

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293282** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.05.31

(22) Дата подачи заявки
2012.11.16

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

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СРЕДСТВА РНКи**

(31) **61/561,710**

(32) **2011.11.18**

(33) **US**

(62) **201490993; 2012.11.16**

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

(72) Изобретатель:

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

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

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

202293282

A1

A1

202293282

МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СРЕДСТВА РНКиРодственная заявка

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

Область техники, к которой относится изобретение

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

Уровень техники

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

Молекулы двухцепочечных РНК (дцРНК) с эффективными ген-сайленсинговыми свойствами необходимы для разработки лекарственных средств на основе РНК-интерференции (РНКи). Начальной стадией РНКи является активация РНК-индуцированного сайленсингового комплекса (RISC), для которой требуется

разрушение смысловой цепи дцРНК-дуплекса. Известно, что смысловая цепь действует как первый субстрат RISC, который расщепляется аргонаутом 2 в середине дуплексного участка. Сразу же после того, как расщепленные 5'-концевые и 3'-концевые фрагменты смысловой цепи удалятся из эндонуклеазы Ago2, RISC становится активированной антисмысловой цепью (Rand *et al.* (2005), *Cell*, 123, 621).

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

Morrissey *et al.* в сайте расщепления Ago2 среди других сайтов и модификаций также использовали миРНК-дуплекс, содержащий остатки, модифицированные 2'-F, и получили совместимый сайленсинг, сравнимый с немодифицированными миРНК (Morrissey *et al.* (2005), *Hepatology*, 41, 1349). Однако модификация по Morrissey не является мотив-специфической, например, одна модификация индуцирует модификации 2'-F на всех пиримидинах как на смысловой, так и на антисмысловой цепях до тех пор, пока пиримидиновый остаток присутствует, без какой-либо селективности; и следовательно, на основании таких указаний является неопределенным, может ли модификация специфического мотива в сайте расщепления смысловой цепи оказывать фактическое действие на активность сайленсинга генов.

Muhonen *et al.* использовали миРНК-дуплекс, содержащий два модифицированных 2'-F остатка в сайте расщепления Ago2 на смысловой или антисмысловой цепи и нашли это допустимым (Muhonen *et al.* (2007), *Chemistry & Biodiversity*, 4, 858-873). Однако модификация по Muhonen также является специфической для последовательности, например, для каждой определенной цепи

Muhonen модифицирует только или все пиримидины или все пурины без какой-либо селективности.

Choung et al. использовали миРНК-дуплекс, содержащий альтернативные модификации, за счет 2'-ОМе или различных комбинаций 2'-F, 2'-ОМе и фосфоротиоатных модификаций для стабилизации миРНК в сыворотке к Sur10058 (Choung et al. (2006), Biochemical and Biophysical Research Communications, 342, 919-927). Choung предполагал, что остатки в сайте расщепления антисмысловой цепи не должны модифицироваться 2'-ОМе для того, чтобы повысить устойчивость миРНК.

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

Сущность изобретения

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

Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что введение одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в три последовательных нуклеотида в сайте расщепления средства дцРНК или возле него, где средство дцРНК состоит из модифицированных смысловой и антисмысловой цепей, усиливает активность генного сайленсинга дцРНК-средством.

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

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

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

(III).

В формуле (III) каждый i , j , k и l независимо равен 0 или 1; каждый p и q независимо равен 0-6; n представляет собой нуклеотид; каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два различно модифицированных нуклеотида; каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо немодифицированы, или их комбинации; каждый n_p и n_q независимо представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность, содержащую 0-6 нуклеотидов; и каждый XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$ независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах; где модификации в N_b отличаются от модификаций в Y , и модификации в N_b' отличаются от модификаций в Y' . По меньшей мере один из нуклеотидов Y образует пару оснований со своими комплементарными нуклеотидами Y' , и где модификация в нуклеотиде Y отличается от модификации в нуклеотиде Y' .

Каждый n_p и n_q независимо представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность, содержащую 0-6 нуклеотидов; каждый n и n' представляет собой выступающий нуклеотид; и каждый p и q независимо равен 0-6.

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

мотивов находится в сайте расщепления в цепи или вблизи него, и по меньшей мере один из мотивов встречается в другой части цепи, которая отделена от мотива в сайте расщепления или вблизи него, по меньшей мере одним нуклеотидом. Модификация в мотиве, находящемся в сайте расщепления или вблизи него в смысловой цепи, отличается от модификации в мотиве, находящемся в сайте расщепления или вблизи него в антисмысловой цепи.

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

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

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

Подробное описание

Благодаря введению одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь средства дцРНК, в частности, в сайт расщепления или вблизи него можно получить отличный результат. Смысловая цепь и антисмысловая цепь средства дцРНК по-другому может быть модифицирована полностью.

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

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

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

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

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению может содержать один или несколько выступающих участков и/или кэппирующих групп средства дцРНК на 3'-конце или 5'-конце или на обоих концах цепи. Длина выступающего участка может быть 1-6 нуклеотидов, например, 2-6 нуклеотидов, 1-5

нуклеотидов, 2-5 нуклеотидов, 1-4 нуклеотида, 2-4 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 2-3 нуклеотида или 1-2 нуклеотида. Выступы могут быть результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом того, что две цепи одинаковой длины располагаются неравномерно. Выступ может образовывать ошибочное спаривание с мРНК-мишенью, или он может быть комплементарен последовательностям гена, являющихся мишенями, или может представлять собой другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут соединяться, например, дополнительными основаниями с образованием «шпильки» или другими не являющимися основаниями линкерами.

