTGA UGUCAUAAG UGACC	1559- 1581
AD- 957500.1	A-1804208.1	2078	CAUCAAGCU CUCCAAGAU GUA	1571-1591	2212	A-1806427.1	UACAUCTUG GAGAGCUUG AUGUC	1569- 1591
AD- 957506.1	A-1804220.1	2079	GCUCUCCAA GAUGUGAAA AGA	1577-1597	2213	A-1806433.1	UCUUUUCAC AUCUUGGAG AGCUU	1575- 1597
AD- 957508.1	A-1804224.1	2080	UCUCCAAGA UGUGAAAAG CCA	1579-1599	2214	A-1806435.1	UGGCUUTUC ACAUCUUGG AGAGC	1577- 1599
AD- 957650.1	A-1804508.1	2081	UUCAGGAU UGUAGUCUG AGA	1752-1772	2215	A-1806577.1	UCUCAGACU ACAAUCCU GAAUA	1750- 1772
AD- 957685.1	A-1804578.1	2082	UAUCUUCUG UCAGCAUUU AUA	1804-1824	2216	A-1806612.1	UAUAAATGC UGACAGAAG AUAAA	1802- 1824
AD-	A-1804580.1	2083	AUCUUCUGU	1805-1825	2217	A-1806613.1	UCAUAAAUG	1803-

957686.1			CAGCAUUUA UGA				CUGACAGAA GAUAA	1825
AD- 957687.1	A-1804582.1	2084	UCUUCUGUC AGCAUUUAU GGA	1806-1826	2218	A-1806614.1	UCCAUAAAU GCUGACAGA AGAU	1804- 1826
AD- 957688.1	A-1804584.1	2085	CUUCUGUCA GCAUUUAUG GGA	1807-1827	2219	A-1806615.1	UCCCAUAAA UGCUGACAG AAGAU	1805- 1827
AD- 957690.1	A-1804588.1	2086	UCUGUCAGC AUUUAUGGG AUA	1809-1829	2220	A-1806617.1	UAUCCCAUA AAUGCUGAC AGAAG	1807- 1829
AD- 957691.1	A-1804590.1	2087	CUGUCAGCA UUUAUGGGA UGA	1810-1830	2221	A-1806618.1	UCAUCCCAU AAAUGCUGA CAGAA	1808- 1830
AD- 957694.1	A-1804596.1	2088	UCAGCAUUU AUGGGAUGU UUA	1813-1833	2222	A-1806621.1	UAAACATCC CAUAAAUGC UGACA	1811- 1833
AD- 957695.1	A-1804598.1	2089	CAGCAUUUA UGGGAUGUU UAA	1814-1834	2223	A-1806622.1	UUAAACAUC CCAUAAAUG CUGAC	1812- 1834
AD- 957696.1	A-1804600.1	2090	AGCAUUUAU GGGAUGUUU AAA	1815-1835	2224	A-1806623.1	UUUAAACAU CCCAUAAAU GCUGA	1813- 1835

AD- 957698.1	A-1804604.1	2091	CAUUUAUGG GAUGUUUAA UGA	1817-1837	2225	A-1806625.1	UCAUUA AAC AUCCCAUAA AUGCU	1815- 1837
AD- 957699.1	A-1804606.1	2092	AUUUAUGGG AUGUUUAAU GAA	1818-1838	2226	A-1806626.1	UUCAUUAAA CAUCCCAUA AAUGC	1816- 1838
AD- 957706.1	A-1804620.1	2093	GGAUGUUUA AUGACAUAG UUA	1825-1845	2227	A-1806633.1	UAACUATGU CAUUAAACA UCCCA	1823- 1845
AD- 957707.1	A-1804622.1	2094	GAUGUUUAA UGACAUAGU UCA	1826-1846	2228	A-1806634.1	UGAACUAUG UCAUUA AAC AUCCC	1824- 1846
AD- 957708.1	A-1804624.1	2095	AUGUUUAAU GACAUAGUU CAA	1827-1847	2229	A-1806635.1	UUGAACTAU GUCAUUAAA CAUCC	1825- 1847
AD- 957710.1	A-1804628.1	2096	GUUUA AUGA CAUAGUUCA AGA	1829-1849	2230	A-1806637.1	UCUUGAACU AUGUCAUUA AACAU	1827- 1849
AD- 957711.1	A-1804630.1	2097	UUUAAUGAC AUAGUUCAA GUA	1830-1850	2231	A-1806638.1	UACUUGAAC UAUGUCAUU AAACA	1828- 1850
AD- 957716.1	A-1804640.1	2098	UGACAUAGU UCAAGUUUU	1835-1855	2232	A-1806643.1	UAGAAAACU UGAACUAUG	1833- 1855

			CUA				UCAUU	
AD- 957717.1	A-1804642.1	2099	GACAUAGUU CAAGUUUUC UUA	1836-1856	2233	A-1806644.1	UAAGAAAAC UUGAACUAU GUCAU	1834- 1856
AD- 957718.1	A-1804644.1	2100	ACAUAGUUC AAGUUUUCU UGA	1837-1857	2234	A-1806645.1	UCAAGAAAA CUUGAACUA UGUCA	1835- 1857
AD- 957719.1	A-1804647.1	2101	CAUAGUUCA AGUUUUCUU GUA	1838-1858	2235	A-1806646.1	UACAAGAAA ACUUGAACU AUGUC	1836- 1858
AD- 957720.1	A-1804649.1	2102	AUAGUUCAA GUUUUCUUG UGA	1839-1859	2236	A-1806647.1	UCACAAGAA AACUUGAAC UAUGU	1837- 1859
AD- 957721.1	A-1804651.1	2103	UAGUUCAAG UUUUCUUGU GAA	1840-1860	2237	A-1806648.1	UUCACAAGA AAACUUGAA CUAUG	1838- 1860
AD- 957722.1	A-1804653.1	2104	AGUUCAAGU UUUCUUGUG AUA	1841-1861	2238	A-1806649.1	UAUCACAAG AAAACUUGA ACUAU	1839- 1861
AD- 957723.1	A-1804655.1	2105	GUUCAAGUU UUCUUGUGA UUA	1842-1862	2239	A-1806650.1	UAAUCACAA GAAAACUUG AACUA	1840- 1862
AD-	A-1804659.1	2106	UCAAGUUUU	1844-1864	2240	A-1806652.1	UCAAAUCAC	1842-

957725.1			CUUGUGAUU UGA				AAGAAAACU UGAAC	1864
AD- 957748.1	A-1804705.1	2107	AUAGUUUCU UCCUGAAAA CCA	1885-1905	2241	A-1806675.1	UGGUUUTCA GGAAGAAAC UAUUA	1883- 1905
AD- 957753.1	A-1804715.1	2108	UUCUCCUG AAAACCAU GCA	1890-1910	2242	A-1806680.1	UGCAAUGGU UUUCAGGAA GAAAC	1888- 1910
AD- 957754.1	A-1804646.1	2109	UCUCCUGA AAACCAUUG CUA	1891-1911	2243	A-1806681.1	UAGCAATGG UUUUCAGGA AGAAA	1889- 1911
AD- 957756.1	A-1804719.1	2110	UCCUGAAA ACCAUUGCU CUA	1893-1913	2244	A-1806683.1	UAGAGCAAU GGUUUUCAG GAAGA	1891- 1913
AD- 957761.1	A-1804729.1	2111	GAAAACCAU UGCUCUUGC AUA	1898-1918	2245	A-1806688.1	UAUGCAAGA GCAAUGGUU UUCAG	1896- 1918
AD- 957762.1	A-1804731.1	2112	AAAACCAU GCUCUUGCA UGA	1899-1919	2246	A-1806689.1	UCAUGCAAG AGCAAUGGU UUUCA	1897- 1919
AD- 957764.1	A-1804735.1	2113	AACCAUUGC UCUUGCAUG UUA	1901-1921	2247	A-1806691.1	UAACAUGCA AGAGCAAUG GUUUU	1899- 1921

AD-957765.1	A-1804737.1	2114	ACCAUUGCU CUUGCAUGU UAA	1902-1922	2248	A-1806692.1	UUAACATGC AAGAGCAAU GGUUU	1900-1922
AD-957766.1	A-1804739.1	2115	CCAUUGCUC UUGCAUGUU ACA	1903-1923	2249	A-1806693.1	UGUAACAUG CAAGAGCAA UGGUU	1901-1923
AD-957767.1	A-1804741.1	2116	CAUUGCUCU UGCAUGUUA CAA	1904-1924	2250	A-1806694.1	UUGUAACAU GCAAGAGCA AUGGU	1902-1924
AD-957768.1	A-1804743.1	2117	AUUGCUCUU GCAUGUUAC AUA	1905-1925	2251	A-1806695.1	UAUGUAACA UGCAAGAGC AAUGG	1903-1925
AD-957769.1	A-1804745.1	2118	UUGCUCUUG CAUGUUACA UGA	1906-1926	2252	A-1806696.1	UCAUGU AAC AUGCAAGAG CAAUG	1904-1926
AD-957770.1	A-1804753.1	2119	UGCUCUUGC AUGUUACAU GGA	1907-1927	2253	A-1806697.1	UCCAUGTAA CAUGCAAGA GCAAU	1905-1927
AD-957771.1	A-1804755.1	2120	GCUCUUGCA UGUUACAUG GUA	1908-1928	2254	A-1806698.1	UACCAUGUA ACAUGCAAG AGCAA	1906-1928
AD-957772.1	A-1804757.1	2121	CUCUUGCAU GUUACAUGG	1909-1929	2255	A-1806699.1	UAACCATGU AACAUGCAA	1907-1929

			UUA				GAGCA	
AD- 957773.1	A-1804759.1	2122	UCUUGCAUG UUACAUGGU UAA	1910-1930	2256	A-1806700.1	UUAACCAUG UAACAUGCA AGAGC	1908- 1930
AD- 957774.1	A-1804747.1	2123	CUUGCAUGU UACAUGGUU ACA	1911-1931	2257	A-1806701.1	UGUAACCAU GUAACAUGC AAGAG	1909- 1931
AD- 957775.1	A-1804748.1	2124	UUGCAUGUU ACAUGGUUA CCA	1912-1932	2258	A-1806702.1	UGGUAACCA UGUAACAUG CAAGA	1910- 1932
AD- 957776.1	A-1804749.1	2125	UGCAUGUUA CAUGGUUAC CAA	1913-1933	2259	A-1806703.1	UUGGUAACC AUGUAACAU GCAAG	1911- 1933
AD- 957777.1	A-1804750.1	2126	GCAUGUUAC AUGGUUACC ACA	1914-1934	2260	A-1806704.1	UGUGGUAAC CAUGUAACA UGCAA	1912- 1934
AD- 957808.1	A-1804819.1	2127	AAAAGCAUA ACUUCUAAA GGA	1945-1965	2261	A-1806735.1	UCCUUUAGA AGUUAUGCU UUUUA	1943- 1965
AD- 957809.1	A-1804821.1	2128	AAAGCAUAA CUUCUAAAG GAA	1946-1966	2262	A-1806736.1	UUCCUUTAG AAGUUAUGC UUUUU	1944- 1966
AD-	A-1804823.1	2129	AAGCAUAAC	1947-1967	2263	A-1806737.1	UUUCCUTUA	1945-

957810.1			UUCUAAAGG AAA				GAAGUUAU GCUUUU	1967
AD- 957811.1	A-1804752.1	2130	AGCAUAACU UCUAAAGGA AGA	1948-1968	2264	A-1806738.1	UCUUCCTUU AGAAGUUA UGCUIIU	1946- 1968
AD- 957819.1	A-1804839.1	2131	UUCUAAAGG AAGCAGAAU AGA	1956-1976	2265	A-1806746.1	UCUAUUCUG CUUCCUUA GAAGU	1954- 1976
AD- 957820.1	A-1804841.1	2132	UCUAAAGGA AGCAGAAUA GCA	1957-1977	2266	A-1806747.1	UGCUAUTCU GCUUCCUUI AGAAG	1955- 1977
AD- 957821.1	A-1804843.1	2133	CUAAAGGAA GCAGAAUAG CUA	1958-1978	2267	A-1806748.1	UAGCUATUC UGCUIUCCU UAGAA	1956- 1978
AD- 957862.1	A-1804925.1	2134	AAGUAAGAU GCAUUIACU ACA	1999-2019	2268	A-1806789.1	UGUAGUAA AUGCAUCU ACUUAU	1997- 2019
AD- 957883.1	A-1804970.1	2135	GUUGGCUUC UAAUGCUUC AGA	2020-2040	2269	A-1806810.1	UCUGAAGCA UUAGAAGCC AACUG	2018- 2040
AD- 957887.1	A-1804953.1	2136	GCUUCUAAU GCUUCAGAU AGA	2024-2044	2270	A-1806814.1	UCUAUCTGA AGCAUUA AGCCA	2022- 2044

AD- 957889.1	A-1804954.1	2137	UUCUAAUGC UUCAGAUAG AAA	2026-2046	2271	A-1806816.1	UUUCUATCU GAAGCAUUA GAAGC	2024- 2046
AD- 957890.1	A-1804980.1	2138	UCUAAUGCU UCAGAUAGA AUA	2027-2047	2272	A-1806817.1	UAUUCUAUC UGAAGCAUU AGAAG	2025- 2047
AD- 957894.1	A-1804988.1	2139	AUGCUUCAG AUAGAAUAC AGA	2031-2051	2273	A-1806821.1	UCUGUATUC UAUCUGAAG CAUUA	2029- 2051
AD- 957895.1	A-1804990.1	2140	UGCUUCAGA UAGAAUACA GUA	2032-2052	2274	A-1806822.1	UACUGUAUU CUAUCUGAA GCAUU	2030- 2052
AD- 957897.1	A-1804994.1	2141	CUUCAGAU GAAUACAGU UGA	2034-2054	2275	A-1806824.1	UCAACUGUA UUCUAUCUG AAGCA	2032- 2054
AD- 957898.1	A-1804955.1	2142	UUCAGAUAG AAUACAGUU GGA	2035-2055	2276	A-1806825.1	UCCAACUGU AUUCUAUCU GAAGC	2033- 2055

Таблица 5А

Иллюстративные модифицированные последовательности одиночных цепей и дуплексов миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	Название последовательности смысловой цепи	SEQ ID NO: (смысловая цепь)	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	Название последовательности антисмысловой цепи	SEQ ID NO: (антисмысловая цепь)	Последовательность антисмысловой цепи	Последовательность мРНК-мишени	SEQ ID NO:
AD-957960.1	A-1806917.1	2277	csasgca(Chd)agdCa dGagcuuuccaaL96	A-1806918.1	2395	VPusdTsggdAadA gcucdTgdCugugcu gsasg	CUCAGCACA GCAGAGCUU UCCAG	3320
AD-957961.1	A-1806919.1	2278	asgscac(Ahd)gcdAg dAgcuuuccagaL96	A-1806920.1	2396	VPusdCsugdGadA agcudCudGcugugc usgsa	UCAGCACAG CAGAGCUUU CCAGA	3321
AD-958008.1	A-1807013.1	2279	asgsguu(Chd)uudCu dGugcacguugaL96	A-1807014.1	2397	VPusdCsaadCgdTg cacdAgdAagaaccus csa	UGAGGUUCU UCUGUGCAC GUUGC	3322
AD-958009.1	A-1807015.1	2280	gsgsuuc(Uhd)ucdTg dTgcacguugcaL96	A-1807016.1	2398	VPusdGscadAcdG ugcadCadGaagaacc susc	GAGGUUCUU CUGUGCACG UUGCU	3323
AD-958145.1	A-1807287.1	2281	gscscag(Uhd)ccdCa dAugaauccagaL96	A-1807288.1	2399	VPusdCsugdGadT ucaudTgdGgacugg cscsa	UGGCCAGUC CCAAUGAAU CCAGC	3324
AD-	A-1807733.1	2282	uscscga(Ghd)acdAa	A-1807734.1	2400	VPusdCsagdAadC	CCUCCGAGA	3325