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

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

Средство дцРНК по изобретению содержит только один выступ,

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

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

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

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению представляет собой двухконцевой bluntmer длиной 20 нк, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил на трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

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

трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

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

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, при этом длина смысловой цепи составляет 25-30 нуклеотидных остатков, при этом, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 указанной первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; длина антисмысловая цепь составляет 36-66 нуклеотидных остатков, и начиная с 3'-концевого нуклеотида, содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в положениях, парных положениям 1-23 смысловой цепи, с образованием дуплекса; при этом по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спаривается со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, посредством чего образуется 3'-однонитевой выступ из 1-6 нуклеотидов; при этом 5'-конец антисмысловой цепи содержит 10-30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, посредством чего образуется однонитевой 5'-выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи являются основаниями, спаренными с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выравнены для максимальной комплементарности, посредством чего образуется, по существу, дуплексный участок между смысловой и антисмысловой цепями; и

антисмысловая цепь является достаточно комплементарной РНК-мишени вдоль по меньшей мере 19 рибонуклеотидов длины антисмысловой цепи для уменьшения экспрессии гена-мишени, когда указанную двухцепочечную нуклеиновую кислоту вводят в клетку млекопитающего; и при этом смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления или вблизи него. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех модификаций 2'-O-метил на трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления или вблизи него.

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

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

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

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

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

В одном из вариантов осуществления смысловая цепь средства дцРНК содержит более одного мотива из трех идентичных

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

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

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

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

Если смысловая цепь и антисмысловая цепь средства дцРНК

содержит, каждая по меньшей мере одну фланговую модификацию, фланговые модификации могут выпадать на один и тот же конец дуплексного участка и перекрывать один, два или три нуклеотида.

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

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

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

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

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

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

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

В одном из вариантов осуществления каждая смысловая цепь и антисмысловая цепь содержит два различными образом

модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-O-метил- или 2'-фтор-модифицированного.

В одном из вариантов осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-O-метилнуклеотидом, 2'-дезоксифторнуклеотидом, 2'-O-N-метилацетамидо (2'-O-NMA) нуклеотидом, 2'-O-диметиламиноэтоксипропил (2'-O-DMAEOE) нуклеотидом, 2'-O-аминопропил (2'-O-AP) нуклеотидом или 2'-ara-F-нуклеотидом.

В одном из вариантов осуществления N_a и/или N_b содержит чередующиеся модификации. Термины «чередующийся мотив» или «чередующаяся структура», как используется в настоящем описании, относятся к мотиву, имеющему одну или больше модификаций, где каждая модификация находится в чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующимся нуклеотидом может называться каждый второй или один из каждых трех нуклеотидов или подобная структура. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации для нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВВАААВВВ...» или «АВСАВСАВСАВС...» и тому подобное.

В одном из вариантов осуществления N_a' и/или N_b' содержит чередующиеся модификации. Термины «чередующийся мотив» или «чередующаяся структура», как используется в настоящем описании, относятся к мотиву, имеющему одну или больше модификаций, где каждая модификация находится в чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующимся нуклеотидом может называться каждый второй или один из каждых трех нуклеотидов или подобная структура. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации для нуклеотида, чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВВАААВВВ...» или «АВСАВСАВСАВС...» и тому подобное.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одним и тем же или отличаться. Например, если A, B, C и D представляют собой, каждый, один тип модификации нуклеотида, чередующаяся структура, т.е., модификации в каждом другом

нуклеотиде, могут быть одними и теми же, но каждая цепь из смысловой цепи или антисмысловой цепи может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в пределах чередующегося мотива, например, «АВАВАВ...», «АСАСАС...», «ВДВДВД...» или «СДСДСД...» и тому подобное.

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

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

Введение одного или нескольких мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь прерывает начальную структуру

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

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

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

относительно чередующейся структуры модификации межнуклеотидной связи в антисмысловой цепи.

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

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

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь дцРНК содержит два блока из двух фосфоротиоатных или

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

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь 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 располагается в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей любую фосфоротиоатную или метилфосфонатную или фосфатную связь.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь 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 располагается в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей любую фосфоротиоатную или метилфосфонатную или фосфатную связь.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь 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

связями, при этом одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей располагается в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей любую фосфоротиоатную или метилфосфонатную или фосфатную связь.

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

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь дцРНК содержит два блока из семи фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей располагается в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей любую фосфоротиоатную или метилфосфонатную или фосфатную связь.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь дцРНК содержит два блока из восьми фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей располагается в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со

смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей любую фосфоротиоатную или метилфосфонатную или фосфатную связь.

В одном из вариантов осуществления антисмысловая цепь 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 располагается в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей любую фосфоротиоатную или метилфосфонатную или фосфатную связь.

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит одну или несколько модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в пределах 1-10 концевых положений смысловой и/или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть соединены через фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь на одном конце или на обоих концах смысловой и/или антисмысловой цепи.

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит одну или несколько модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в пределах 1-10 внутреннего участка дуплекса каждой из смысловой и/или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть соединены через фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь в положении 8-16 дуплексного участка при исчислении от 5'-конца смысловой цепи; дцРНК также может необязательно содержать одну или больше модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в пределах 1-10 концевых положений.

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит одну-пять модификаций фосфоротиоатной или

метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 1-5 и одну-пять модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 18-23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и одну-пять модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и одну-пять в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1-5 и одну модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положении 18-23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1-5 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 18-23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1-5 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 18-23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1-5 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 18-23 смысловой цепи (считая

фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1-5 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 18-23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1-5 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 18-23 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

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

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

В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению также содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной

межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 смысловой цепи (считая от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца).

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

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

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

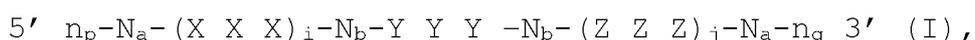
В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению содержит ошибочное(ые) спаривание(я) с мишенью в пределах дуплекса или их комбинации. Ошибочное спаривание может иметь место в выступающем участке дуплексного участка. Пара оснований может быть классифицирована на основании их склонности промотировать диссоциацию или плавление (например, из-за свободной энергии ассоциации или диссоциации

определенного спаривания, самым простым подходом является проверка пар на основании отдельной пары оснований, хотя также можно использовать анализ ближайшего соседа или подобный анализ). В смысле промотирования диссоциации А:U преобладает над G:C; G:U преобладает над G:C; и I:C преобладает над G:C (I = инозин). Ошибочные спаривания, например, неканонические или иные, чем канонические, спаривания предпочтительны перед каноническими (А:Т, А:U, G:C) спариваниями; и спаривания, которые включают универсальное основание, предпочтительны перед каноническими спариваниями.