958368.1			dGucaguucugaL96			ugacdTudGucucgg asgsg	CAAGUCAGU UCUGG	
AD- 958369.1	A-1807735.1	2283	cscsgag(Ahd)cadAg dTcaguucuggaL96	A-1807736.1	2401	VPusdCscadGadA cugadCudTgucucg gsasg	CUCCGAGAC AAGUCAGUU CUGGA	3326
AD- 958488.1	A-1807973.1	2284	asgsgcu(Chd)cadGa dGaaguucuaaL96	A-1807974.1	2402	VPusdTsagdAadA cuucdTcdTggagccu sgsg	CCAGGCUCC AGAGAAGU UUCUAC	3327
AD- 958489.1	A-1807975.1	2285	gsgscuc(Chd)agdAg dAaguucuaaL96	A-1807976.1	2403	VPusdGsuadGadA acuudCudCuggagc csusg	CAGGCUCCA GAGAAGUU UCUACG	3328
AD- 958509.1	A-1808015.1	2286	gsusgga(Ahd)uudTg dGacacuuuggaL96	A-1808016.1	2404	VPusdCscadAadG ugucdCadAauucca csgsu	ACGUGGAAU UUGGACACU UUGGC	3329
AD- 958510.1	A-1808017.1	2287	usgsgaa(Uhd)uudGg dAcacuuuggcaL96	A-1808018.1	2405	VPusdGscddAadA gugudCcdAaaaucc ascsg	CGUGGAAUU UGGACACUU UGGCC	3330
AD- 958511.1	A-1808019.1	2288	gsgsaau(Uhd)ugdGa dCacuuuggccaL96	A-1808020.1	2406	VPusdGsgcdCadA agugdTcdCaaauucc sasc	GUGGAAUU UGGACACUU UGGCCU	3331
AD- 958512.1	A-1808021.1	2289	gsasauu(Uhd)ggdAc dAcuuuggccuaL96	A-1808022.1	2407	VPusdAsggdCcdA aagudGudCcaaauu cscsa	UGGAAUUU GGACACUUU GGCCUU	3332

AD-958518.1	A-1808033.1	2290	gsgsaca(Chd)uudTg dGccuuccaggaL96	A-1808034.1	2408	VPusdCscudGgdA aggcdCadAaguguc csasa	UUGGACACU UUGCCCUUC CAGGA	3333
AD-958532.1	A-1808061.1	2291	uscscag(Ghd)aadCu dGaaguccgagaL96	A-1808062.1	2409	VPusdCsudGgdA cuucdAgdTuccugg asasg	CUUCCAGGA ACUGAAGUC CGAGC	3334
AD-958539.1	A-1808075.1	2292	ascsuga(Ahd)gudCc dGagcuaacugaL96	A-1808076.1	2410	VPusdCsagdTudA gcucdGgdAcuucag ususc	GAACUGAAG UCCGAGCUA ACUGA	3335
AD-958548.1	A-1808093.1	2293	csgsagc(Uhd)aadCu dGaaguuccugaL96	A-1808094.1	2411	VPusdCsagdGadA cuucdAgdTugcuc gsgsa	UCCGAGCUA ACUGAAGUU CCUGC	3336
AD-958555.1	A-1808107.1	2294	ascsuga(Ahd)gudTc dCugcuucccgaaL96	A-1808108.1	2412	VPusdCsggdGadA gcagdGadAcuucag ususa	UAACUGAAG UCCUGCUU CCCGA	3337
AD-958561.1	A-1808119.1	2295	gsusucc(Uhd)gcdTu dCccgaauuuuaL96	A-1808120.1	2413	VPusdAsaadAudT cgggdAadGcaggaa csusu	AAGUCCUG CUUCCCGAA UUUUG	3338
AD-958563.1	A-1808123.1	2296	uscscug(Chd)uudCc dCgaauuuugaaL96	A-1808124.1	2414	VPusdTscadAadA uucgdGgdAagcagg asasc	GUUCCUGCU UCCCGAAUU UUGAA	3339
AD-958564.1	A-1808125.1	2297	cscsugc(Uhd)ucdCc dGaauuuugaaaL96	A-1808126.1	2415	VPusdTsudAadA auucdGgdGaagcag	UCCUGCUU CCCGAAUUU	3340

						gsasa	UGAAG	
AD-958565.1	A-1808127.1	2298	csusgcu(Uhd)ccdCgdAuuuugaagaL96	A-1808128.1	2416	VPusdCsuudCadAaaudCgdGgaagcagsgsa	UCCUGCUUC CCGAAUUUU GAAGG	3341
AD-958566.1	A-1808129.1	2299	usgscuu(Chd)ccdGadAuuuugaaggaL96	A-1808130.1	2417	VPusdCscudTcdAaauudTcdGggaagcagsg	CCUGCUUCC CGAAUUUUG AAGGA	3342
AD-958568.1	A-1808133.1	2300	csusucc(Chd)gadAudTuugaaggagaL96	A-1808134.1	2418	VPusdCsucdCudTcaaadAudTcgggaagscsa	UGCUUCCCG AAUUUUGA AGGAGA	3343
AD-958628.1	A-1808253.1	2301	gsasugu(Ghd)gadGadAcuaguuuuggaL96	A-1808254.1	2419	VPusdCscadAadCuagudTcdTccacaucscsg	CGGAUGUGG AGAACUAGU UUGGG	3344
AD-958629.1	A-1808255.1	2302	asusgug(Ghd)agdAadCuaguuuugggaL96	A-1808256.1	2420	VPusdCsccdAadAacuagdTudCuccacauscsc	GGAUGUGG AGAACUAGU UUGGGU	3345
AD-958630.1	A-1808257.1	2303	usgsugg(Ahd)gadAcTaguuuggguaL96	A-1808258.1	2421	VPusdAscddCadAacuadGudTcuccacasusc	GAUGUGGA GAACUAGUU UGGGUA	3346
AD-958632.1	A-1808261.1	2304	usgsgag(Ahd)acdTadGuuuggguagaL96	A-1808262.1	2422	VPusdCsudCcdCaacdTadGuucuccascsa	UGUGGAGA ACUAGUUUG GGUAGG	3347
AD-	A-1808263.1	2305	gsgsaga(Ahd)cudAg	A-1808264.1	2423	VPusdCscudAcnC	GUGGAGAAC	3348

958633.1			dTuuggguaggaL96			caaadCudAguucuc csasc	UAGUUUGG GUAGGA	
AD- 958635.1	A-1808267.1	2306	asgsaac(Uhd)agdTu dTggguaggagaL96	A-1808268.1	2424	VPusdCsucdCudA cccadAadCuaguuc uscsc	GGAGAACUA GUUUGGGU AGGAGA	3349
AD- 958671.1	A-1808339.1	2307	asascag(Chd)agdAa dAcaauuacugaL96	A-1808340.1	2425	VPusdCsagdTadA uugudTudCugcugu uscsu	AGAACAGCA GAAACAAUU ACUGG	3350
AD- 958672.1	A-1808341.1	2308	ascsagc(Ahd)gadAa dCaauuacuggaL96	A-1808342.1	2426	VPusdCscadGudA auugdTudTcugcug ususc	GAACAGCAG AAACAAUUA CUGGC	3351
AD- 958680.1	A-1808357.1	2309	asasca(Uhd)uadCu dGgcaaguaugaL96	A-1808358.1	2427	VPusdCsaudAcdT ugccdAgdTaaugu ususc	GAAACAAUU ACUGGCAAG UAUGG	3352
AD- 958681.1	A-1808359.1	2310	ascsaau(Uhd)acdTg dGcaaguauggaL96	A-1808360.1	2428	VPusdCscadTadCu ugcdCadGuaauugu susu	AAACAAUUA CUGGCAAGU AUGGU	3353
AD- 958682.1	A-1808361.1	2311	csasaau(Ahd)cudGg dCaaguaugguaL96	A-1808362.1	2429	VPusdAscCdAudA cuugdCcdAguaauu gsusu	AACAAUUAC UGGCAAGUA UGGUG	3354
AD- 958683.1	A-1808363.1	2312	asasuua(Chd)ugdGc dAaguauggugaL96	A-1808364.1	2430	VPusdCsacdCadTa cuudGcdCaguaauu sgsu	ACAAUUACU GGCAAGUAU GGUGU	3355

AD-958684.1	A-1808365.1	2313	asusuac(Uhd)ggdCa dAguauagguguaL96	A-1808366.1	2431	VPusdAscadCcdA uacudTgdCcaguaa ususg	CAAUUACUG GCAAGUAUG GUGUG	3356
AD-958685.1	A-1808367.1	2314	ususacu(Ghd)gcdAa dGuauggugugaL96	A-1808368.1	2432	VPusdCsacdAcdCa uacdTudGccaguaas usu	AAUUACUGG CAAGUAUGG UGUGU	3357
AD-958695.1	A-1808387.1	2315	gsusaug(Ghd)ugdTg dTggaugcgagaL96	A-1808388.1	2433	VPusdCsucdGcdA uccadCadCaccauac susu	AAGUAUGG UGUGUGGA UGCGAGA	3358
AD-958742.1	A-1808481.1	2316	gsasugu(Chd)cgdCc dAgguuuuugaaL96	A-1808482.1	2434	VPusdTscadAadAa ccudGgdCggacauc scsg	CGGAUGUCC GCCAGGUUU UUGAG	3359
AD-958757.1	A-1808511.1	2317	ususuga(Ghd)uadTg dAccucaucagaL96	A-1808512.1	2435	VPusdCsugdAudG aggudCadTacucaaa sasa	UUUUUGAG UAUGACCUC AUCAGC	3360
AD-958767.1	A-1808531.1	2318	ascscuc(Ahd)ucdAg dCcaguuuuugaL96	A-1808532.1	2436	VPusdCsaudAadA cuggdCudGaugagg uscsa	UGACCUCAU CAGCCAGUU UAUGC	3361
AD-958768.1	A-1808533.1	2319	cscsuca(Uhd)cadGc dCaguuuuaugcaL96	A-1808534.1	2437	VPusdGscadTadAa cugdGcdTgaugagg susc	GACCUCAUC AGCCAGUUU AUGCA	3362
AD-958770.1	A-1808537.1	2320	uscsauc(Ahd)gcdCa dGuuuuauagcagaL96	A-1808538.1	2438	VPusdCsugdCadTa aacdTgdGcugaugas	CCUCAUCAG CCAGUUUAU	3363

						gsg	GCAGG	
AD-958786.1	A-1808569.1	2321	gscsagg(Ghd)cudAc dCcuucuaaggaL96	A-1808570.1	2439	VPusdCscudTadGa aggdGudAgcccugc sasu	AUGCAGGGC UACCCUUCU AAGGU	3364
AD-958787.1	A-1808571.1	2322	csasggg(Chd)uadCc dCuucuaagguaL96	A-1808572.1	2440	VPusdAsccdTudA gaagdGgdTagcccu gscsa	UGCAGGGCU ACCCUUCUA AGGUU	3365
AD-958789.1	A-1808575.1	2323	gsgsgcu(Ahd)ccdCu dTcuaagguuL96	A-1808576.1	2441	VPusdGsaadCcdTu agadAgdGguagccc susg	CAGGGCUAC CCUUCUAAG GUUCA	3366
AD-958797.1	A-1808591.1	2324	csusucu(Ahd)agdGu dTcacauacugaL96	A-1808592.1	2442	VPusdCsagdTadTg ugadAcdCuuagaag sgsg	CCCUUCUAA GGUUCACAU ACUGC	3367
AD-958798.1	A-1808593.1	2325	ususcua(Ahd)ggdT dCacauacugL96	A-1808594.1	2443	VPusdGscadGudA ugugdAadCcuuaga asgsg	CCUUCUAAG GUUCACAU CUGCC	3368
AD-958864.1	A-1808725.1	2326	gsuscca(Ghd)aadCu dGucauaagauaL96	A-1808726.1	2444	VPusdAsucdTudA ugacdAgdTucugga csusc	GAGUCCAGA ACUGUCAUA AGAU	3369
AD-958867.1	A-1808731.1	2327	csasgaa(Chd)ugdTc dAuaagauaugaL96	A-1808732.1	2445	VPusdCsaudAudC uuaudGadCaguucu gsgsa	UCCAGAACU GUCAUAAGA UAUGA	3370
AD-	A-1808733.1	2328	asgsaac(Uhd)gudCa	A-1808734.1	2446	VPusdTscadTadTc	CCAGAACUG	3371

958868.1			dTaagauaugaaL96			uuadTgdAcaguucu sgsg	UCAUAAGAU AUGAG	
AD- 958869.1	A-1808735.1	2329	gsasacu(Ghd)ucdAu dAagauaugagaL96	A-1808736.1	2447	VPusdCsucdAudA ucuudAudGacaguu csusg	CAGAACUGU CAUAAGAU UGAGC	3372
AD- 958870.1	A-1808737.1	2330	asascug(Uhd)cadTa dAgauaugagcaL96	A-1808738.1	2448	VPusdGscudCadTa ucudTadTgacaguus csu	AGAACUGUC AUAAGAU UGAGCU	3373
AD- 958879.1	A-1808755.1	2331	asasgau(Ahd)ugdAg dCugaauaccgaL96	A-1808756.1	2449	VPusdCsggdTadTu cagdCudCauaucu sas	AUAAGAU UGAGCUGAA UACCGA	3374
AD- 958880.1	A-1808757.1	2332	asgsaua(Uhd)gadGc dTgaauaccgaL96	A-1808758.1	2450	VPusdTscgdGudA uucadGcdTcauau ususa	UAAGAU GAGCUGAAU ACCGAG	3375
AD- 958881.1	A-1808759.1	2333	gsasuau(Ghd)agdCu dGaauaccgagaL96	A-1808760.1	2451	VPusdCsucdGgdT auucdAgdCucauau csusu	AAGAU AGCUGAAU CCGAGA	3376
AD- 958890.1	A-1808777.1	2334	usgsaau(Ahd)ccdGa dGacagugaagaL96	A-1808778.1	2452	VPusdCsuudCadC ugucdTcdGguauuc asgsc	GCUGAAUAC CGAGACAGU GAAGG	3377
AD- 958891.1	A-1808779.1	2335	gsasaua(Chd)cgdAg dAcagugaaggaL96	A-1808780.1	2453	VPusdCscudTcdAc ugudCudCggauuc sasg	CUGAAUACC GAGACAGUG AAGGC	3378

AD-958938.1	A-1808873.1	2336	ascscac(Ghd)gadCa dGuucccguaL96	A-1808874.1	2454	VPusdAsuadCgdG gaacdTgdTccgugg usasg	CUACCACGG ACAGUUCCC GUAUU	3379
AD-958942.1	A-1808881.1	2337	csgsgac(Ahd)gudTc dCcguauucuaL96	A-1808882.1	2455	VPusdAsagdAadT acggdGadAcugucc gsusg	CACGGACAG UUCCCGUAU UCUUG	3380
AD-958943.1	A-1808883.1	2338	gsgsaca(Ghd)uudCc dCguauucuugaL96	A-1808884.1	2456	VPusdCsaadGadA uacgdGgdAacuguc csgsu	ACGGACAGU UCCCGUAUU CUUGG	3381
AD-958944.1	A-1808885.1	2339	gsascag(Uhd)ucdCc dGuauucuuggaL96	A-1808886.1	2457	VPusdCscadAgdA auacdGgdGaacugu cscsg	CGGACAGUU CCCGUAUUC UUGGG	3382
AD-958983.1	A-1808963.1	2340	csasggc(Chd)ucdTg dGgucauuuacaL96	A-1808964.1	2458	VPusdGsuadAadT gaccdCadGaggccu gscsu	AGCAGGCCU CUGGGUCAU UUACA	3383
AD-958984.1	A-1808965.1	2341	asgsgcc(Uhd)cudGg dGucauuuacaaL96	A-1808966.1	2459	VPusdTsgudAadA ugacdCcdAgaggcc usgsc	GCAGGCCUC UGGGUCAUU UACAG	3384
AD-958985.1	A-1808967.1	2342	gsgscu(Chd)ugdGg dTcauuuacagaL96	A-1808968.1	2460	VPusdCsugdTadA augadCcdCagaggc csusg	CAGGCCUCU GGGUCAUUU ACAGC	3385
AD-959013.1	A-1809023.1	2343	asgsgcc(Ahd)aadGg dTgccauugucaL96	A-1809024.1	2461	VPusdGsacdAadT ggcadCcdTuuggcc	UGAGGCCAA AGGUGCCAU	3386

						uscsa	UGUCC	
AD-959025.1	A-1809047.1	2344	cscsauu(Ghd)ucdCu dCuccaaacugaL96	A-1809048.1	2462	VPusdCsagdTudTg gagdAgdGacaaugg scsa	UGCCAUUGU CCUCUCCAA ACUGA	3387
AD-959102.1	A-1809201.1	2345	gsuscgc(Chd)aadTg dCcuucaucauaL96	A-1809202.1	2463	VPusdAsugdAudG aaggdCadTuggcga csusg	CAGUCGCCA AUGCCUUCA UCAUC	3388
AD-959167.1	A-1809331.1	2346	usascg(Uhd)cadAc dTuugcuuaugaL96	A-1809332.1	2464	VPusdCsaudAadG caaadGudTgacggu asgsc	GCUACCGUC AACUUUGCU UAUGA	3389
AD-959168.1	A-1809333.1	2347	ascscgu(Chd)aadCu dTugcuuaugaaL96	A-1809334.1	2465	VPusdTscadTadAg caadAgdTugacggu sasg	CUACCGUCA ACUUUGCUU AUGAC	3390
AD-959169.1	A-1809335.1	2348	cscsguc(Ahd)acdTu dTgcuuaugacaL96	A-1809336.1	2466	VPusdGsucdAudA agcadAadGuugacg gsusa	UACCGUCAA CUUUGCUUA UGACA	3391
AD-959183.1	A-1809363.1	2349	usasuga(Chd)acdAg dGcacagguauaL96	A-1809364.1	2467	VPusdAsuadCcdT gugcdCudGugucau asasg	CUUAUGACA CAGGCACAG GUAUC	3392
AD-959210.1	A-1809417.1	2350	ascscu(Ghd)acdCa dTcccauucaaaL96	A-1809418.1	2468	VPusdTsgdAadT gggadTgdGucaggg uscsu	AGACCCUGA CCAUCCCAU UCAAG	3393
AD-	A-1809419.1	2351	cscscug(Ahd)ccdAu	A-1809420.1	2469	VPusdCsuudGadA	GACCCUGAC	3394