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

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

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



где

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

r и q, каждый независимо, равен 0-6;

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

меньшей мере два различным образом модифицированных нуклеотида;
 каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотид выступа;

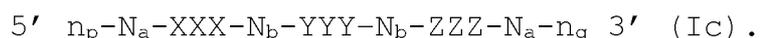
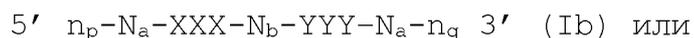
при этом N_b и Y не имеют одну и ту же модификацию; и

XXX , YYY и ZZZ , каждый независимо, представляют собой один мотив из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах. Предпочтительно, YYY представляет собой все 2'-F-модифицированные нуклеотиды.

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

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

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



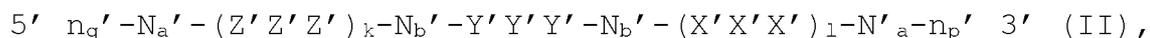
Когда смысловая цепь представлена формулой (Ia), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a может представлять собой независимо олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных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

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

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

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

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



при этом

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

p и q, каждый независимо, равен 0-6;

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

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

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

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

и

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

последовательных нуклеотидах.

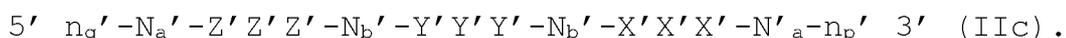
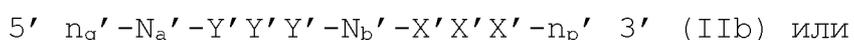
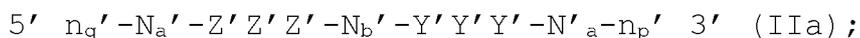
В одном из вариантов осуществления N_a' и/или N_b' содержит модификации чередующейся структуры.

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

В одном из вариантов осуществления мотив $Y'Y'Y'$ представляет собой все 2'-ОМе-модифицированные нуклеотиды.

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

Следовательно, антисмысловая цепь может быть представлена следующими формулами



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

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

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIc), каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4,

0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b' представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 модифицированных нуклеотидов.

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

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

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

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

Смысловая цепь, представленная одной из приведенных выше формул (Ia), (Ib) и (Ic), образует дуплекс с антисмысловой

цепью, представленной одной из приведенных выше формул (IIa), (IIb) и (IIc), соответственно.

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

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

(III),

где

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

каждый p и q независимо равен 0-6;

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

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

где

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

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

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

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

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

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

(V),

где

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

p и q равны, каждый независимо, 2;

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

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

где

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

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

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

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

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

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

(Va),

где

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

каждый p и q независимо равен 2;

каждый N_a и N_a' независимо представляет собой

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

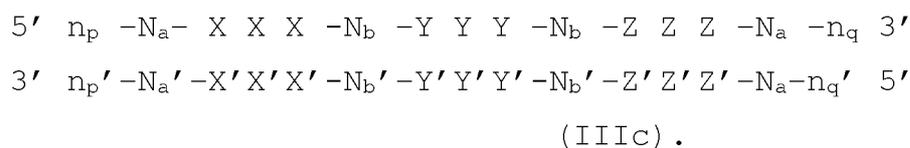
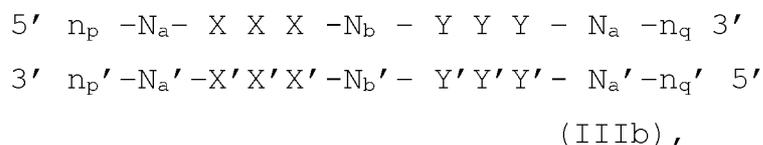
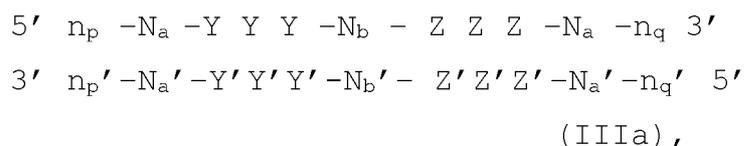
каждый N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

где

n_p' представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность; и

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

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



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

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

модифицированных нуклеотидов.

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

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

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

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

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

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

В одном из вариантов осуществления модификация в нуклеотиде Y иная, чем модификация в нуклеотиде Y' , модификация

в нуклеотиде Z иная, чем модификация в нуклеотиде Z', и/или модификация в нуклеотиде X иная, чем модификация в нуклеотиде X'.

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

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

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

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

Средство дцРНК, которое содержит конъюгации одной или нескольких углеводных частей со средством дцРНК, может

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

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду через носитель. Носители включают (i) по меньшей мере одну «точку присоединения к главной цепи», предпочтительно, две «точки присоединения к главной цепи», и (ii) по меньшей мере одну «точку промежуточного присоединения». Используемый в настоящем описании термин «точка присоединения к главной цепи» относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или вообще доступной для связи, и которая подходит для введения носителя в главную цепь, например, фосфатной группе или модифицированной фосфатной группе, например, серусодержащей группе главной цепи рибонуклеиновой кислоты. Термин «точка промежуточного присоединения» (TAP) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в цикл атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличающемуся от атома, который обеспечивает точку присоединения главной цепи), который присоединяет выбранную часть. Часть может представлять собой, например, углевод,

например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранная часть соединяется с циклическим носителем посреднической связью. Таким образом, циклический носитель обычно будет включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивающую связь, которая подходит для включения или для промежуточной связи для другой химической частицы, например, лиганда, с составляющим циклом.

В варианте осуществления дцРНК по изобретению конъюгируют с лигандом через носитель, при этом носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу; предпочтительно, циклическую группу выбирают из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинилла, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно, ациклическую группу выбирают из главной цепи серинола или главной цепи диэтанолamina.

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

Лиганды

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

В предпочтительных вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время жизни молекулы, в которую он включен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает усиленную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, рецептора, например, клеточного компартмента или компартмента органа, ткани, органа или части тела, при сравнении, например,

с аффинностью при отсутствия такого лиганда. Лиганды, обеспечивающие усиленную аффинность в отношении выбранной мишени, также называют нацеливающими лигандами.