959211.1			dCccauucaagaL96			ugggdAudGgucagg gsusc	CAUCCCAUU CAAGA	
AD- 959216.1	A-1809429.1	2352	ascscau(Chd)ccdAu dTcaagaaccgaL96	A-1809430.1	2470	VPusdCsggdTudC uugadAudGggaugg uscsa	UGACCAUCC CAUUCAAGA ACCGC	3395
AD- 959217.1	A-1809431.1	2353	cscsauc(Chd)cadTud CaagaaccgcaL96	A-1809432.1	2471	VPusdGscgdGudT cuugdAadTgggaug gsusc	GACCAUCCC AUUCAAGAA CCGCU	3396
AD- 959239.1	A-1809475.1	2354	usasagu(Ahd)cadGc dAgcaugauugaL96	A-1809476.1	2472	VPusdCsaadTcdAu gcudGcdTguacuua susa	UAUAAGUAC AGCAGCAUG AUUGA	3397
AD- 959240.1	A-1809477.1	2355	asasgua(Chd)agdCa dGcaugauugaaL96	A-1809478.1	2473	VPusdTscadAudCa ugcdTgdCuguacuu sasus	AUAAGUACA GCAGCAUGA UUGAC	3398
AD- 959242.1	A-1809481.1	2356	gsusaca(Ghd)cadGc dAugauugacuaL96	A-1809482.1	2474	VPusdAsgudCadA ucaudGcdTgcugua csusu	AAGUACAGC AGCAUGAUU GACUA	3399
AD- 959262.1	A-1809521.1	2357	uscsuuu(Ghd)ccdTg dGgacaacuugaL96	A-1809522.1	2475	VPusdCsaadGudT guccdCadGgcaaag asgsc	GCUCUUUGC CUGGGACAA CUUGA	3400
AD- 959280.1	A-1809557.1	2358	usgsaac(Ahd)ugdGu dCacuuaugacaL96	A-1809558.1	2476	VPusdGsucdAudA agugdAcdCauguuc asasg	CUUGAACAU GGUCACUUA UGACA	3401

AD-959300.1	A-1809597.1	2359	asuscaa(Ghd)cudCu dCcaauguguaL96	A-1809598.1	2477	VPusdCsacdAudC uuggdAgdAgcuuga usgsu	ACAUCAAGC UCUCCAAGA UGUGA	3402
AD-959301.1	A-1809599.1	2360	uscsaag(Chd)ucdTc dCaaugugaaL96	A-1809600.1	2478	VPusdTscadCadTc uugdGadGagcuuga susg	CAUCAAGCU CUCCAAGAU GUGAA	3403
AD-959449.1	A-1809895.1	2361	ususcag(Ghd)aadTu dGuagucugagaL96	A-1809896.1	2479	VPusdCsucdAgdA cuacdAadTuccugaa susa	UAUUCAGGA AUUGUAGUC UGAGG	3404
AD-959484.1	A-1809965.1	2362	usasucu(Uhd)cudGu dCagcauuuaL96	A-1809966.1	2480	VPusdAsuadAadT gcugdAcdAgaagau asasa	UUUAUCUUC UGUCAGCAU UUAUG	3405
AD-959485.1	A-1809967.1	2363	asuscuu(Chd)ugdTc dAgcauuuaugaL96	A-1809968.1	2481	VPusdCsaudAadA ugcudGadCagaaga usasa	UUAUCUUCU GUCAGCAUU UAUGG	3406
AD-959486.1	A-1809969.1	2364	uscsuuc(Uhd)gudCa dGcauuuauggaL96	A-1809970.1	2482	VPusdCscadTadAa ugcdTgdAcagaagas usa	UAUCUUCUG UCAGCAUUU AUGGG	3407
AD-959487.1	A-1809971.1	2365	csusucu(Ghd)ucdAg dCauuuauugggaL96	A-1809972.1	2483	VPusdCscdAudA aaugdCudGacagaa gsasu	AUCUUCUGU CAGCAUUUA UGGGA	3408
AD-959489.1	A-1809975.1	2366	uscsugu(Chd)agdCa dTuuauugggauaL96	A-1809976.1	2484	VPusdAsucdCcdA uaaadTgdCugacaga	CUUCUGUCA GCAUUUAUG	3409

						sasg	GGAUG	
AD-959490.1	A-1809977.1	2367	csusguc(Ahd)gcdAudTuaugggaugaL96	A-1809978.1	2485	VPusdCsaudCcdCa uaadAudGcugacag sasa	UUCUGUCAG CAUUUAUGG GAUGU	3410
AD-959497.1	A-1809991.1	2368	csasuuu(Ahd)ugdGgdAuguuuaaugaL96	A-1809992.1	2486	VPusdCsaudTadAa caudCcdCauaaaugs csu	AGCAUUUAU GGGAUGUU UAAUGA	3411
AD-959498.1	A-1809993.1	2369	asusuua(Uhd)ggdGadTguuuuaugaaL96	A-1809994.1	2487	VPusdTscadTudAa acadTcdCcauaaaus gsc	GCAUUUAUG GGGAUGUUU AAUGAC	3412
AD-959499.1	A-1809995.1	2370	ususauu(Ghd)ggdAudGuuuuaugacaL96	A-1809996.1	2488	VPusdGsucdAudT aaacdAudCccauaaa susg	CAUUUAUGG GAUGUUUA AUGACA	3413
AD-959506.1	A-1810009.1	2371	gsasugu(Uhd)uadAudGacauaguucaL96	A-1810010.1	2489	VPusdGsaadCudA ugucdAudTaaacau cscsc	GGGAUGUU UAAUGACAU AGUUCA	3414
AD-959515.1	A-1810027.1	2372	usgsaca(Uhd)agdTudCaaguuuucuaL96	A-1810028.1	2490	VPusdAsgadAadA cuugdAadCuauguc asusu	AAUGACAUA GUUCAAGUU UUCUU	3415
AD-959516.1	A-1810029.1	2373	gsascau(Ahd)gudTcdAaguuuucuaL96	A-1810030.1	2491	VPusdAsagdAadA acuudGadAcuaugu csasu	AUGACAUAG UUCAAGUUU UCUUG	3416
AD-	A-1810031.1	2374	ascsaau(Ghd)uudCa	A-1810032.1	2492	VPusdCsaadGadA	UGACAUAGU	3417

959517.1			dAguuuucuugaL96			aacudTgdAacuaug uscsa	UCAAGUUUU CUUGU	
AD- 959518.1	A-1810033.1	2375	csasuag(Uhd)ucdAa dGuuuucuuguaL96	A-1810034.1	2493	VPusdAscadAgdA aaacdTudGaacuaug susc	GACAUAGUU CAAGUUUUC UUGUG	3418
AD- 959519.1	A-1810035.1	2376	asusagu(Uhd)cadAg dTuuucuugugaL96	A-1810036.1	2494	VPusdCsacdAadG aaaadCudTgaacuau sgsu	ACAUAGUUC AAGUUUUCU UGUGA	3419
AD- 959520.1	A-1810037.1	2377	usasguu(Chd)aadGu dTuuucuugugaaL96	A-1810038.1	2495	VPusdTscadCadAg aaadAcdTugaacuas usg	CAUAGUUCA AGUUUUCUU GUGAU	3420
AD- 959521.1	A-1810039.1	2378	asgsuuc(Ahd)agdTu dTucuugugauaL96	A-1810040.1	2496	VPusdAsucdAcdA agaadAadCuugaac usasu	AUAGUUCAA GUUUUCUUG UGAUU	3421
AD- 959524.1	A-1810045.1	2379	uscsaag(Uhd)uudTc dTugugauuugaL96	A-1810046.1	2497	VPusdCsaadAudC acaadGadAaacuug asasc	GUUCAAGUU UUCUUGUGA UUUGG	3422
AD- 959560.1	A-1810117.1	2380	gsasaaa(Chd)cadTud GcucuugcauaL96	A-1810118.1	2498	VPusdAsugdCadA gagcdAadTgguuuu csasg	CUGAAAACC AUUGCUCUU GCAUG	3423
AD- 959561.1	A-1810119.1	2381	asasaac(Chd)audTgd CucuugcaugaL96	A-1810120.1	2499	VPusdCsaudGcdA agagdCadAugguuu uscsa	UGAAAACCA UUGCUCUUG CAUGU	3424

AD-959567.1	A-1810131.1	2382	asusugc(Uhd)cudTg dCauguuacauaL96	A-1810132.1	2500	VPusdAsugdTadA caugdCadAgagcaa usgsg	CCAUUGCUC UUGCAUGUU ACAUG	3425
AD-959568.1	A-1810133.1	2383	ususgcu(Chd)uudGc dAuguuacaugaL96	A-1810134.1	2501	VPusdCsaudGudA acaudGcdAagagca asusg	CAUUGCUCU UGCAUGUUA CAUGG	3426
AD-959571.1	A-1810139.1	2384	csuscuu(Ghd)cadTg dTuacaugguuaL96	A-1810140.1	2502	VPusdAsacdCadTg uaadCadTgcaagags csa	UGCUCUUGC AUGUUACAU GGUUA	3427
AD-959572.1	A-1810141.1	2385	uscsuug(Chd)audGu dTacaugguuaaL96	A-1810142.1	2503	VPusdTsaadCcdAu guadAcdAugcaaga sgsc	GCUCUUGCA UGUUACAUG GUUAC	3428
AD-959607.1	A-1810211.1	2386	asasaag(Chd)audAa dCuucuaaaggaL96	A-1810212.1	2504	VPusdCscudTudA gaagdTudAugcuuu ususa	UAAAAAGCA UAACUUCUA AAGGA	3429
AD-959608.1	A-1810213.1	2387	asasagc(Ahd)uadAc dTucuaaaggaaL96	A-1810214.1	2505	VPusdTscdudTudTa gaadGudTaugcuuu susu	AAAAAGCAU AACUUCUAA AGGAA	3430
AD-959619.1	A-1810235.1	2388	uscsuaa(Ahd)ggdAa dGcagaauagcaL96	A-1810236.1	2506	VPusdGscudAudT cugcdTudCcuuuag asasg	CUUCUAAAG GAAGCAGAA UAGCU	3431
AD-959620.1	A-1810237.1	2389	csusaaa(Ghd)gadAg dCagaauagcuaL96	A-1810238.1	2507	VPusdAsgcdTadTu cugdCudTccuuuag	UUCUAAAGG AAGCAGAAU	3432

						sasa	AGCUC	
AD- 959661.1	A-1810319.1	2390	asasgua(Ahd)gadTg dCauuuacuacaL96	A-1810320.1	2508	VPusdGsuadGudA aaugdCadTcuuacu usasu	AUAAGUAA GAUGCAUUU ACUACA	3433
AD- 959682.1	A-1810361.1	2391	gsusugg(Chd)uudCu dAaugcuucagaL96	A-1810362.1	2509	VPusdCsugdAadG cauudAgdAagccaa csusg	CAGUUGGCU UCUAAUGCU UCAGA	3434
AD- 959689.1	A-1810375.1	2392	uscsuaa(Uhd)gcdTu dCagauagaauaL96	A-1810376.1	2510	VPusdAsuudCudA ucugdAadGcauuag asasg	CUUCUAAUG CUUCAGAU GAAUA	3435
AD- 959693.1	A-1810383.1	2393	asusgcu(Uhd)cadGa dTagaauacagaL96	A-1810384.1	2511	VPusdCsugdTadTu cuadTcdTgaagcaus usa	UAAUGCUUC AGAUAGAA UACAGU	3436
AD- 959696.1	A-1810389.1	2394	csusuca(Ghd)audAg dAauacaguugaL96	A-1810390.1	2512	VPusdCsaadCudG uauudCudAucugaa gscsa	UGCUUCAGA UAGAAUACA GUUGG	3437

Таблица 5В

Иллюстративные немодифицированные последовательности одиночных цепей и дуплексов миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	Название последовательности смысловой цепи	SEQ ID NO: (смысловая цепь)	Последовательность смысловой цепи (5'-3')	Диапазоны	Название последовательности антисмысловой цепи	SEQ ID NO: (антисмысловая цепь)	Последовательности антисмысловой цепи	Последовательность мРНК-мишени
AD-957960.1	A-1806917.1	2513	CAGCACAG CAGAGCUU UCCAA	33-53	A-1806918.1	2631	UTGGAAAGC UCTGCUGUG CUGAG	31-53
AD-957961.1	A-1806919.1	2514	AGCACAGC AGAGCUUU CCAGA	34-54	A-1806920.1	2632	UCUGGAAAG CUCUGCUGU GCUGA	32-54
AD-958008.1	A-1807013.1	2515	AGGUUCUU CUGUGCAC GUUGA	81-101	A-1807014.1	2633	UCAACGTGC ACAGAAGAA CCUCA	79-101
AD-958009.1	A-1807015.1	2516	GGUUCUUC TGTGCACGU UGCA	82-102	A-1807016.1	2634	UGCAACGUG CACAGAAGA ACCUC	80-102
AD-958145.1	A-1807287.1	2517	GCCAGUCCC AAUGAAUC CAGA	237-257	A-1807288.1	2635	UCUGGATUC AUTGGGACU GGCCA	235-257
AD-958368.1	A-1807733.1	2518	UCCGAGAC	514-534	A-1807734.1	2636	UCAGAACUG	512-534

			AAGUCAGU UCUGA				ACTUGUCUC GGAGG	
AD-958369.1	A-1807735.1	2519	CCGAGACA AGTCAGUU CUGGA	515-535	A-1807736.1	2637	UCCAGAACU GACUTGUCU CGGAG	513-535
AD-958488.1	A-1807973.1	2520	AGGCUCCA GAGAAGUU UCUAA	668-688	A-1807974.1	2638	UTAGAAACU UCTCTGGAG CCUGG	666-688
AD-958489.1	A-1807975.1	2521	GGCUCCAG AGAAGUUU CUACA	669-689	A-1807976.1	2639	UGUAGAAAC UUCUCUGGA GCCUG	667-689
AD-958509.1	A-1808015.1	2522	GUGGAAUU TGGACACU UUGGA	689-709	A-1808016.1	2640	UCCAAAGUG UCCAAAUUC CACGU	687-709
AD-958510.1	A-1808017.1	2523	UGGAAUUU GGACACUU UGGCA	690-710	A-1808018.1	2641	UGCCAAAGU GUCCAAAUU CCACG	688-710
AD-958511.1	A-1808019.1	2524	GGAAUUUG GACACUUU GGCCA	691-711	A-1808020.1	2642	UGGCCAAAG UGTCCAAAU UCCAC	689-711
AD-958512.1	A-1808021.1	2525	GAAUUUGG ACACUUUG GCCUA	692-712	A-1808022.1	2643	UAGGCCAAA GUGUCCAAA UUCCA	690-712

AD-958518.1	A-1808033.1	2526	GGACACUU TGGCCUUCC AGGA	698-718	A-1808034.1	2644	UCCUGGAAG GCCAAAGUG UCCAA	696-718
AD-958532.1	A-1808061.1	2527	UCCAGGAA CUGAAGUC CGAGA	712-732	A-1808062.1	2645	UCUCGGACU UCAGTUCCU GGAAG	710-732
AD-958539.1	A-1808075.1	2528	ACUGAAGU CCGAGCUA ACUGA	719-739	A-1808076.1	2646	UCAGTUAGC UCGGACUUC AGUUC	717-739
AD-958548.1	A-1808093.1	2529	CGAGCUAA CUGAAGUU CCUGA	728-748	A-1808094.1	2647	UCAGGAACU UCAGTUAGC UCGGA	726-748
AD-958555.1	A-1808107.1	2530	ACUGAAGU TCCUGCUUC CCGA	735-755	A-1808108.1	2648	UCGGGAAGC AGGAACUUC AGUUA	733-755
AD-958561.1	A-1808119.1	2531	GUUCCUGCT UCCCGAAU UUUA	741-761	A-1808120.1	2649	UAAAAUTCG GGAAGCAGG AACUU	739-761
AD-958563.1	A-1808123.1	2532	UCCUGCUU CCCGAAUU UUGAA	743-763	A-1808124.1	2650	UTC AAAAUU CGGGAAGCA GGAAC	741-763
AD-958564.1	A-1808125.1	2533	CCUGCUUCC CGAAUUUU	744-764	A-1808126.1	2651	UTUCAAAAU UCGGGAAGC	742-764

			GAAA				AGGAA	
AD-958565.1	A-1808127.1	2534	CUGCUUCCC GAAUUUUG AAGA	745-765	A-1808128.1	2652	UCUUCAAAA UUCGGGAAG CAGGA	743-765
AD-958566.1	A-1808129.1	2535	UGCUUCCC GAAUUUUG AAGGA	746-766	A-1808130.1	2653	UCCUTCAAA AUTCGGGAA GCAGG	744-766
AD-958568.1	A-1808133.1	2536	CUUCCCGA AUTUUGAA GGAGA	748-768	A-1808134.1	2654	UCUCCUTCA AAAUTCGGG AAGCA	746-768
AD-958628.1	A-1808253.1	2537	GAUGUGGA GAACUAGU UUGGA	808-828	A-1808254.1	2655	UCCAAACUA GUTCTCCAC AUCCG	806-828
AD-958629.1	A-1808255.1	2538	AUGUGGAG AACUAGUU UGGGA	809-829	A-1808256.1	2656	UCCCAAACU AGTUCUCCA CAUCC	807-829
AD-958630.1	A-1808257.1	2539	UGUGGAGA ACTAGUUU GGGUA	810-830	A-1808258.1	2657	UACCCAAAC UAGUTCUCC ACAUC	808-830
AD-958632.1	A-1808261.1	2540	UGGAGAAC TAGUUUGG GUAGA	812-832	A-1808262.1	2658	UCUACCCAA ACTAGUUCU CCACA	810-832
AD-958633.1	A-1808263.1	2541	GGAGAACU	813-833	A-1808264.1	2659	UCCUACCCA	811-833

			AGTUUGGG UAGGA				AACUAGUUC UCCAC	
AD-958635.1	A-1808267.1	2542	AGAACUAG TUTGGGUA GGAGA	815-835	A-1808268.1	2660	UCUCCUACC CAAACUAGU UCUCC	813-835
AD-958671.1	A-1808339.1	2543	AACAGCAG AAACAAUU ACUGA	851-871	A-1808340.1	2661	UCAGTAAUU GUTUCUGCU GUUCU	849-871
AD-958672.1	A-1808341.1	2544	ACAGCAGA AACAAUUA CUGGA	852-872	A-1808342.1	2662	UCCAGUAAU UGTUTCUGC UGUUC	850-872
AD-958680.1	A-1808357.1	2545	AACAAUUA CUGGCAAG UAUGA	860-880	A-1808358.1	2663	UCAUACTUG CCAGTAAUU GUUUC	858-880
AD-958681.1	A-1808359.1	2546	ACAAUUAC TGGCAAGU AUGGA	861-881	A-1808360.1	2664	UCCATACUU GCCAGUAAU UGUUU	859-881
AD-958682.1	A-1808361.1	2547	CAAUUACU GGCAAGUA UGGUA	862-882	A-1808362.1	2665	UACCAUACU UGCCAGUAA UUGUU	860-882
AD-958683.1	A-1808363.1	2548	AAUUACUG GCAAGUAU GGUGA	863-883	A-1808364.1	2666	UCACCATAC UUGCCAGUA AUUGU	861-883

AD-958684.1	A-1808365.1	2549	AUUACUGG CAAGUAUG GUGUA	864-884	A-1808366.1	2667	UACACCAUA CUTGCCAGU AAUUG	862-884
AD-958685.1	A-1808367.1	2550	UUACUGGC AAGUAUGG UGUGA	865-885	A-1808368.1	2668	UCACACCAU ACTUGCCAG UAAUU	863-885
AD-958695.1	A-1808387.1	2551	GUAUGGUG TGTGGAUGC GAGA	875-895	A-1808388.1	2669	UCUCGCAUC CACACACCA UACUU	873-895
AD-958742.1	A-1808481.1	2552	GAUGUCCG CCAGGUUU UUGAA	957-977	A-1808482.1	2670	UTC AAAAAC CUGGCGGAC AUCCG	955-977
AD-958757.1	A-1808511.1	2553	UUUGAGUA TGACCUCAU CAGA	972-992	A-1808512.1	2671	UCUGAUGAG GUCATACUC AAAAA	970-992
AD-958767.1	A-1808531.1	2554	ACCUCAUC AGCCAGUU UAUGA	982-1002	A-1808532.1	2672	UCAUAAACU GGCUGAUGA GGUCA	980-1002
AD-958768.1	A-1808533.1	2555	CCUCAUCA GCCAGUUU AUGCA	983-1003	A-1808534.1	2673	UGCATAAAC UGGCTGAUG AGGUC	981-1003
AD-958770.1	A-1808537.1	2556	UCAUCAGC CAGUUUAU	985-1005	A-1808538.1	2674	UCUGCATAA ACTGGCUGA	983-1005

			GCAGA				UGAGG	
AD-958786.1	A-1808569.1	2557	GCAGGGCU ACCCUUCU AAGGA	1001-1021	A-1808570.1	2675	UCCUTAGAA GGGUAGCCC UGCAU	999-1021
AD-958787.1	A-1808571.1	2558	CAGGGCUA CCCUUCUA AGGUA	1002-1022	A-1808572.1	2676	UACCTUAGA AGGGTAGCC CUGCA	1000-1022
AD-958789.1	A-1808575.1	2559	GGGCUACC CUTCUAAG GUUCA	1004-1024	A-1808576.1	2677	UGAACCTUA GAAGGGUA GCCCUG	1002-1024
AD-958797.1	A-1808591.1	2560	CUUCUAAG GUTCACAU ACUGA	1012-1032	A-1808592.1	2678	UCAGTATGU GAACCUUAG AAGGG	1010-1032
AD-958798.1	A-1808593.1	2561	UUCUAAGG TUCACAUAC UGCA	1013-1033	A-1808594.1	2679	UGCAGUAUG UGAACCUUA GAAGG	1011-1033
AD-958864.1	A-1808725.1	2562	GUCCAGAA CUGUCAUA AGAUA	1097-1117	A-1808726.1	2680	UAUCTUAUG ACAGTUCUG GACUC	1095-1117
AD-958867.1	A-1808731.1	2563	CAGAACUG TCAUAAGA UAUGA	1100-1120	A-1808732.1	2681	UCAUAUCUU AUGACAGUU CUGGA	1098-1120
AD-958868.1	A-1808733.1	2564	AGAACUGU	1101-1121	A-1808734.1	2682	UTCATATCU	1099-1121

			CATAAGAU AUGAA				UATGACAGU UCUGG	
AD-958869.1	A-1808735.1	2565	GAACUGUC AUAAGAUA UGAGA	1102-1122	A-1808736.1	2683	UCUCAUAUC UUAUGACAG UUCUG	1100-1122
AD-958870.1	A-1808737.1	2566	AACUGUCA TAAGAUAU GAGCA	1103-1123	A-1808738.1	2684	UGCUCATAU CUTATGACA GUUCU	1101-1123
AD-958879.1	A-1808755.1	2567	AAGAU AUG AGCUGAAU ACCGA	1112-1132	A-1808756.1	2685	UCGGTATUC AGCUCAUAU CUUAU	1110-1132
AD-958880.1	A-1808757.1	2568	AGAUAUGA GCTGAAUA CCGAA	1113-1133	A-1808758.1	2686	UTC GGUAU CAGCTCAUA UCUUA	1111-1133
AD-958881.1	A-1808759.1	2569	GAUAUGAG CUGAAUAC CGAGA	1114-1134	A-1808760.1	2687	UCUCGGTAU UCAGCUCAU AUCUU	1112-1134
AD-958890.1	A-1808777.1	2570	UGAAUACC GAGACAGU GAAGA	1123-1143	A-1808778.1	2688	UCUUCACUG UCTCGGUAU UCAGC	1121-1143
AD-958891.1	A-1808779.1	2571	GAAUACCG AGACAGUG AAGGA	1124-1144	A-1808780.1	2689	UCCUTCACU GUCUCGGUA UUCAG	1122-1144

AD-958938.1	A-1808873.1	2572	ACCACGGA CAGUUCCC GUAUA	1171-1191	A-1808874.1	2690	UAUACGGGA ACTGTCCGU GGUAG	1169-1191
AD-958942.1	A-1808881.1	2573	CGGACAGU TCCCGUAUU CUUA	1175-1195	A-1808882.1	2691	UAAGAATAC GGGAACUGU CCGUG	1173-1195
AD-958943.1	A-1808883.1	2574	GGACAGUU CCCGUAUU CUUGA	1176-1196	A-1808884.1	2692	UCAAGAAUA CGGGAACUG UCCGU	1174-1196
AD-958944.1	A-1808885.1	2575	GACAGUUC CCGUAUUC UUGGA	1177-1197	A-1808886.1	2693	UCCAAGAAU ACGGGAACU GUCCG	1175-1197
AD-958983.1	A-1808963.1	2576	CAGGCCUCT GGGUCAUU UACA	1234-1254	A-1808964.1	2694	UGUAAATGA CCCAGAGGC CUGCU	1232-1254
AD-958984.1	A-1808965.1	2577	AGGCCUCU GGGUCAUU UACAA	1235-1255	A-1808966.1	2695	UTGUAAAUG ACCCAGAGG CCUGC	1233-1255
AD-958985.1	A-1808967.1	2578	GGCCUCUG GGTCAUUU ACAGA	1236-1256	A-1808968.1	2696	UCUGTAAAU GACCCAGAG GCCUG	1234-1256
AD-959013.1	A-1809023.1	2579	AGGCCAAA GGTGCCAU	1264-1284	A-1809024.1	2697	UGACAATGG CACCTUUGG	1262-1284

			UGUCA				CCUCA	
AD-959025.1	A-1809047.1	2580	CCAUUGUC CUCUCCAA ACUGA	1276-1296	A-1809048.1	2698	UCAGTUTGG AGAGGACAA UGGCA	1274-1296
AD-959102.1	A-1809201.1	2581	GUCGCCAAT GCCUUCAU CAUA	1353-1373	A-1809202.1	2699	UAUGAUGA AGGCATUGG CGACUG	1351-1373
AD-959167.1	A-1809331.1	2582	UACCGUCA ACTUUGCU UAUGA	1418-1438	A-1809332.1	2700	UCAUAAGCA AAGUTGACG GUAGC	1416-1438
AD-959168.1	A-1809333.1	2583	ACCGUCA CUTUGCUU AUGAA	1419-1439	A-1809334.1	2701	UTCATAAGC AAAGTUGAC GGUAG	1417-1439
AD-959169.1	A-1809335.1	2584	CCGUCAACT UTGCUUAU GACA	1420-1440	A-1809336.1	2702	UGUCAUAAG CAAAGUUGA CGGUA	1418-1440
AD-959183.1	A-1809363.1	2585	UAUGACAC AGGCACAG GUAUA	1434-1454	A-1809364.1	2703	UAUACCTGU GCCUGUGUC AUAAG	1432-1454
AD-959210.1	A-1809417.1	2586	ACCCUGACC ATCCCAUUC AAA	1461-1481	A-1809418.1	2704	UTUGAATGG GATGGUCAG GGUCU	1459-1481
AD-959211.1	A-1809419.1	2587	CCCUGACCA	1462-1482	A-1809420.1	2705	UCUUGAAUG	1460-1482

			UCCCAUUC AAGA				GGAUGGUCA GGGUC	
AD-959216.1	A-1809429.1	2588	ACCAUCCCA UTCAAGAA CCGA	1467-1487	A-1809430.1	2706	UCGGTUCUU GAAUGGGA UGGUCA	1465-1487
AD-959217.1	A-1809431.1	2589	CCAUCCCAT UCAAGAAC CGCA	1468-1488	A-1809432.1	2707	UGCGGUTCU UGAATGGGA UGGUC	1466-1488
AD-959239.1	A-1809475.1	2590	UAAGUACA GCAGCAUG AUUGA	1490-1510	A-1809476.1	2708	UCAATCAUG CUGCTGUAC UUAUA	1488-1510
AD-959240.1	A-1809477.1	2591	AAGUACAG CAGCAUGA UUGAA	1491-1511	A-1809478.1	2709	UTCAAUCAU GCTGCUGUA CUUAU	1489-1511
AD-959242.1	A-1809481.1	2592	GUACAGCA GCAUGAUU GACUA	1493-1513	A-1809482.1	2710	UAGUCAAUC AUGCTGCUG UACUU	1491-1513
AD-959262.1	A-1809521.1	2593	UCUUUGCCT GGGACAAC UUGA	1534-1554	A-1809522.1	2711	UCAAGUTGU CCCAGGCAA AGAGC	1532-1554
AD-959280.1	A-1809557.1	2594	UGAACAUG GUCACUUA UGACA	1552-1572	A-1809558.1	2712	UGUCAUAAG UGACCAUGU UCAAG	1550-1572

AD-959300.1	A-1809597.1	2595	AUCAAGCU CUCCAAGA UGUGA	1572-1592	A-1809598.1	2713	UCACAUCUU GGAGAGCUU GAUGU	1570-1592
AD-959301.1	A-1809599.1	2596	UCAAGCUCT CCAAGAUG UGAA	1573-1593	A-1809600.1	2714	UTCACATCU UGGAGAGCU UGAUG	1571-1593
AD-959449.1	A-1809895.1	2597	UUCAGGAA TUGUAGUC UGAGA	1752-1772	A-1809896.1	2715	UCUCAGACU ACAATUCCU GAAUA	1750-1772
AD-959484.1	A-1809965.1	2598	UAUCUUCU GUCAGCAU UUAUA	1804-1824	A-1809966.1	2716	UAUAAATGC UGACAGAAG AUAAA	1802-1824
AD-959485.1	A-1809967.1	2599	AUCUUCUG TCAGCAUU UAUGA	1805-1825	A-1809968.1	2717	UCAUAAAUG CUGACAGAA GAUAA	1803-1825
AD-959486.1	A-1809969.1	2600	UCUUCUGU CAGCAUUU AUGGA	1806-1826	A-1809970.1	2718	UCCATAAAU GCTGACAGA AGAU	1804-1826
AD-959487.1	A-1809971.1	2601	CUUCUGUC AGCAUUUA UGGGA	1807-1827	A-1809972.1	2719	UCCCAUAAA UGCUGACAG AAGAU	1805-1827
AD-959489.1	A-1809975.1	2602	UCUGUCAG CATUUAUG	1809-1829	A-1809976.1	2720	UAUCCCAUA AATGCUGAC	1807-1829

			GGAUA				AGAAG	
AD-959490.1	A-1809977.1	2603	CUGUCAGC AUTUAUGG GAUGA	1810-1830	A-1809978.1	2721	UCAUCCCAU AAAUGCUGA CAGAA	1808-1830
AD-959497.1	A-1809991.1	2604	CAUUUAUG GGAUGUUU AAUGA	1817-1837	A-1809992.1	2722	UCAUTAAAC AUCCCAUAA AUGCU	1815-1837
AD-959498.1	A-1809993.1	2605	AUUUAUGG GATGUUUA AUGAA	1818-1838	A-1809994.1	2723	UTCATUAAA CATCCCAUA AAUGC	1816-1838
AD-959499.1	A-1809995.1	2606	UUUAUGGG AUGUUUAA UGACA	1819-1839	A-1809996.1	2724	UGUCAUTAA ACAUCCCAU AAAUG	1817-1839
AD-959506.1	A-1810009.1	2607	GAUGUUUA AUGACAUA GUUCA	1826-1846	A-1810010.1	2725	UGAACUAUG UCAUTAAAC AUCCC	1824-1846
AD-959515.1	A-1810027.1	2608	UGACAUAG TUCAAGUU UUCUA	1835-1855	A-1810028.1	2726	UAGAAAACU UGAACUAUG UCAUU	1833-1855
AD-959516.1	A-1810029.1	2609	GACAUAGU TCAAGUUU UCUUA	1836-1856	A-1810030.1	2727	UAAGAAAAC UUGAACUAU GUCAU	1834-1856
AD-959517.1	A-1810031.1	2610	ACAUAGUU	1837-1857	A-1810032.1	2728	UCAAGAAAA	1835-1857