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

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

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

пептидомиметики.

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

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например, средство, нацеливающее на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается со специфическим типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный активный белок А, углевод муцина, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бифосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин, пептид RGD, миметик пептида RGD или аптамер. Таблица 2 показывает некоторые примеры нацеливающих лигандов и их

ассоциированные рецепторы.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие вещества (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TRPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелаторы (например, ЭДТК), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил) глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, ОЗ-(олеоил)литохолевую кислоту, ОЗ-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин, и пептидные конъюгаты (например, антеннапедиапептид, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, амино, меркапто, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), MPEG, [MPEG]₂, полиамины, алкилы, замещенные алкилы, меченные изотопами маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, облегчающие перенос/поглощение (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплексы Eu³⁺ тетраазамакроциклов), динитрофенил, HPR или AP.

Лигандами могут быть белки, например, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы со специфической аффинностью к солиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с клеткой определенного типа, такой как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать непептидные вещества, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза или аптамеры. Лиганд может представлять собой, например, липополисахарид, активатор p38 MAP-киназы или активатор NF-κB.

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

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

В одном из аспектов лиганд представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такие липид или молекула на основе липида, предпочтительно, связывают сывороточный белок, например, человеческий сывороточный альбумин (HSA). Связывающий HSA лиганд позволяет донести конъюгат до ткани-мишени, например, непочечной ткани-мишени организма. Например, ткань-мишень может представлять собой ткань печени, включая паренхимные клетки печени. Другие молекулы, которые могут связывать HSA, также можно использовать в качестве лигандов. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или лиганд на основе липида может (а) повышать устойчивость к разрушению конъюгатов, (b) повышать нацеливание или перенос в клетку-мишень или клеточную мембрану и/или (с) может использоваться для регулирования связывания с сывороточным белком, например, HSA.

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

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

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

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

В другом аспекте лиганд представляет собой средство, проникающее в клетку, предпочтительно, спиральное проникающее в клетку средство. Предпочтительно, средство является амфипатическим. Примером средства является пептид tat или антеннопедия. Если средство представляет собой пептид, он может быть модифицированным, включая пептидомиметик, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и использование D-аминокислот. Спиральное средство предпочтительно представляет собой альфа-спиральное средство, которое, предпочтительно, имеет липофильную и липофобную фазу.

Лиганд может представлять собой пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем описании

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

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

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

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

В одном из вариантов осуществления нацеливающий пептид может представлять собой амфипатический α -спиральный пептид. Примеры амфипатических α -спиральных пептидов включают, но ими не ограничиваются, цекропины, ликотоксины, парадаксины, буфорин, CPF, бомбининоподобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S. clava*, интестинальные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаинины, бревининс-2, дермасептины, мелиттины, плевроцидин, пептиды H₂A, пептиды Xenopus, эскулентин-1 и caerins. Предпочтительно, будет рассматриваться ряд факторов для поддержания целостности и устойчивости спирали. Например, будет использоваться максимальное число стабилизирующих спираль остатков (например, leu, ala или lys) и минимальное число остатков, дестабилизирующих спираль (например, пролина или звеньев циклических мономеров). Будет рассматриваться кэпирующий остаток (например, Gly является примером N-кэпирующего остатка), и/или можно использовать C-концевое амидирование для обеспечения добавочной H-связи для стабилизации спирали. Образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенных $i \pm 3$ или $i \pm 4$ положениями, может обеспечить устойчивость. Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомоаргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками глутамата или аспартата.

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

сульфонилмочевинными связями; или циклические пептиды.

Нацеливающий лиганд может представлять собой любой лиганд, способный нацеливаться на специфический рецептор. Примерами являются фолат, GalNAc, галактоза, манноза, манноза-6P, кластеры сахаров, такие как кластер GalNAc, кластер маннозы, кластер галактозы, или апатамер. Кластер представляет собой комбинацию двух или больше звеньев сахаров. Нацеливающие лиганды также включают лиганды интегриновых рецепторов, лиганды хемокиновых рецепторов, трансферрин, биотин, лиганды серотонинных рецепторов, PSMA, эндотелин, GCP11, соматостатин, лиганды LDL и HDL. Лиганды также могут быть на основе нуклеиновой кислоты, например, аптамер. Аптамер может быть немодифицированным или иметь любую комбинацию модификаций, раскрытых в настоящем описании.

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

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

(например, в качестве РК модулирующих лигандов).

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

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

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

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

быть присоединен к мономеру предшественнику путем сочетания электрофильной группы лиганда с концевой нуклеофильной группой связи мономера предшественника.

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

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

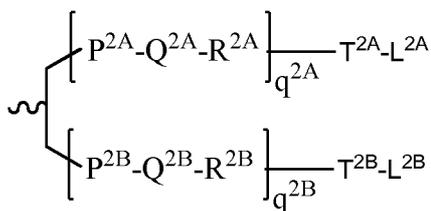
В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеотидными основаниями, частями сахаров или межнуклеозидными связями молекул нуклеиновой кислоты. Конъюгация с пуриновыми нуклеотидными основаниями или их производными может иметь место в любом положении, включая эндоциклические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

конъюгата может присоединяться непосредственно в атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. В случае амин- или амидсодержащих межнуклеозидных связей (например, PNA) часть конъюгата может присоединяться к атому азота амина или амида или к соседнему атому углерода.

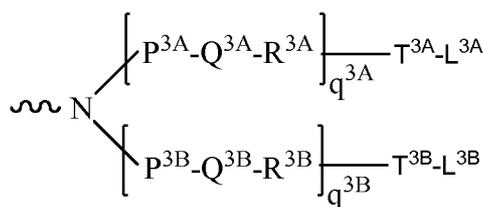
Любой подходящий в области РНК-интерференции лиганд может быть использован, хотя лиганд обычно представляет собой углевод, например, моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, полисахарид.