			CAAGUUUU CUUGA				CUTGAACUA UGUCA	
AD-959518.1	A-1810033.1	2611	CAUAGUUC AAGUUUUC UUGUA	1838-1858	A-1810034.1	2729	UACAAGAAA ACTUGAACU AUGUC	1836-1858
AD-959519.1	A-1810035.1	2612	AUAGUUCA AGTUUUCU UGUGA	1839-1859	A-1810036.1	2730	UCACAAGAA AACUTGAAC UAUGU	1837-1859
AD-959520.1	A-1810037.1	2613	UAGUUCAA GUTUUCUU GUGAA	1840-1860	A-1810038.1	2731	UTCACAAGA AAACTUGAA CUAUG	1838-1860
AD-959521.1	A-1810039.1	2614	AGUUCAAG TUTUCUUGU GAUA	1841-1861	A-1810040.1	2732	UAUCACAAG AAAACUUGA ACUAU	1839-1861
AD-959524.1	A-1810045.1	2615	UCAAGUUU TCTUGUGAU UUGA	1844-1864	A-1810046.1	2733	UCAAAUCAC AAGAAAACU UGAAC	1842-1864
AD-959560.1	A-1810117.1	2616	GAAAACCA TUGCUCUU GCAUA	1898-1918	A-1810118.1	2734	UAUGCAAGA GCAATGGUU UUCAG	1896-1918
AD-959561.1	A-1810119.1	2617	AAAACCAU TGCUCUUGC AUGA	1899-1919	A-1810120.1	2735	UCAUGCAAG AGCAAUGGU UUUCA	1897-1919

AD-959567.1	A-1810131.1	2618	AUUGCUCU TGCAUGUU ACAUA	1905-1925	A-1810132.1	2736	UAUGTAACA UGCAAGAGC AAUGG	1903-1925
AD-959568.1	A-1810133.1	2619	UUGCUCUU GCAUGUUA CAUGA	1906-1926	A-1810134.1	2737	UCAUGUAAAC AUGCAAGAG CAAUG	1904-1926
AD-959571.1	A-1810139.1	2620	CUCUUGCAT GTUACAUG GUUA	1909-1929	A-1810140.1	2738	UAACCATGU AACATGCAA GAGCA	1907-1929
AD-959572.1	A-1810141.1	2621	UCUUGCAU GUTACAUG GUUAA	1910-1930	A-1810142.1	2739	UTAACCAUG UAACAUGCA AGAGC	1908-1930
AD-959607.1	A-1810211.1	2622	AAAAGCAU AACUUCUA AAGGA	1945-1965	A-1810212.1	2740	UCCUTUAGA AGTUAUGCU UUUUA	1943-1965
AD-959608.1	A-1810213.1	2623	AAAGCAUA ACTUCUAA AGGAA	1946-1966	A-1810214.1	2741	UTCCTUTAG AAGUTAUGC UUUUU	1944-1966
AD-959619.1	A-1810235.1	2624	UCUAAAGG AAGCAGAA UAGCA	1957-1977	A-1810236.1	2742	UGCUAUTCU GCTUCCUUU AGAAG	1955-1977
AD-959620.1	A-1810237.1	2625	CUAAAGGA AGCAGAAU	1958-1978	A-1810238.1	2743	UAGCTATUC UGCUTCCUU	1956-1978

			AGCUA				UAGAA	
AD-959661.1	A-1810319.1	2626	AAGUAAGA TGCAUUUA CUACA	1999-2019	A-1810320.1	2744	UGUAGUAA AUGCATCUU ACUUAU	1997-2019
AD-959682.1	A-1810361.1	2627	GUUGGCUU CUAAUGCU UCAGA	2020-2040	A-1810362.1	2745	UCUGAAGCA UUAGAAGCC AACUG	2018-2040
AD-959689.1	A-1810375.1	2628	UCUAAUGC TUCAGAU GAAUA	2027-2047	A-1810376.1	2746	UAUUCUAUC UGAAGCAUU AGAAG	2025-2047
AD-959693.1	A-1810383.1	2629	AUGCUUCA GATAGAAU ACAGA	2031-2051	A-1810384.1	2747	UCUGTATUC UATCTGAAG CAUUA	2029-2051
AD-959696.1	A-1810389.1	2630	CUUCAGAU AGAAUACA GUUGA	2034-2054	A-1810390.1	2748	UCAACUGUA UUCUAUCUG AAGCA	2032-2054

Пример 2. Скрининг in vitro миРНК MYOC

Экспериментальные методы

Люциферазный анализ Dual-Glo®

Клетки Нера1-6 (ATCC) культивировали почти до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде DMEM (ATCC) с добавлением 10% FBS перед выделением из планшета трипсинизацией. Эксперимент с однократной дозой проводили при конечной концентрации дуплекса 10 нМ. Трансфекцию анти-MYOC миРНК и плазмиды psiCHECK2-MYOC (идентификационный номер в GenBank) проводили с помощью плазмиды, содержащей 3'-нетранслируемую область (UTR). Трансфекцию проводили добавлением 10 нМ дуплексов миРНК и 30 нг плазмиды psiCHECK2-MYOC в расчете на лунку вместе с 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,5 мкл липофектамина 2000 на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA. номер по каталогу 13778-150) и затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем смесь добавляли к клеткам (примерно 15000 на лунку), которые повторно суспендировали в 35 мкл свежей полной среды. Трансфектированные клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Через 24 ч трансфектировали миРНК и плазмиду psiCHECK2-MYOC; измеряли активность люциферазы светлячков (контроль трансфекции) и Renilla (слитой с последовательностью-мишенью MYOC). Сначала из клеток удаляли среду. Затем измеряли активность люциферазы светлячков добавлением 20 мкл реагента Dual-Glo® Luciferase Reagent (Promega), равного объему культуральной среды, в каждую лунку и перемешивания. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, после чего измеряли люминесценцию (500 нм) на Spectramax (Molecular Devices) для детектирования сигнала люциферазы светлячков. Активность люциферазы Renilla измеряли добавлением 20 мкл реагента Dual-Glo® Stop & Glo® (Promega) при комнатной температуре в каждую лунку и планшеты инкубировали в течение 10-15 мин перед повторным измерением люминесценции для определения сигнала активности люциферазы Renilla. Реагент Dual-Glo® Stop & Glo® гасил сигнал люциферазы светлячков и поддерживал люминесценцию в реакции люциферазы Renilla. Активность миРНК определяли нормализацией сигнала люциферазы Renilla (MYOC) к сигналу люциферазы светлячков (контроль) в каждой лунке. Затем оценивали величину активности миРНК по отношению к клеткам, которые были трансфектированы тем же вектором, но не были обработаны миРНК или были обработаны миРНК, не нацеленной на MYOC. Все трансфекции осуществляли с n=4.

Результаты

Результаты двойного скрининга люциферазы с однократной дозой в клетках Нера1-6, трансфектированных плазмидой MYOC (добавленной в количестве 30 нг/лунку) и обработанных рядом опытных миРНК MYOC, показаны в Таблице 6 (соответствуют миРНК в Таблице 2А). Эксперимент с однократной дозой проводили при конечной концентрации дуплекса 10 нМ, и данные выражены в процентах оставшегося сигнала люциферазы MYOC по отношению к клеткам, обработанным нецелевым контролем.

Из дуплексов миРНК, оцененных в клетках, трансфектированных МҮОС, 57 обеспечили $\geq 80\%$ нокдаун МҮОС, 188 обеспечили $\geq 60\%$ нокдаун МҮОС, 226 обеспечили $\geq 40\%$ нокдаун МҮОС и 264 обеспечили $\geq 20\%$ нокдаун МҮОС.

Таблица 6

Скрининг МҮОС in vitro с двойным люциферазным анализом 10 нМ с одним рядом иллюстративных миРНК МҮОС человека

	10 нМ	
Название дуплекса	% оставшегося сигнала люциферазы МҮОС	StDev
AD-886932.1	28.7	0.024
AD-886933.1	37.1	0.045
AD-886934.1	33.1	0.021
AD-886935.1	10.1	0.010
AD-886936.1	34.8	0.051
AD-886937.1	28.2	0.052
AD-886938.1	26.5	0.037
AD-886939.1	49.0	0.068
AD-886940.1	30.4	0.047
AD-886941.1	24.9	0.033
AD-886942.1	46.1	0.067
AD-886943.1	22.9	0.013
AD-886944.1	31.1	0.025
AD-886945.1	81.6	0.108
AD-886946.1	20.1	0.025
AD-886947.1	20.5	0.040
AD-886948.1	21.8	0.015
AD-886949.1	33.2	0.049
AD-886950.1	26.1	0.023
AD-886951.1	28.6	0.027
AD-886952.1	92.6	0.153
AD-886953.1	56.1	0.021
AD-886954.1	34.4	0.045
AD-886955.1	50.8	0.084
AD-886956.1	66.5	0.055

AD-886957.1	31.4	0.054
AD-886958.1	16.8	0.011
AD-886959.1	51.0	0.078
AD-886960.1	61.2	0.102
AD-886961.1	21.0	0.016
AD-886962.1	20.1	0.009
AD-886963.1	94.5	0.096
AD-886964.1	49.7	0.069
AD-886965.1	18.9	0.014
AD-886966.1	85.4	0.050
AD-886967.1	19.6	0.015
AD-886968.1	24.9	0.040
AD-886969.1	18.5	0.018
AD-886970.1	19.9	0.015
AD-886971.1	29.9	0.050
AD-886972.1	60.1	0.081
AD-886973.1	82.9	0.059
AD-886974.1	31.1	0.033
AD-886975.1	30.0	0.029
AD-886976.1	42.3	0.046
AD-886977.1	60.5	0.049
AD-886978.1	19.6	0.033
AD-886979.1	11.6	0.010
AD-886980.1	15.7	0.013
AD-886981.1	14.5	0.020
AD-886982.1	15.5	0.023
AD-886983.1	13.5	0.012
AD-886984.1	15.3	0.029
AD-886985.1	27.2	0.014
AD-886986.1	22.7	0.037
AD-886987.1	18.2	0.009
AD-886988.1	57.4	0.038
AD-886989.1	15.1	0.025
AD-886990.1	20.6	0.026

AD-886991.1	26.7	0.022
AD-886992.1	17.8	0.036
AD-886993.1	20.8	0.041
AD-886994.1	39.7	0.036
AD-886995.1	48.0	0.042
AD-886996.1	72.0	0.148
AD-886997.1	61.4	0.116
AD-886998.1	20.4	0.017
AD-886999.1	76.8	0.089
AD-887000.1	33.2	0.029
AD-887001.1	19.5	0.011
AD-887002.1	18.8	0.024
AD-887003.1	33.2	0.053
AD-887004.1	17.3	0.011
AD-887005.1	25.3	0.065
AD-887006.1	40.6	0.047
AD-887007.1	22.5	0.032
AD-887008.1	23.8	0.038
AD-887009.1	12.3	0.030
AD-887010.1	21.4	0.022
AD-887011.1	20.0	0.019
AD-887012.1	29.5	0.047
AD-887013.1	68.8	0.038
AD-887014.1	28.5	0.040
AD-887015.1	107.7	0.043
AD-887016.1	23.7	0.020
AD-887017.1	22.1	0.045
AD-887018.1	28.4	0.039
AD-887019.1	23.2	0.018
AD-887020.1	21.7	0.031
AD-887021.1	20.0	0.006
AD-887022.1	19.3	0.020
AD-887023.1	19.9	0.027
AD-887024.1	66.1	0.103

AD-887025.1	49.9	0.110
AD-887026.1	52.8	0.045
AD-887027.1	39.4	0.073
AD-887028.1	19.8	0.013
AD-887029.1	16.5	0.030
AD-887030.1	24.7	0.029
AD-887031.1	20.9	0.019
AD-887032.1	39.3	0.045
AD-887033.1	36.5	0.047
AD-887034.1	17.3	0.018
AD-887035.1	71.2	0.028
AD-887036.1	92.0	0.069
AD-887037.1	15.6	0.010
AD-887038.1	72.4	0.040
AD-887039.1	16.5	0.017
AD-887040.1	63.0	0.100
AD-887041.1	28.8	0.043
AD-887042.1	19.4	0.039
AD-887043.1	21.5	0.021
AD-887044.1	18.3	0.016
AD-887045.1	18.8	0.009
AD-887046.1	37.4	0.016
AD-887047.1	59.5	0.053
AD-887048.1	30.6	0.038
AD-887049.1	22.9	0.031
AD-887050.1	24.8	0.038
AD-887051.1	26.9	0.011
AD-887052.1	21.9	0.018
AD-887053.1	29.1	0.013
AD-887054.1	46.9	0.052
AD-887055.1	74.8	0.085
AD-887056.1	29.6	0.036
AD-887057.1	24.8	0.028
AD-887058.1	30.5	0.032

AD-887059.1	97.6	0.113
AD-887060.1	84.0	0.023
AD-887061.1	32.8	0.060
AD-887062.1	35.0	0.015
AD-887063.1	19.8	0.027
AD-887064.1	18.8	0.026
AD-887065.1	21.1	0.006
AD-887066.1	106.6	0.053
AD-887067.1	28.9	0.018
AD-887068.1	46.5	0.101
AD-887069.1	31.0	0.052
AD-887070.1	36.2	0.036
AD-887071.1	45.6	0.068
AD-887072.1	24.1	0.021
AD-887073.1	26.9	0.019
AD-887074.1	34.8	0.043
AD-887075.1	16.3	0.040
AD-887076.1	16.2	0.051
AD-887077.1	20.9	0.020
AD-887078.1	48.6	0.051
AD-887079.1	23.2	0.025
AD-887080.1	19.0	0.019
AD-887081.1	43.2	0.106
AD-887082.1	37.6	0.073
AD-887083.1	48.3	0.036
AD-887084.1	24.8	0.036
AD-887085.1	32.2	0.033
AD-887086.1	48.1	0.044
AD-887087.1	82.8	0.090
AD-887088.1	28.5	0.020
AD-887089.1	22.8	0.020
AD-887090.1	36.1	0.058
AD-887091.1	67.5	0.108
AD-887092.1	23.5	0.036

AD-887093.1	13.6	0.009
AD-887094.1	16.9	0.012
AD-887095.1	76.2	0.055
AD-887096.1	21.5	0.028
AD-887097.1	35.2	0.020
AD-887098.1	32.3	0.034
AD-887099.1	29.6	0.019
AD-887100.1	34.5	0.028
AD-887101.1	26.2	0.026
AD-887102.1	23.8	0.023
AD-887103.1	30.4	0.042
AD-887104.1	24.4	0.031
AD-887105.1	47.5	0.013
AD-887106.1	67.8	0.043
AD-887107.1	24.2	0.018
AD-887108.1	28.8	0.066
AD-887109.1	34.8	0.032
AD-887110.1	85.9	0.092
AD-887111.1	66.2	0.047
AD-887112.1	25.5	0.038
AD-887113.1	18.6	0.017
AD-887114.1	41.1	0.034
AD-887115.1	70.9	0.026
AD-887116.1	70.0	0.121
AD-887117.1	64.6	0.069
AD-887118.1	98.2	0.030
AD-887119.1	21.9	0.023
AD-887120.1	92.2	0.090
AD-887121.1	49.3	0.078
AD-887122.1	28.1	0.028
AD-887123.1	23.7	0.029
AD-887124.1	22.5	0.011
AD-887125.1	21.5	0.032
AD-887126.1	26.8	0.041

AD-887127.1	100.1	0.114
AD-887128.1	72.8	0.042
AD-887129.1	89.7	0.076
AD-887130.1	23.6	0.014
AD-887131.1	24.7	0.051
AD-887132.1	42.6	0.021
AD-887133.1	23.5	0.024
AD-887134.1	22.1	0.021
AD-887135.1	96.4	0.098
AD-887136.1	22.6	0.033
AD-887137.1	22.2	0.023
AD-887138.1	87.8	0.165
AD-887139.1	91.5	0.067
AD-887140.1	91.7	0.091
AD-887141.1	80.0	0.145
AD-887142.1	22.8	0.009
AD-887143.1	33.5	0.043
AD-887144.1	25.3	0.032
AD-887145.1	41.1	0.012
AD-887146.1	41.6	0.048
AD-887147.1	51.7	0.015
AD-887148.1	66.1	0.081
AD-887149.1	16.4	0.038
AD-887150.1	16.3	0.012
AD-887151.1	71.3	0.108
AD-887152.1	72.7	0.101
AD-887153.1	25.2	0.016
AD-887154.1	83.2	0.105
AD-887155.1	71.8	0.020
AD-887156.1	72.8	0.031
AD-887157.1	57.2	0.099
AD-887158.1	19.6	0.014
AD-887159.1	52.2	0.043
AD-887160.1	67.9	0.024

AD-887161.1	20.9	0.025
AD-887162.1	16.3	0.037
AD-887163.1	21.6	0.004
AD-887164.1	68.1	0.061
AD-887165.1	75.1	0.106
AD-887166.1	14.5	0.009
AD-887167.1	70.5	0.064
AD-887168.1	21.5	0.054
AD-887169.1	13.5	0.032
AD-887170.1	39.5	0.031
AD-887171.1	14.8	0.039
AD-887172.1	13.3	0.022
AD-887173.1	19.8	0.031
AD-887174.1	15.6	0.024
AD-887175.1	45.0	0.068
AD-887176.1	57.3	0.048
AD-887177.1	14.6	0.020
AD-887178.1	20.1	0.012
AD-887179.1	25.4	0.032
AD-887180.1	16.8	0.006
AD-887181.1	61.9	0.034
AD-887182.1	86.6	0.037
AD-887183.1	15.2	0.011
AD-887184.1	16.1	0.021
AD-887185.1	25.9	0.017
AD-887186.1	21.6	0.013
AD-887187.1	19.7	0.019
AD-887188.1	14.6	0.013
AD-887189.1	83.3	0.054
AD-887190.1	78.1	0.092
AD-887191.1	34.9	0.013
AD-887192.1	34.4	0.026
AD-887193.1	37.3	0.047
AD-887194.1	79.7	0.072

AD-887195.1	69.3	0.049
AD-887196.1	40.4	0.029
AD-887197.1	34.8	0.029
AD-887198.1	57.2	0.049
AD-887199.1	73.7	0.075
AD-887200.1	58.6	0.066
AD-887201.1	91.6	0.175
AD-887202.1	44.0	0.053
AD-887203.1	81.7	0.053
AD-887204.1	94.5	0.085
AD-887205.1	33.0	0.007
AD-887206.1	103.4	0.143
AD-887207.1	79.4	0.074
AD-887208.1	42.5	0.059
AD-887209.1	25.9	0.051
AD-887210.1	30.2	0.013
AD-887211.1	33.8	0.033
AD-887212.1	35.9	0.065
AD-887213.1	28.1	0.019
AD-887214.1	46.9	0.035
AD-887215.1	24.7	0.030
AD-887216.1	64.4	0.116
AD-887217.1	17.3	0.031
AD-887218.1	21.9	0.032
AD-887219.1	90.4	0.133
AD-887220.1	100.8	0.203
AD-887221.1	33.7	0.008
AD-887222.1	23.1	0.022
AD-887223.1	100.5	0.070
AD-887224.1	82.8	0.053
AD-887225.1	85.5	0.096
AD-887226.1	82.9	0.088
AD-887227.1	97.9	0.123
AD-887228.1	85.8	0.034

AD-887229.1	90.9	0.137
AD-887230.1	42.6	0.080
AD-887231.1	29.3	0.056

Пример 3. Скрининг in vitro миРНК MYOC

Экспериментальные методы

Культивирование и трансфекция клеток:

Трансфекция клеток трабекулярной сети человека (HTMC)

Клетки HTMC (ATCC) трансфектировали добавлением 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл RNAiMAX из расчета на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, номер по каталогу 13778-150) к 5 мкл дуплексов миРНК из расчета на лунку, с 4 повторами каждого дуплекса миРНК в 384-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к миРНК-смесь для трансфекции добавляли 40 мкл среды DMEM:F12 (ThermoFisher), содержащей $\sim 5 \times 10^3$ клеток. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты проводили при 50 нМ, 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

Выделение общей РНК с использованием набора для выделения мРНК DYNABEADS:

РНК выделяли с использованием автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с использованием магнитных частиц DYNABEAD (Invitrogen, номер по каталогу 61012). Вкратце, в планшет с клетками добавляли 70 мкл лизирующего/связывающего буфера и 10 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных частиц. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, затем собирали магнитные частицы и удаляли супернатант. Затем связанную с частицами РНК промывали 2 раза 150 мкл буфера для промывания А и один раз буфером для промывания В. Затем частицы промывали 150 мкл элюирующего буфера, повторно собирали и удаляли надосадочную жидкость.

Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК высокой емкости ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, номер по каталогу 4368813):

10 мкл мастер-смеси, содержащей 1 мкл 10× буфера, 0,4 мкл 25× dNTP, 1 мкл 10× произвольных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H₂O в расчете на одну реакцию, добавляли к выделенной выше РНК. Планшеты запечатывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, и затем 2 ч при 37°C.

ПЦР в режиме реального времени:

2 мкл кДНК и 5 мкл мастер-смеси зонда Lightcycler 480 (Roche номер по каталогу 04887301001) добавляли либо к 0,5 мкл зонда для человеческого GAPDH TaqMan (4326317E), либо к 0,5 мкл зонда для человеческого MYOC в расчете на лунку в 384-луночном планшете (кат. Roche № 04887301001). ПЦР в режиме реального времени проводили в системе ПЦР в реальном времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали не менее двух раз, и данные нормализовали к клеткам, трансфектированным

нецелевой контрольной миРНК. Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали к результатам анализов, проведенных с клетками, трансфектированными нецелевой контрольной миРНК.

Результаты

Результаты многодозового скрининга в клетках трабекулярной сети человека (НТМС)) с тремя рядами иллюстративных миРНК МҮОС человека приведены в Таблице 7А (соответствуют миРНК в Таблице 3А), Таблице 7В (соответствуют миРНК в Таблице 4А), и 7С (соответствуют миРНК в Таблице 5А). Эксперименты с несколькими дозами проводили при конечных концентрациях дуплекса 50 нМ, 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ, и данные выражали в виде оставшейся мРНК в процентах относительно нецелевого контроля. Из типичных дуплексов миРНК, оцененных в Таблице 7А ниже, 13 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 90\%$, 95 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 60\%$ и 126 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 20\%$ в клетках НТМС при введении в концентрация 10 нМ. Из типичных дуплексов миРНК, приведенных в Таблице 7В ниже, 15 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 70\%$, 39 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 50\%$ и 84 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 20\%$ в клетках НТМС при введении в концентрация 10 нМ. Из типичных дуплексов миРНК, приведенных в Таблице 7С ниже, 8 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 70\%$, 29 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 50\%$ и 66 обеспечивали нокдаун МҮОС на уровне $\geq 20\%$ в клетках НТМС при введении в концентрации 10 нМ.

Таблица 7А

Эндогенный многодозовый скрининг МҮОС *in vitro* с одним рядом иллюстративных миРНК МҮОС человека

Название дуплекса	50 нМ	STDE V	10 нМ	STDE V	1 нМ	STDE V	0,1 нМ	STDE V
AD-954362.1	11.5	1.9	13.0	3.6	21.6	6.9	73.0	44.8
AD-954363.1	25.7	3.9	16.6	8.0	43.4	17.6	43.5	14.2
AD-954410.1	15.3	5.4	6.8	3.0	12.1	5.5	27.6	7.6
AD-954411.1	15.0	6.8	31.6	35.6	25.5	11.0	62.9	25.2
AD-954548.1	8.6	2.2	отсутствует	отсутствует	34.2	12.3	108.2	32.1
AD-954684.1	13.2	1.2	33.6	13.3	79.9	50.0	100.2	37.0
AD-954771.1	17.5	0.8	36.3	3.6	50.1	8.9	95.8	9.1
AD-954772.1	10.5	4.4	31.1	8.6	35.0	12.7	91.8	4.5
AD-954891.1	29.4	3.3	16.4	6.2	46.9	22.5	85.2	17.1
AD-954892.1	17.0	6.2	45.4	11.8	47.9	16.0	88.6	25.2

AD-954912.1	6.1	2.8	56.4	12.0	отсутст вует	отсутст вует	99.9	40.0
AD-954913.1	8.2	2.7	5.9	3.4	21.4	16.5	43.3	5.2
AD-954914.1	19.6	6.1	18.0	6.6	53.0	8.1	111.0	38.5
AD-954915.1	13.8	2.6	15.1	6.5	46.6	16.1	73.8	42.5
AD-954921.1	33.1	15.0	20.9	14.2	84.0	26.3	89.4	23.8
AD-954934.1	40.8	4.3	49.2	16.5	34.5	14.9	100.7	33.3
AD-954937.1	14.6	5.3	44.5	7.7	40.8	29.3	79.8	9.1
AD-954939.1	5.5	1.4	22.8	9.4	12.8	4.4	63.6	12.5
AD-954944.1	24.4	6.0	21.9	5.4	26.2	8.4	68.6	18.1
AD-954951.1	64.1	15.6	46.1	12.6	75.2	18.9	125.7	31.5
AD-954958.1	4.4	1.3	6.7	2.6	31.2	15.2	82.7	30.8
AD-954964.1	90.1	16.4	109.7	38.5	121.5	36.2	133.2	37.4
AD-954965.1	6.3	3.2	6.6	1.6	41.7	19.1	37.2	6.7
AD-954966.1	32.3	14.0	37.1	21.7	90.7	42.4	89.9	29.4
AD-954967.1	87.5	24.0	81.4	19.1	100.1	22.4	84.0	45.4
AD-954968.1	14.1	3.0	30.7	8.1	55.6	18.9	61.4	8.6
AD-954970.1	7.6	4.9	27.0	7.0	22.3	4.8	49.9	13.8
AD-954992.1	16.0	4.5	53.7	26.7	40.3	14.3	93.2	22.6
AD-954993.1	6.6	2.1	24.4	10.7	28.8	5.7	61.0	13.0
AD-955030.1	15.0	2.9	13.6	9.9	22.5	7.1	57.4	31.9
AD-955031.1	13.4	3.4	20.4	14.0	30.5	16.2	82.2	21.6
AD-955032.1	4.4	2.1	16.0	12.0	22.7	4.3	71.6	16.8
AD-955034.1	18.8	7.2	17.2	13.3	отсутст вует	отсутст вует	130.6	35.2
AD-955035.1	10.0	2.1	10.0	6.3	34.3	9.4	83.1	33.4
AD-955037.1	7.7	2.1	13.3	4.4	38.9	5.5	144.9	76.1
AD-955074.1	6.9	5.9	14.6	8.4	20.9	4.6	51.6	13.2
AD-955075.1	48.4	18.4	30.0	8.5	95.6	30.4	57.5	19.9
AD-955082.1	43.5	0.6	27.3	15.3	38.8	18.0	53.0	31.2
AD-955083.1	91.0	25.5	62.6	20.5	152.6	20.1	77.7	21.4
AD-955084.1	5.3	3.1	17.7	9.7	26.0	11.5	73.0	19.6
AD-955085.1	15.2	11.2	43.0	14.8	40.7	13.2	96.0	4.9
AD-955086.1	35.8	26.3	60.5	7.7	46.3	15.3	75.3	30.6

AD-955087.1	47.6	14.6	20.2	1.7	56.5	15.1	67.1	4.3
AD-955097.1	10.3	1.7	10.1	1.8	46.6	8.0	139.1	44.3
AD-955144.1	21.5	8.8	14.0	4.9	48.3	4.0	109.8	28.4
AD-955146.1	6.8	1.6	33.7	10.3	37.8	21.4	82.1	48.6
AD-955148.1	27.3	14.1	47.6	16.6	77.4	42.4	85.1	25.2
AD-955165.1	62.1	16.6	109.0	19.7	90.5	36.0	отсутст вует	отсутст вует
AD-955174.1	18.7	3.6	44.7	11.3	79.9	22.7	135.5	56.6
AD-955175.1	5.2	2.1	8.2	2.8	16.1	8.6	91.9	28.5
AD-955177.1	5.1	2.1	21.3	9.5	32.3	7.5	отсутст вует	отсутст вует
AD-955193.1	19.5	7.4	30.2	11.7	28.9	5.0	93.6	19.7
AD-955194.1	3.9	2.0	8.9	2.6	48.3	25.3	60.0	10.2
AD-955196.1	98.0	17.3	43.0	13.9	89.5	35.5	78.8	25.2
AD-955199.1	50.5	23.1	93.6	18.1	80.0	43.3	93.5	14.4
AD-955200.1	9.9	5.1	13.8	7.4	46.8	1.8	62.8	6.5
AD-955255.1	11.9	4.7	33.2	16.3	63.4	23.1	59.1	22.6
AD-955266.1	4.9	2.0	6.3	0.8	12.2	1.7	34.1	9.2
AD-955269.1	11.6	5.4	27.6	20.6	14.0	3.7	67.9	26.9
AD-955270.1	отсут ствует	отсутс твует	23.4	8.5	21.1	4.9	44.4	15.1
AD-955271.1	68.7	11.2	63.0	12.0	56.9	13.2	73.8	29.5
AD-955272.1	12.7	9.4	21.9	12.0	35.0	9.7	62.7	14.2
AD-955281.1	7.7	3.6	38.4	17.8	34.7	10.6	71.7	12.7
AD-955282.1	5.9	2.3	13.6	4.5	30.6	22.7	60.4	13.2
AD-955283.1	18.0	9.2	12.5	1.4	46.1	14.1	93.9	15.6
AD-955292.1	74.8	20.6	48.2	31.9	74.5	20.7	110.6	32.3
AD-955293.1	4.2	1.5	20.0	13.3	31.6	11.3	97.7	34.2
AD-955308.1	59.5	15.4	88.1	33.2	82.0	25.2	89.8	26.8
AD-955309.1	7.8	1.2	28.1	11.4	40.4	11.6	72.7	39.4
AD-955310.1	44.7	6.4	50.4	12.9	61.9	37.4	80.4	15.7
AD-955343.1	6.5	2.4	7.4	2.9	45.2	13.7	73.8	8.2
AD-955344.1	16.8	7.2	36.4	27.6	60.7	14.6	62.0	15.9

AD-955345.1	12.1	3.4	47.8	15.1	70.1	46.7	83.7	16.4
AD-955346.1	17.8	5.8	15.2	2.7	28.6	4.1	89.1	35.7
AD-955385.1	35.6	15.0	29.9	15.4	35.7	25.2	65.8	27.7
AD-955386.1	7.4	2.6	13.2	3.1	68.9	39.2	123.3	39.3
AD-955387.1	123.3	44.5	104.3	42.5	73.1	33.0	100.2	28.7
AD-955415.1	11.9	4.7	11.9	6.2	19.1	4.9	61.4	21.9
AD-955427.1	12.0	4.8	9.1	4.1	26.1	9.8	116.9	32.5
AD-955504.1	12.7	5.0	12.8	6.2	35.6	19.7	123.4	50.1
AD-955570.1	5.4	2.7	11.1	4.1	отсутст вует	отсутст вует	39.4	8.2
AD-955571.1	6.1	3.3	отсутс твует	отсутс твует	10.6	7.3	48.1	6.5
AD-955572.1	7.4	2.2	9.6	3.9	17.9	4.7	37.1	8.5
AD-955586.1	56.4	14.3	33.0	8.6	59.0	12.2	114.2	19.0
AD-955612.1	96.5	28.6	62.7	17.7	59.7	32.0	88.3	43.2
AD-955615.1	9.4	2.7	18.3	8.0	48.9	54.5	72.9	30.6
AD-955617.1	35.8	10.7	53.3	25.3	75.5	10.5	86.4	18.4
AD-955620.1	116.1	31.9	77.3	16.9	60.4	14.1	138.2	53.3
AD-955621.1	15.0	4.0	11.9	4.1	24.1	7.8	0.0	отсутст вует
AD-955641.1	5.4	3.1	24.6	5.8	60.2	49.7	51.7	23.4
AD-955642.1	20.4	5.9	26.5	6.7	30.2	11.0	95.4	16.3
AD-955644.1	5.0	3.9	9.3	4.0	19.2	8.7	55.0	17.0
AD-955664.1	14.4	7.0	10.6	2.1	49.7	25.6	67.0	20.2
AD-955668.1	10.4	5.9	8.4	3.1	15.5	9.8	27.2	6.2
AD-955669.1	14.1	22.2	11.0	4.3	10.9	1.1	24.6	4.5
AD-955682.1	79.1	41.0	63.8	20.8	69.0	10.6	57.4	34.1
AD-955702.1	17.6	2.5	27.1	7.8	12.2	4.5	31.9	14.5
AD-955703.1	11.1	2.6	12.2	6.3	47.2	17.7	126.1	19.2
AD-955851.1	3.9	1.3	20.6	11.1	17.2	1.6	35.0	12.3
AD-955886.1	36.4	16.2	32.2	5.9	28.7	11.0	35.1	8.9
AD-955887.1	41.3	10.9	46.6	22.5	33.0	13.1	60.8	17.8
AD-955888.1	26.6	8.4	80.7	24.3	43.3	15.5	69.5	17.5
AD-955889.1	23.3	13.5	46.3	2.2	67.4	31.0	46.3	8.9