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

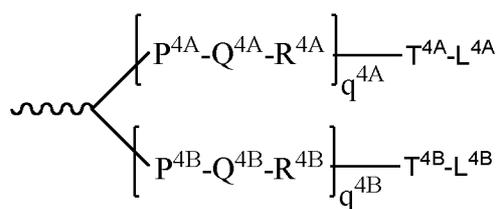
В одном из вариантов осуществления дцРНК по изобретению конъюгирована с двухвалентным и трехвалентным линкером, включающими структуры, показанные в любой из формул (IV) – (VII)



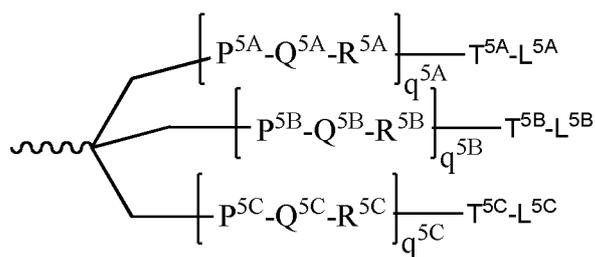
Формула (IV)



Формула (V)



Формула (VI)



Формула (VII)

или

при этом

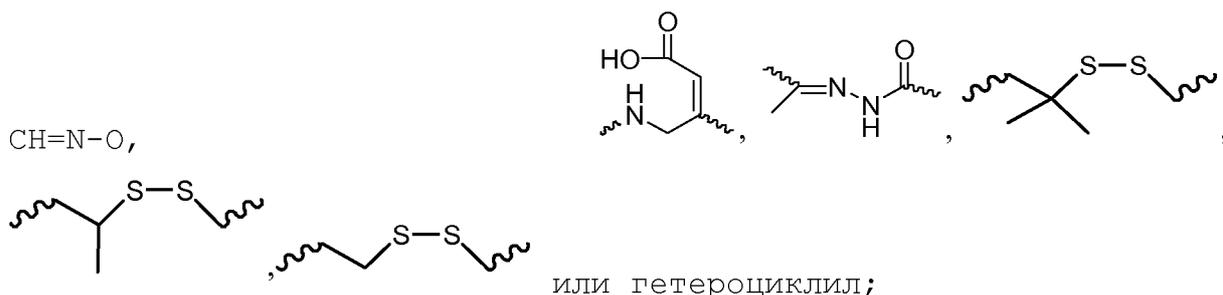
$q^{2\text{A}}$, $q^{2\text{B}}$, $q^{3\text{A}}$, $q^{3\text{B}}$, $q^{4\text{A}}$, $q^{4\text{B}}$, $q^{5\text{A}}$, $q^{5\text{B}}$ и $q^{5\text{C}}$ независимо равны в случае каждого появления, 0–20, и при этом повторяющееся звено может быть одним и тем же или другим;

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

CH_2 , CH_2NH или CH_2O ;

Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} независимо в случае каждого появления отсутствуют или представляют собой алкилен, замещенный алкилен, при этом один или несколько метиленов могут прерываться или обрываться одним или несколькими O , S , $S(O)$, SO_2 , $N(R^N)$, $C(R')=C(R'')$, $C\equiv C$ или $C(O)$;

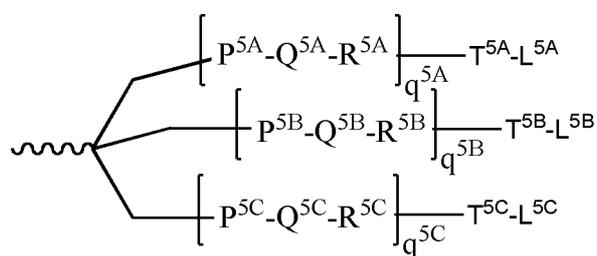
Каждый R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} независимо в случае каждого появления отсутствует или представляет собой NH , O , S , CH_2 , $C(O)O$, $C(O)NH$, $\text{NHCH}(R^a)C(O)$, $-C(O)-CH(R^a)-NH-$, CO ,



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

R^a представляет собой H или аминокислотную боковую цепь.

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

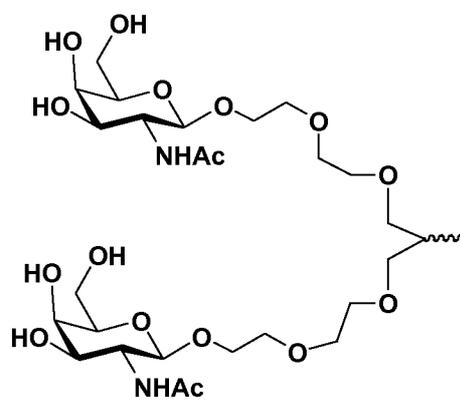
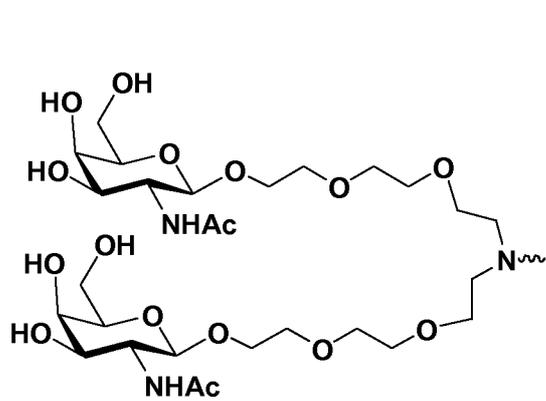
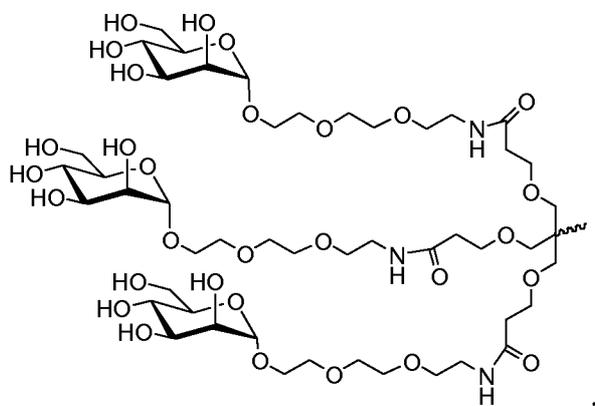
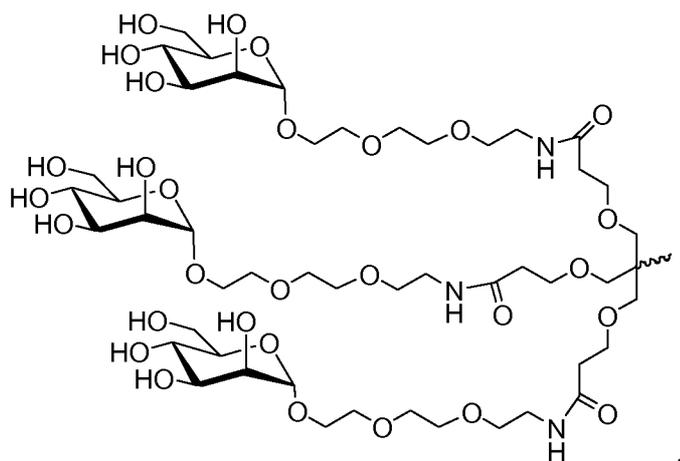
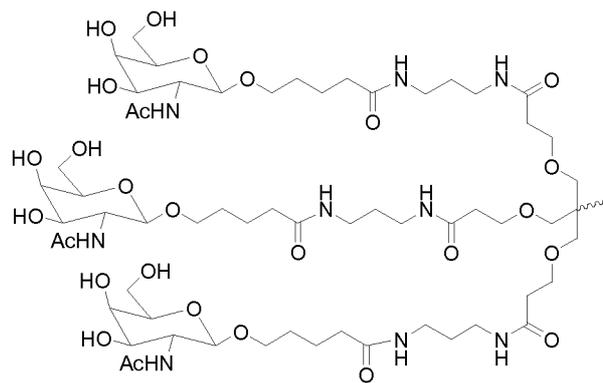


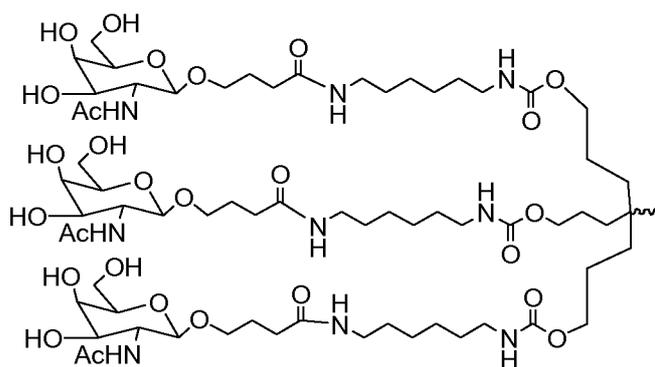
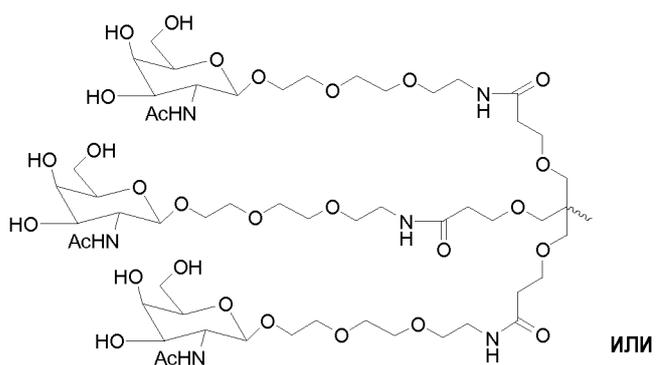
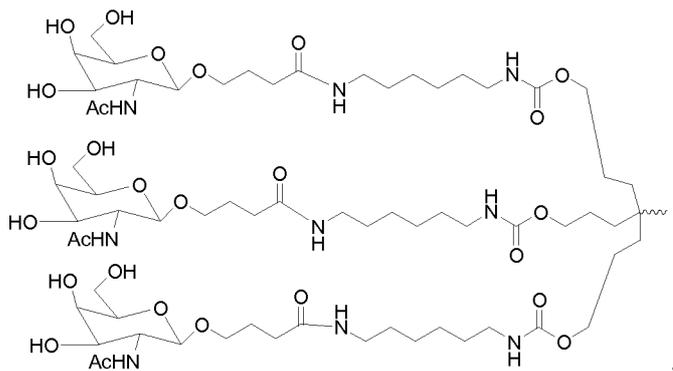
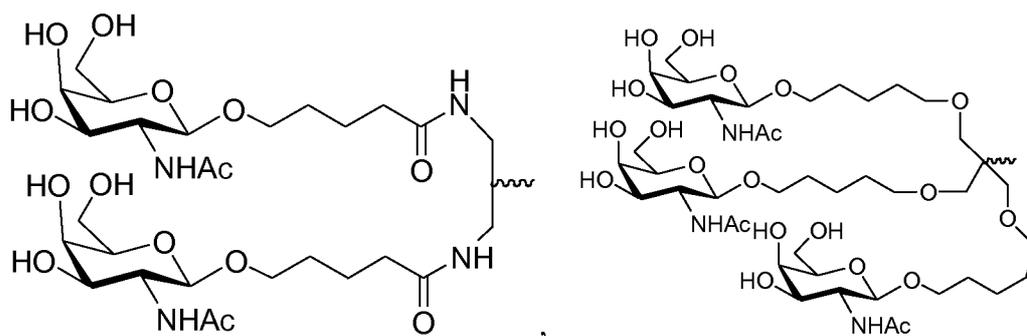
Формула (VII)

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

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

соединения:





Определения

Используемые в настоящем описании термины «дцРНК», «миРНК» и «средство иРНК» используются как взаимозаменяемые для средств, которые могут опосредовать сайленсинг РНК-мишени, например, мРНК, например, транскрипт гена, который кодирует

белок. Для удобства такую мРНК в настоящем описании также относят к мРНК, которую глушат. Такой ген в настоящем описании также относят к гену-мишени. Как правило, РНК, которую глушат, представляет собой эндогенный ген или патогенный ген. Кроме того, РНК, иные чем мРНК, например, тРНК, и вирусные РНК также могут являться мишенями.