AD-955891.1	18.3	5.2	41.2	9.2	30.3	8.4	38.4	7.8
AD-955892.1	41.1	7.1	29.4	13.4	72.4	29.1	64.6	6.2
AD-955899.1	19.7	2.7	61.4	23.1	25.9	4.9	66.8	37.8
AD-955900.1	отсут ствие т	отсутс твует	27.4	16.2	44.6	16.5	53.9	6.3
AD-955901.1	отсут ствие т	отсутс твует	19.1	7.3	23.3	3.8	55.6	16.0
AD-955908.1	21.0	7.4	57.9	15.8	26.5	6.8	26.9	8.9
AD-955917.1	22.9	5.7	22.2	5.9	24.4	5.6	30.9	7.9
AD-955918.1	23.6	1.9	30.1	9.4	27.5	16.4	52.6	13.1
AD-955919.1	23.4	3.3	21.2	1.1	21.1	11.1	31.2	7.9
AD-955920.1	25.7	10.6	32.6	14.5	22.5	10.8	32.8	25.7
AD-955921.1	20.5	3.6	36.1	11.9	21.4	3.0	36.7	12.4
AD-955922.1	21.4	6.8	47.9	9.8	25.4	3.6	34.6	5.7
AD-955923.1	25.5	10.6	28.7	6.4	19.7	7.4	30.5	7.4
AD-955924.1	38.9	9.4	28.6	14.0	19.0	3.6	59.9	6.9
AD-955927.1	29.3	7.0	26.4	6.2	24.1	10.9	55.3	16.4
AD-955962.1	19.8	3.5	44.1	4.8	35.8	6.5	82.5	28.3
AD-955963.1	23.6	9.6	26.0	6.4	45.1	4.5	34.6	5.8
AD-955969.1	27.4	9.3	39.3	10.8	22.0	5.5	21.0	3.5
AD-955970.1	24.2	7.7	35.9	18.3	29.7	8.9	24.8	7.3
AD-955971.1	отсут ствие т	отсутс твует	40.7	8.5	34.5	5.5	41.9	2.9
AD-955979.1	28.4	11.3	32.3	15.7	32.4	7.8	103.2	19.0
AD-955980.1	24.2	11.2	33.0	3.3	отсутс твует	отсутс твует	28.2	5.5
AD-956010.1	18.4	11.7	36.4	11.3	26.8	12.3	29.2	11.3
AD-956011.1	16.5	3.0	19.6	2.2	20.9	10.7	63.4	15.5
AD-956021.1	21.0	2.7	34.1	19.4	39.4	14.1	94.3	38.3
AD-956022.1	27.1	6.2	42.8	7.7	46.0	6.3	61.0	12.2
AD-956063.1	37.2	23.3	22.9	7.5	19.7	10.5	32.6	5.5

AD-956079.1	27.1	9.9	38.2	14.6	30.8	4.7	80.2	19.1
AD-956087.1	28.4	10.6	64.8	26.0	65.3	53.8	102.9	34.8
AD-956092.1	23.6	2.9	16.8	2.5	26.9	7.5	37.7	15.3
AD-956096.1	20.3	4.5	25.2	16.4	33.9	1.7	34.7	7.4
AD-956099.1	27.4	1.1	51.5	8.7	27.1	5.1	55.4	18.0

Таблица 7В

Эндогенный многодозовый скрининг MYOC in vitro с одним рядом иллюстративных миРНК MYOC человека

Название дуплекса	50 нМ	STD EV	10 нМ	STD EV	1 нМ	STDEV	0,1 нМ	STD EV
AD-956571.1	187.3	27.1	135.0	32.3	148.6	36.9	117.4	63.9
AD-956690.1	59.3	23.1	71.4	28.5	87.1	26.5	76.6	19.0
AD-956709.1	65.7	37.2	66.6	11.2	141.9	49.6	89.7	25.3
AD-956710.1	13.2	3.0	26.8	11.5	52.5	5.7	87.9	27.3
AD-956732.1	42.3	9.4	57.6	23.7	124.6	33.6	86.9	16.2
AD-956741.1	150.0	63.6	151.0	40.6	178.4	42.4	105.1	7.8
AD-956744.1	77.3	33.6	73.4	20.0	151.8	92.5	66.9	25.0
AD-956745.1	76.5	8.2	95.3	32.3	82.8	7.4	78.3	34.6
AD-956746.1	74.1	26.9	95.8	25.0	117.7	22.8	125.7	53.8
AD-956747.1	39.8	3.4	19.5	8.0	67.4	14.8	113.3	22.2
AD-956748.1	138.3	73.1	117.3	30.2	129.2	14.0	82.3	38.6
AD-956749.1	153.7	73.4	104.8	20.3	138.3	34.5	95.9	36.9
AD-956760.1	15.6	5.4	20.6	7.3	50.2	8.6	61.1	5.5
AD-956761.1	61.3	9.5	101.8	38.3	73.6	16.8	47.5	12.0
AD-956762.1	59.9	13.3	61.6	25.4	154.3	17.9	93.0	24.4
AD-956763.1	33.5	14.4	29.1	5.3	78.1	20.3	103.8	24.9
AD-956764.1	47.1	19.2	27.3	7.7	137.0	30.6	97.1	22.2
AD-956765.1	76.9	22.9	154.4	18.8	134.2	51.7	51.8	42.2
AD-956766.1	97.0	39.2	130.1	32.3	145.7	38.6	65.9	48.1
AD-956769.1	20.0	10.7	32.4	13.4	110.3	28.2	71.8	50.3
AD-956827.1	77.9	16.5	143.9	31.8	130.6	34.7	82.7	22.8
AD-956828.1	86.5	25.8	135.7	45.3	132.5	28.6	147.1	28.5
AD-956831.1	57.8	28.4	27.9	8.6	71.9	13.7	132.5	51.8
AD-956872.1	41.8	13.3	84.2	16.4	82.3	19.3	120.1	34.2

AD-956873.1	56.9	16.7	99.8	26.7	107.5	30.0	58.5	24.0
AD-956874.1	10.7	2.5	25.7	5.7	69.7	3.1	76.8	60.3
AD-956877.1	101.5	58.1	130.3	69.5	172.4	45.3	97.6	11.0
AD-956880.1	30.0	8.8	48.6	15.5	72.1	24.9	106.0	44.0
AD-956881.1	64.9	12.6	102.1	28.7	125.7	27.7	49.6	11.6
AD-956887.1	69.2	26.0	114.1	46.0	159.3	48.1	149.5	59.6
AD-956947.1	165.2	85.3	96.4	29.8	124.3	44.7	95.8	38.3
AD-956949.1	17.9	4.0	48.7	20.8	131.6	15.6	100.6	11.2
AD-956958.1	68.2	31.1	148.6	45.9	130.1	22.6	99.9	53.5
AD-956967.1	85.3	12.1	95.6	45.8	113.3	34.9	36.5	17.9
AD-956968.1	102.9	58.4	124.5	75.9	155.6	67.4	54.5	9.6
AD-956992.1	37.8	28.5	85.9	32.5	111.8	19.5	88.3	22.8
AD-956998.1	155.6	52.0	119.7	56.1	196.7	45.4	149.4	48.3
AD-956999.1	88.8	23.5	54.3	17.8	62.6	13.5	66.8	49.8
AD-957000.1	12.8	5.3	44.4	16.8	53.0	18.1	73.1	6.9
AD-957063.1	51.2	20.3	51.6	26.7	128.5	48.8	62.3	15.0
AD-957064.1	22.5	21.3	37.1	21.9	87.3	47.1	149.0	57.8
AD-957065.1	28.5	9.2	31.1	19.1	68.3	34.4	120.1	65.6
AD-957068.1	26.0	11.2	40.1	18.6	89.4	15.9	38.5	8.8
AD-957069.1	34.2	23.8	81.6	16.4	67.0	21.7	95.5	23.7
AD-957070.1	68.8	43.2	113.0	43.6	174.7	57.6	95.4	13.1
AD-957071.1	31.2	3.1	27.5	17.6	69.1	21.9	27.3	18.7
AD-957073.1	55.6	3.3	58.5	18.5	114.4	35.3	61.7	33.5
AD-957079.1	88.8	25.5	92.8	27.2	98.6	35.6	104.4	40.5
AD-957081.1	66.6	28.7	41.2	25.7	85.1	40.1	38.6	35.4
AD-957083.1	110.7	22.9	113.2	33.0	161.2	37.1	96.6	21.3
AD-957141.1	202.7	25.2	163.2	72.3	168.8	93.0	69.7	9.0
AD-957142.1	152.6	27.0	198.4	48.8	185.4	26.2	70.6	20.1
AD-957144.1	111.7	27.4	121.7	35.8	165.8	30.1	102.8	15.9
AD-957368.1	7.6	4.0	12.6	6.4	30.2	13.7	94.3	60.5
AD-957369.1	20.6	4.8	36.6	18.3	79.3	14.3	119.7	30.3
AD-957370.1	37.4	9.2	58.9	16.1	106.1	40.5	95.4	13.6
AD-957371.1	26.9	15.7	43.0	16.5	57.9	14.7	83.8	28.4
AD-957439.1	62.1	7.5	68.3	8.8	93.9	12.8	67.7	33.0

AD-957440.1	43.1	17.2	40.4	8.8	65.6	27.0	79.3	29.4
AD-957443.1	8.3	3.3	9.5	3.4	37.6	15.0	16.9	11.3
AD-957465.1	208.7	43.8	177.3	53.6	137.0	29.1	106.3	25.6
AD-957479.1	15.9	4.5	12.7	9.2	40.9	17.3	55.8	16.0
AD-957480.1	53.1	17.3	58.0	17.2	79.3	26.0	82.6	22.7
AD-957481.1	53.4	17.5	82.2	28.0	86.1	15.6	42.0	27.1
AD-957482.1	81.4	22.5	143.3	17.6	123.3	21.5	86.3	19.3
AD-957487.1	85.5	32.4	49.2	7.9	114.7	26.2	145.7	59.1
AD-957488.1	78.3	27.8	42.5	9.8	98.6	20.6	113.6	19.1
AD-957489.1	79.4	26.0	55.6	15.4	77.1	25.2	30.6	13.6
AD-957490.1	143.4	23.8	154.2	21.3	189.5	54.4	154.2	54.5
AD-957500.1	129.9	43.0	199.7	72.2	147.2	51.8	89.1	32.7
AD-957506.1	14.1	5.3	46.5	22.7	95.2	23.2	117.8	14.3
AD-957508.1	47.3	22.5	60.8	25.2	110.1	26.0	93.4	5.0
AD-957650.1	34.9	17.2	51.7	16.2	86.4	24.0	98.6	19.5
AD-957685.1	180.4	87.9	159.7	65.1	132.2	47.0	134.4	26.5
AD-957686.1	55.4	1.4	85.6	45.3	102.8	18.7	139.5	63.5
AD-957687.1	62.4	16.8	46.3	23.3	113.3	32.1	114.8	43.6
AD-957688.1	79.7	14.7	126.0	34.7	115.3	21.0	84.7	16.3
AD-957690.1	22.8	4.9	54.4	21.1	67.7	34.4	91.7	11.3
AD-957691.1	174.6	30.6	167.1	56.6	118.6	34.7	34.9	14.4
AD-957694.1	68.2	75.4	64.5	38.8	89.7	31.7	82.5	23.2
AD-957695.1	58.0	28.1	113.0	46.7	159.8	15.8	107.7	26.2
AD-957696.1	45.3	9.9	79.2	10.9	92.2	11.2	99.7	33.5
AD-957698.1	51.1	11.2	24.3	9.6	60.6	25.8	100.8	41.6
AD-957699.1	83.3	19.9	123.4	28.7	88.6	29.4	28.1	16.3
AD-957706.1	60.1	33.5	45.6	28.3	73.5	26.3	38.1	44.2
AD-957707.1	36.7	14.8	62.8	4.0	83.5	42.5	50.2	13.8
AD-957708.1	26.1	1.7	51.0	31.7	72.9	11.7	86.4	13.2
AD-957710.1	62.5	23.6	58.3	17.0	49.6	8.3	34.7	29.4
AD-957711.1	19.3	6.9	62.8	14.5	67.1	18.1	80.2	24.9
AD-957716.1	35.2	8.1	77.8	49.1	152.6	43.9	119.4	33.5
AD-957717.1	27.8	16.4	58.2	18.0	104.0	50.6	134.8	29.6
AD-957718.1	8.3	3.4	28.2	10.8	39.0	15.0	60.0	14.0

AD-957719.1	21.3	9.7	76.4	12.5	82.3	33.9	87.7	14.2
AD-957720.1	24.0	4.8	63.9	18.5	77.4	27.4	59.7	18.6
AD-957721.1	21.8	8.9	71.8	18.2	76.9	17.3	82.3	16.8
AD-957722.1	50.8	43.4	52.2	29.3	105.7	36.8	108.8	34.3
AD-957723.1	44.1	26.0	73.5	20.8	104.2	55.1	105.1	16.7
AD-957725.1	24.9	4.4	36.8	8.1	96.5	49.2	120.4	22.5
AD-957748.1	31.3	4.6	33.4	14.2	69.2	27.0	25.7	11.2
AD-957753.1	26.6	10.3	104.4	36.9	55.4	20.4	73.8	27.6
AD-957754.1	43.4	20.9	44.0	12.2	147.7	42.2	80.4	7.2
AD-957756.1	54.3	34.6	51.6	15.0	83.6	13.1	85.0	23.9
AD-957761.1	28.1	6.2	27.4	8.0	43.3	14.0	71.9	24.8
AD-957762.1	79.8	25.1	74.0	53.0	57.3	17.1	44.2	20.4
AD-957764.1	25.7	11.1	22.6	4.7	46.9	5.7	60.4	10.9
AD-957765.1	24.3	6.3	67.5	37.0	70.3	31.8	99.1	16.5
AD-957766.1	23.5	6.3	54.4	7.4	46.9	10.9	64.6	11.9
AD-957767.1	39.9	10.1	40.1	12.9	119.4	24.3	97.0	8.8
AD-957768.1	35.4	13.0	73.2	26.4	34.0	3.0	122.1	11.7
AD-957769.1	26.7	20.6	50.0	9.1	83.8	19.9	99.4	27.4
AD-957770.1	56.5	27.7	82.4	37.1	отсутствует	отсутствует	116.8	29.8
AD-957771.1	94.7	27.9	99.4	15.2	107.0	9.0	113.6	62.6
AD-957772.1	26.6	8.9	53.4	18.7	98.3	15.8	76.9	49.9
AD-957773.1	24.5	13.0	67.1	26.3	52.6	14.4	91.7	38.4
AD-957774.1	92.9	25.8	96.1	53.1	113.0	34.9	138.7	49.3
AD-957775.1	36.1	15.0	65.0	8.2	53.8	10.0	100.1	22.0
AD-957776.1	70.3	19.0	85.3	24.2	64.5	25.8	79.9	42.1
AD-957777.1	91.3	33.0	74.5	10.2	50.5	19.1	80.7	16.8
AD-957808.1	55.7	21.3	83.6	35.2	79.7	57.6	92.8	21.4
AD-957809.1	30.7	26.7	91.6	25.1	103.3	35.0	168.9	21.7
AD-957810.1	30.1	4.3	77.4	25.5	141.2	27.7	132.4	24.4
AD-957811.1	22.2	3.3	63.7	2.7	98.6	35.2	109.4	37.2
AD-957819.1	38.8	14.7	120.7	21.9	113.3	24.2	81.4	31.1
AD-957820.1	52.2	23.5	65.3	49.1	92.5	42.3	110.4	15.4
AD-957821.1	24.3	3.5	42.3	13.8	65.1	8.7	72.0	7.1

AD-957862.1	53.3	12.7	92.2	35.6	43.7	15.9	70.2	24.6
AD-957883.1	35.1	3.1	69.0	22.5	91.7	23.0	88.6	12.2
AD-957887.1	20.4	4.1	60.2	21.8	97.1	48.8	110.4	24.3
AD-957889.1	36.7	15.9	66.9	36.8	52.8	24.6	86.5	14.0
AD-957890.1	30.3	13.5	60.5	15.0	103.2	27.6	92.8	23.3
AD-957894.1	72.4	29.5	70.2	26.1	62.0	37.6	91.5	37.3
AD-957895.1	28.6	2.9	48.5	15.5	70.7	16.3	79.8	19.0
AD-957897.1	26.8	8.0	42.0	17.7	78.0	12.8	71.0	28.1
AD-957898.1	54.3	10.8	105.6	60.0	63.8	22.2	77.7	31.6

Таблица 7С

Эндогенный многодозовый скрининг MYOC in vitro с одним рядом иллюстративных миРНК MYOC человека