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

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

В одном из вариантов осуществления средство дцРНК по изобретению является «достаточно комплементарным» к РНК-мишени, например, мРНК-мишени, так что средство дцРНК глушит продуцирование белка, кодированного мРНК-мишенью. В другом варианте осуществления средство дцРНК по изобретению является «точно комплементарным» к РНК-мишени, например, РНК-мишень и средство дцРНК-дуплекс отжигаются, например, с образованием в участке точной комплементарности гибрида, состоящего исключительно из пар оснований по Уотсону-Крику. «Достаточно комплементарная» РНК-мишень может включать промежуточный

участок (например, по меньшей мере из 10 нуклеотидов), который точно комплементарен РНК-мишени. Более того, в некоторых вариантах осуществления средство дцРНК по изобретению специфически различает различие в один нуклеотид. В таком случае средство дцРНК опосредует РНКи только если в участке (например, в пределах 7 нуклеотидов) с различием в один нуклеотид обнаруживается точная комплементарность.

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

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

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

Термин «циклоалкил», используемый в настоящем описании, включает насыщенные и частично ненасыщенные циклические углеводородные группы с 3-12 атомами углерода, например, 3-8 атомами углерода, и, например, 3-6 атомами углерода, при этом

циклоалкильная группа может быть, необязательно, дополнительно замещена. Циклоалкильные группы включают, без ограничения, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил и циклооктил.

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

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

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

присоединен к сере.

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

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

Расщепляемые связывающие группы

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

Расщепляемые связывающие группы чувствительны к средствам

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

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

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

включают клетки легкого, корковое вещество почек и яичко.

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

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

Связывающие группы, расщепляемые в условиях окисления-восстановления

Одним из классов расщепляемых связывающих групп являются связывающие группы, расщепляемые в условиях окисления-восстановления. Примером связывающей группы, расщепляемой при восстановлении, является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Для того, чтобы определить, является ли кандидат в расщепляемую связывающую группу подходящим для «связывающей группы, расщепляемой при восстановлении», или, например, подходящим для использования с определенной частью иРНК и

определенным нацеливающим средством, можно рассмотреть способы, описанные в настоящем описании. Например, кандидата можно оценить путем инкубации с дитиотрептолом (ДТТ) или другим восстановителем с использованием реагентов, известных в данной области, которые имитируют скорость расщепления, которую можно было бы наблюдать в клетке, например, клетке-мишени. Кандидатов также можно оценить в условиях, которые выбирают для имитации условий в крови или сыворотке. В предпочтительном варианте осуществления соединения-кандидаты расщепляются в крови самое большее, на 10%. В предпочтительных вариантах осуществления применимые соединения-кандидаты разрушаются, по меньшей мере, в 2, 4, 10 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации условий в клетке) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации условий вне клетки). Скорость расщепления соединений-кандидатов можно определить с использованием стандартных ферментных кинетических анализов в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды, и сравнения с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

Расщепляемые связывающие группы на основе фосфатов

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

Связывающие группы, расщепляемые кислотой

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

Связывающие группы на основе сложных эфиров

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

Расщепляющиеся группы на основе пептидов

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

Расщепляемые группы на основе пептидов не включают аминогруппу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь является особым типом амидной связи, образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничивается пептидной связью (т.е., амидной связью), образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает всю амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов имеют общую формулу $-NHCHR^A C(O)NHCR^B C(O)-$, где R^A и R^B представляют собой группы R двух соседних аминокислот. Таких кандидатов можно оценить с использованием методов, аналогичных методам, описанным выше. Используемый в настоящем описании термин «углевод» относится к соединению, которое или само по себе является углеводом, состоящим из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих, по меньшей мере, 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода; или соединение, имеющее в качестве своей части углеводную часть, состоящую из одного или нескольких моносахаридных звеньев, причем каждое имеет, по меньшей мере, шесть атомов углерода (которое может быть линейным, разветвленным или циклическим), с атомом кислорода, азота или серы, связанным с каждым атомом углерода. Характерные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4-9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные смолы. Конкретные сахара включают C_5 и высшие (предпочтительно, C_5 - C_8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара, имеющие два или три моносахаридных звена (предпочтительно, C_5 - C_8).

Альтернативные варианты осуществления

В другом варианте осуществления изобретение относится к средству дцРНК, способному ингибировать экспрессию гена-мишени. Средство дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем каждая цепь имеет 14-30 нуклеотидов. Смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех идентичных

модификаций в три последовательных нуклеотида, где по меньшей мере один из мотивов встречается в сайте расщепления в антисмысловой цепи или возле нее. Каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи модифицирован. Модификации в смысловой цепи и антисмысловой цепи, в каждой независимо, включают, по меньшей мере, две различные модификации.

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

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

В другом варианте осуществления изобретение относится к

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

Смысловая цепь также может содержать один или больше мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где один или больше дополнительных мотивов встречаются в другой части цепи, которая отделена от трех 2'-F модификаций в сайте расщепления по меньшей мере одним нуклеотидом. Антисмысловая цепь также может содержать один или больше мотивов из трех идентичных модификаций на трех последовательных нуклеотидах, где один или больше

дополнительных мотивов расположены в другой части цепи, которая отделена от трех 2'-O-метильных модификаций в сайте расщепления по меньшей мере одним нуклеотидом. По меньшей мере один из нуклеотидов, имеющих модификацию 2'-F, может образовывать пару оснований с одним нуклеотидом, имеющим 2'-O-метильную модификацию.

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

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

Водные или кристаллические композиции можно, например, включить в среду для доставки, например, в липосому (особенно, в случае водной фазы) или частицу (например, микрочастицу, что может быть подходящим для кристаллической композиции). Как правило, композицию миРНК получают способом, который совместим с предполагаемым способом введения, описанным в настоящем описании. Например, в отдельных вариантах осуществления композицию получают, по меньшей мере, одним из следующих способов: сушка распылением, лиофилизация, вакуумная сушка, выпаривание, сушка в псевдооживленном слое или комбинация таких методов; или обработкой ультразвуком с липидом, сушкой вымораживанием, кондансацией и другой самосборкой.

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

В одном из вариантов осуществления препарат миРНК содержит другое соединение миРНК, например, вторую миРНК, которая опосредует РНКи в отношении второго гена и в отношении того же гена. Другой препарат может содержать по меньшей мере 3, 5, десять, двадцать, пятьдесят, сто или больше различных видов миРНК. Такие миРНК могут опосредовать РНКи в отношении подобного числа различных генов.