Название дуплекса	50 нМ	STDE V	10 нМ	STDE V	1 нМ	STDE V	0,1 нМ	STDE V
AD-957960.1	39.74	10.67	47.81	10.35	95.21	25.82	113.49	43.37
AD-957961.1	92.59	22.93	109.23	35.30	171.11	90.04	117.61	36.07
AD-958008.1	21.23	12.27	42.69	11.36	67.22	11.77	101.62	18.48
AD-958009.1	24.28	15.78	63.05	42.09	72.96	36.89	134.46	21.04
AD-958145.1	55.02	13.88	71.52	18.23	70.22	25.72	162.68	40.57
AD-958368.1	92.55	7.32	141.25	52.40	135.84	65.32	125.44	40.35
AD-958369.1	53.49	11.87	91.66	15.25	125.43	56.07	121.87	15.99
AD-958488.1	62.72	15.90	77.83	44.95	104.61	19.79	96.47	42.54
AD-958489.1	175.65	78.50	116.17	49.03	113.48	32.80	128.13	40.57
AD-958509.1	75.96	24.71	44.52	20.72	113.16	37.35	96.90	46.44
AD-958510.1	92.42	17.23	122.36	73.62	131.05	50.81	118.37	28.08
AD-958511.1	117.40	43.28	81.63	30.38	83.47	29.94	99.53	21.47
AD-958512.1	109.97	43.90	85.97	35.41	74.55	22.02	156.40	51.63
AD-958518.1	110.19	64.25	102.56	37.85	80.13	32.06	100.48	26.38
AD-958532.1	120.16	49.12	61.59	16.45	76.03	32.02	102.46	22.31
AD-958539.1	164.44	22.51	121.87	44.66	109.01	25.98	110.97	16.17
AD-958548.1	100.43	31.53	146.74	41.68	122.19	27.32	105.22	32.57
AD-958555.1	108.40	13.45	135.09	23.34	71.24	14.50	118.60	48.96
AD-958561.1	114.82	18.95	77.34	8.20	107.55	31.69	71.54	28.22
AD-958563.1	108.44	26.42	113.06	23.27	172.35	58.28	92.33	20.25

AD-958564.1	123.82	27.68	102.59	33.45	164.60	30.95	170.11	41.15
AD-958565.1	106.79	24.06	99.04	15.20	128.37	26.17	150.80	19.24
AD-958566.1	21.44	5.64	72.84	35.87	96.12	30.26	133.83	38.28
AD-958568.1	20.38	2.39	26.83	12.98	45.88	23.23	отсутст вует	отсут ствуе т
AD-958628.1	25.85	8.86	57.88	46.88	отсутст вует	отсутс твует	111.03	13.08
AD-958629.1	28.11	16.12	78.84	17.25	110.93	53.17	118.05	32.05
AD-958630.1	35.40	12.17	78.44	20.80	160.16	47.09	171.52	19.96
AD-958632.1	27.47	11.44	33.39	14.38	75.93	25.72	98.96	12.39
AD-958633.1	153.68	30.11	87.19	11.74	93.00	33.17	126.18	49.36
AD-958635.1	97.78	58.58	99.40	41.86	отсутст вует	отсутс твует	128.17	26.96
AD-958671.1	18.75	4.87	20.88	8.34	54.18	25.47	87.76	22.06
AD-958672.1	30.11	22.25	29.16	13.38	95.12	28.64	67.65	42.43
AD-958680.1	62.32	17.81	62.79	12.72	100.85	14.06	113.17	37.91
AD-958681.1	109.77	21.92	отсутст вует	отсутс твует	187.33	89.10	отсутст вует	отсут ствуе т
AD-958682.1	69.82	11.87	133.92	44.11	175.36	70.63	144.12	69.30
AD-958683.1	95.93	34.03	150.63	37.31	172.75	64.92	102.35	28.28
AD-958684.1	64.01	29.72	54.09	9.33	110.13	29.77	149.44	39.41
AD-958685.1	70.54	32.15	132.38	37.46	84.45	24.88	96.75	26.06
AD-958695.1	84.42	36.18	97.12	32.11	61.62	12.77	105.58	6.70
AD-958742.1	176.38	47.57	159.44	27.09	88.07	32.75	112.34	31.07
AD-958757.1	59.19	26.61	117.65	31.99	124.14	41.68	113.14	24.19
AD-958767.1	114.91	52.45	182.69	46.49	101.86	22.89	154.34	42.70
AD-958768.1	60.21	11.95	53.14	19.38	116.72	18.73	128.84	7.84
AD-958770.1	68.45	22.27	112.00	48.55	81.96	19.53	122.72	19.77
AD-958786.1	153.59	40.37	отсутст вует	отсутс твует	100.58	26.74	отсутст вует	отсут ствуе т
AD-958787.1	64.47	17.17	44.85	2.84	82.76	33.16	147.73	40.56

AD-958789.1	91.93	66.06	103.00	45.27	112.51	57.38	114.28	34.86
AD-958797.1	110.94	37.72	90.72	14.45	157.07	36.85	112.57	35.82
AD-958798.1	92.65	40.56	165.09	32.64	209.47	77.42	133.79	45.64
AD-958864.1	21.10	4.35	49.06	20.36	72.72	27.07	74.04	19.80
AD-958867.1	89.10	37.89	29.90	6.84	59.76	25.56	108.56	30.59
AD-958868.1	32.62	10.79	30.56	4.51	96.18	18.29	40.38	6.28
AD-958869.1	26.76	6.16	44.86	10.42	121.21	39.64	60.89	12.57
AD-958870.1	26.33	12.07	16.65	7.97	88.85	26.28	95.14	48.08
AD-958879.1	63.83	4.19	53.47	22.96	отсутст вует	отсутс твует	141.39	37.66
AD-958880.1	89.45	12.29	139.87	8.79	144.59	58.02	122.26	31.15
AD-958881.1	29.00	8.78	71.29	20.05	148.34	61.91	122.65	42.94
AD-958890.1	100.99	34.10	95.15	20.90	69.56	33.38	88.12	11.29
AD-958891.1	99.25	8.10	отсутст вует	отсутс твует	82.04	39.57	отсутст вует	отсут ствие т
AD-958938.1	90.75	31.60	65.05	20.06	56.72	21.26	95.24	35.67
AD-958942.1	90.60	36.96	91.58	27.03	112.20	55.98	125.28	34.94
AD-958943.1	80.71	21.23	119.05	33.55	116.77	41.35	121.80	30.14
AD-958944.1	42.01	21.43	85.57	26.15	91.00	31.50	113.39	19.41
AD-958983.1	149.12	29.19	171.07	80.97	59.88	8.72	147.38	42.92
AD-958984.1	85.62	10.54	62.95	8.69	108.22	52.36	134.12	60.27
AD-958985.1	126.15	28.49	124.91	26.67	108.39	35.48	106.14	25.54
AD-959013.1	87.77	18.86	126.09	отсутс твует	129.55	35.23	105.33	11.64
AD-959025.1	101.25	33.41	71.27	5.24	88.15	9.86	127.16	48.90
AD-959102.1	79.84	20.78	73.00	17.04	137.15	36.40	105.86	41.81
AD-959167.1	15.57	4.16	34.20	9.33	41.38	10.33	94.66	22.25
AD-959168.1	38.02	32.23	20.12	25.03	68.47	33.46	111.47	10.76
AD-959169.1	62.06	20.35	60.92	27.86	118.26	33.39	126.35	44.52
AD-959183.1	76.78	19.33	81.99	12.02	75.83	38.34	115.03	36.34
AD-959210.1	48.56	16.42	183.44	54.08	130.41	24.54	111.99	23.48
AD-959211.1	89.38	25.24	103.61	41.19	57.72	5.99	125.66	21.70
AD-959216.1	56.01	8.86	101.32	27.54	77.75	24.58	97.10	12.61

AD-959217.1	106.67	25.12	81.58	32.03	78.81	14.04	122.46	16.80
AD-959239.1	60.72	12.76	109.28	38.96	68.95	25.93	129.20	34.41
AD-959240.1	87.66	27.53	122.33	18.29	130.69	20.16	97.05	28.88
AD-959242.1	50.84	36.78	28.44	13.18	83.49	26.35	отсутст вует	отсут ствует
AD-959262.1	100.01	21.64	111.29	35.95	66.84	34.78	102.46	16.82
AD-959280.1	137.56	70.24	71.28	19.35	84.13	13.02	139.79	49.62
AD-959300.1	72.61	34.42	92.30	отсутс твует	69.59	9.46	99.50	29.67
AD-959301.1	43.32	16.46	42.94	14.04	87.26	21.72	124.29	38.14
AD-959449.1	отсутст вует	отсутс твует	35.63	4.87	90.79	34.60	101.89	56.45
AD-959484.1	121.31	12.95	152.70	28.12	131.34	59.37	81.74	30.01
AD-959485.1	41.70	8.50	68.38	35.90	105.03	36.35	67.93	26.54
AD-959486.1	45.69	0.45	24.95	8.00	111.38	24.30	92.20	13.26
AD-959487.1	48.60	14.68	78.78	7.90	119.56	42.56	102.84	33.95
AD-959489.1	41.36	12.63	32.69	9.69	52.23	18.83	70.21	20.41
AD-959490.1	69.96	3.67	168.98	63.75	66.36	25.75	111.16	47.10
AD-959497.1	48.18	20.79	43.80	17.34	62.18	21.89	67.80	12.96
AD-959498.1	55.95	15.91	54.81	16.76	71.94	30.83	92.27	51.64
AD-959499.1	45.74	3.95	39.08	11.83	53.19	7.48	72.99	31.12
AD-959506.1	47.20	15.04	46.65	25.20	50.00	10.01	86.77	39.75
AD-959515.1	59.68	20.80	115.57	17.52	44.18	10.47	86.21	34.66
AD-959516.1	53.68	10.82	96.50	20.81	71.59	45.59	80.56	22.23
AD-959517.1	38.17	13.45	55.79	9.50	71.67	34.72	84.13	35.23
AD-959518.1	40.91	9.40	47.90	11.93	59.51	19.68	58.97	15.60
AD-959519.1	48.61	13.25	52.32	20.09	отсутст вует	отсутс твует	39.43	11.24
AD-959520.1	31.99	7.68	55.79	41.30	45.20	21.52	43.73	11.89
AD-959521.1	21.97	4.34	50.65	10.22	72.56	30.27	59.37	34.53
AD-959524.1	41.04	8.29	58.11	24.71	61.84	11.97	72.39	28.32
AD-959560.1	40.47	13.14	35.70	4.75	51.52	21.22	166.63	22.00
AD-959561.1	29.62	5.06	72.66	12.14	83.57	43.35	99.56	11.30

AD-959567.1	53.29	16.56	60.33	2.07	85.97	32.80	120.29	37.10
AD-959568.1	53.60	7.46	75.89	42.79	98.98	19.83	60.18	6.54
AD-959571.1	76.64	32.58	54.46	1.08	95.94	26.30	80.69	38.95
AD-959572.1	57.48	20.02	67.95	21.26	170.23	25.99	134.77	61.19
AD-959607.1	58.64	15.31	38.25	16.16	87.18	15.57	44.32	26.73
AD-959608.1	30.55	13.99	58.66	26.42	49.19	13.42	56.83	24.05
AD-959619.1	56.00	4.63	80.86	27.34	85.04	34.66	105.24	25.17
AD-959620.1	139.75	58.34	78.24	37.92	101.79	10.72	105.39	23.82
AD-959661.1	57.89	27.39	30.89	8.64	54.82	23.78	52.18	28.15
AD-959682.1	51.99	20.28	49.30	5.41	93.21	20.22	81.36	29.14
AD-959689.1	94.33	19.35	61.16	28.03	94.96	46.45	93.67	31.84
AD-959693.1	53.89	14.70	68.85	37.73	74.15	19.80	139.05	10.21
AD-959696.1	50.52	5.92	36.70	15.69	53.06	13.75	61.30	21.89

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии миоцилина (MYOC), где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из одной из антисмысловых последовательностей, представленных в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность, содержащую, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов с 0, 1, 2 или 3 несовпадениями, из смысловой последовательности, представленной в любой из Таблиц 2А, 2В, 3А, 3В, 4А, 4В, 5А и 5В, которая соответствует антисмысловой последовательности.

2. дцРНК-агент по п.1, где, по меньшей мере, одна из смысловой цепи и антисмысловой цепи конъюгирована с одной или более липофильными группами.

3. дцРНК-агент по п.2, где липофильная группа конъюгирована через линкер или носитель.

4. дцРНК-агент по пп.2 или 3, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями по меньшей мере в одной цепи.

5. дцРНК-агент по п.4, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями по меньшей мере в одной цепи через линкер или носитель.

6. дцРНК-агент по любому из пп.2-5, где липофильная группа представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

7. дцРНК-агент по п.6, где липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

8. дцРНК-агент по любому из пп.2-7, где липофильная группа конъюгирована через носитель, который замещает один или более нуклеотидов во внутреннем положении(ях) или двухцепочечной области.

9. дцРНК-агент по любому из пп.2-7, где липофильная группа конъюгирована с двухцепочечным иРНК-агентом через линкер, содержащий эфирную, тиоэфирную, карбамидную, карбонатную связь, аминоксвязь, амидную, малеимидтиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

10. Двухцепочечный иРНК-агент по любому из пп.2-8, где липофильная группа конъюгирована с азотистым основанием, группой сахара или межнуклеозидной связью.

11. дцРНК-агент по любому из предшествующих пунктов, где дцРНК-агент содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

12. дцРНК-агент по п.11, где не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

13. дцРНК-агент по п.11, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

14. дцРНК-агент по любому из пп.11-13, где, по меньшей мере, один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого нуклеотида дезокситимидина(dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, закрытого нуклеотида, незакрытого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2'-О-(N-метилацетамидо)-модифицированного нуклеотида и их комбинаций.

15. дцРНК-агент по любому из предшествующих пунктов, где, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов.

16. дцРНК-агент по любому из предшествующих пунктов, где длина двухцепочечной области составляет 15-30 пар нуклеотидов.

17. дцРНК-агент по п. 16, где длина двухцепочечной области составляет 17-23 пары нуклеотидов.

18. дцРНК-агент по любому из предшествующих пунктов, где каждая цепь имеет 19-30 нуклеотидов.

19. дцРНК-агент по любому из предшествующих пунктов, где агент содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

20. дцРНК-агент по любому из пп.2-19, дополнительно содержащий нацеливающий лиганд, например, лиганд, нацеливающий на ткань глаза.

21. дцРНК-агент по п.20, где ткань глаза представляет собой ткань трабекулярной сети, цилиарное тело, ткань сетчатки, пигментный эпителий сетчатки (RPE) или ткань сосудистой оболочки глаза, например, сосуд сосудистой оболочки.

22. дцРНК-агент по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи.

23. дцРНК-агент по п.22, где миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

24. Клетка, содержащая дцРНК-агент по любому из пп.1-23.

25. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии MYOC, содержащая дцРНК-агент по любому из пп.1-23.

26. Способ ингибирования экспрессии МҮОС в клетке, включающий:

(а) приведение клетки в контакт с дцРНК-агентом по любому из пп.1-23 или фармацевтической композицией по п.25; и

(б) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для снижения уровней мРНК МҮОС, белка МҮОС или как мРНК, так и белка МҮОС, тем самым ингибируя экспрессию МҮОС в клетке.

27. Способ по п.26, где клетка находится в организме субъекта.

28. Способ по п.27, где субъектом является человек.

29. Способ по п.28, где у субъекта диагностировано заболевание, ассоциированное с МҮОС, например, глаукома (например, первичная открытоугольная глаукома (РОАГ), закрытоугольная глаукома, врожденная глаукома и вторичная глаукома).

30. Способ лечения субъекта, у которого диагностировано заболевание, ассоциированное с МҮОС, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента по любому из пп. 1-23 или фармацевтической композиции по п. 25, тем самым обеспечивая лечение заболевания.

31. Способ по п.30, где заболевание, ассоциированное с МҮОС, представляет собой глаукому.

32. Способ по п.31, где глаукома представляет собой первичную открытоугольную глаукому (РОАГ).

33. Способ по любому из пп.30-32, где лечение включает ослабление по меньшей мере одного признака или симптома заболевания.

34. Способ по любому из пп.30-33, где лечение включает (а) ингибирование или снижение экспрессии или активности МҮОС; (б) снижение уровня неправильно свернутого белка МҮОС; (с) снижение гибели клеток трабекулярной сети; (d) снижение внутриглазного давления; или (е) повышение остроты зрения.

35. Способ по любому из пп.27-34, где дцРНК-агент вводят субъекту интраокулярно, внутривенно или местно.

36. Способ по п.35, где внутриглазное введение включает интравитреальное введение (например, интравитреальную инъекцию), трансклеральное введение (например, трансклеральную инъекцию), субконъюнктивальное введение (например, субконъюнктивальную инъекцию), ретробульбарное введение (например, ретробульбарную инъекцию), внутрикамерное введение (например, внутрикамерную инъекцию) или субретинальное введение (например, субретинальную инъекцию).

37. Способ по любому из пп. 27-36, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного агента или проведение дополнительной терапии, подходящей для лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с МҮОС (например, хирургическая лазерная трабекулопластика, хирургическая трабекулоэктомия, малоинвазивная хирургия глаукомы), размещение дренажной трубки в глазу, препараты для перорального введения или глазные капли).