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

Примеры препаратов обсуждаются ниже.

Липосомы. Для простоты описания препараты, композиции и способы в данном разделе большей частью обсуждаются в отношении немодифицированных соединений миРНК. Однако, следует иметь в виду, что такие препараты, композиции и способы могут быть осуществлены с другими соединениями миРНК, например, модифицированными миРНК, и такая практика входит в изобретение. Соединение миРНК, например, соединение двухцепочечная миРНК, или соединение кмиРНК (ssiRNA) (например, предшественник, например, более крупное соединение миРНК, которое может быть процессировано до соединения кмиРНК, или ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например, двухцепочечной миРНК, или соединения кмиРНК, или его предшественника), можно ввести в препарат для доставки в совокупности мембранных молекул, например, липосоме или мицелле. Используемый в настоящем описании термин «липосома» относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных по меньшей мере в одном бислое, например, одном бислое или нескольких бислоях. Липосомы включают униламеллярные и полиламеллярные везикулы, которые имеют оболочку, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию

миРНК. Липофильный материал изолирует водную внутреннюю часть от водного наружного окружения, которое, как правило, не включает композицию миРНК, хотя в некоторых примерах это может иметь место. Липосомы применимы для переноса и доставки активных ингредиентов в место действия. Поскольку липосомная оболочка структурно схожа с биологическими мембранами, то когда липосомы применяют к ткани, липосомный бислой сливается с клеточными мембранами. Так как слияние липосомы и клетки продолжается, внутреннее водное содержимое, которое включает миРНК, доставляется в клетку, где миРНК может специфически связываться с РНК-мишенью и может опосредовать РНКи. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления миРНК в определенные типы клеток.

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

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

Дополнительное описание способов получения устойчивых везикул для доставки полинуклеотидов, которые содержат комплекс полинуклеотид/катионный липид как структурный компонент

доставочной везикулы, приводится, например, в WO 96/37194. Образование липосом также может включать один или несколько аспектов описанных примеров методов из Felgner P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8: 7413-7417, 1987; патент США № 4897355; пат США № 5171678; Bangham et al., M. Mol. Biol., 23: 238, 1965; Olson et al., Biochem. Biophys. Acta, 557: 9, 1979; Szoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 4194, 1978; Mayhew et al., Biochem. Biophys. Acta, 775: 169, 1984; Kim et al., Biochem. Biophys. Acta, 728: 339, 1983; и Fukunaga et al., Endocrinol., 115: 757, 1984. Обычно используемые методы получения липидных агрегатов соответствующего размера для использования в доставочных везикулах включают ультразвуковую обработку и замораживание-оттаивание плюс экструзия (см., например, Mayer et al., Biochem. Biophys. Acta, 858: 161, 1986). Когда требуются сообразно небольшие (50-200 нм) и относительно однородные агрегаты, можно использовать микрофлюидизацию (Mayhew et al., Biochem. Biophys. Acta, 775: 169, 1984). Такие способы легко адаптируются для упаковки препаратов мРНК в липосомы.

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

Один основной тип липосомной композиции включает иные фосфолипиды, чем фосфатидилхолин природного происхождения. Нейтральные липосомные композиции можно получить, например, из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомные композиции, как правило, получают из

димиристоилфосфатидилглицерина, в то время как анионные фузогенные липосомы получают преимущественно из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомной композиции получают из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, соевый PC и яичный PC. Еще один тип получают из смесей фосфолипида и/или фосфатидилхолина и/или холестерина.

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

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

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

Положительно заряженный синтетический катионный липид хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA) можно использовать для получения небольших липосом, которые взаимодействуют спонтанно с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры ткани, что приводит к доставке миРНК (см., например, Felgner P.L. et al., Proc. Natl.

Acad. Sci. USA, 8: 7413-7417, 1987, и пат. США № 4897355, с описанием DOTMA и его использования с ДНК).

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

Другие описанные катионные липиды включают соединения, которые конъюгированы с различными частями, включая, например, карбоксиспермин, который конъюгирует с одним из двух типов липидов, и включает соединения, такие как диоктаолеоиламид 5-карбоксиспермилглицина («DOGS») (трансфектамTM, Promega, Madison, Wisconsin) и 5-карбоксиспермиламид дипальмитоилфосфатидилэтаноламина («DPPE») (см., например, пат. США № 5171678).

Другой конъюгат катионного липида включает продукт дериватизации липида холестеринном («DC-Chol»), который вводят в липосомы в комбинации с DOPE (см. Gao X. and Huang L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179: 280, 1991). Сообщается, что липополилизин, полученный конъюгацией полилизина с DOPE,

является эффективным для трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou X. et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 1065: 8, 1991). Иными словами, для некоторых клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, показывают меньшую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA-содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты катионные липиды включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

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

Неионные липосомные системы также проверяли для определения их полезности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, включающие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные препараты, содержащие новасом I (простой 10-стеариловый эфир глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилена) и новасом II (простой 10-стеариловый эфир глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилена) использовали для

доставки лекарственного средства в дерму кожи мышцы. Такие препараты с миРНК применимы для лечения дерматологического расстройства.

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

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

Поверхностно-активные вещества. Для простоты описания препараты, композиции и способы в данном разделе большей частью обсуждаются в отношении немодифицированных соединений миРНК. Однако, следует иметь в виду, что такие препараты, композиции и способы могут быть осуществлены с другими соединениями миРНК, например, модифицированными миРНК, и такая практика входит в

изобретение. Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в композициях, таких как эмульсии (включая микроэмульсии) и липосомы (см. выше). Композиции миРНК (или предшественника, например, более крупной дцРНК, которая может быть процессирована до миРНК, или ДНК, которая кодирует миРНК или предшественника) могут включать поверхностно-активное вещество. В одном из вариантов осуществления миРНК находится в препарате в виде эмульсии, которая включает поверхностно-активное вещество. Самым общим способом классификации и оценки свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ как природных, так и синтетических является использование гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ). Характер гидрофильной группы дает наиболее применимое средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, используемых в препаратах (Rieger, в «Pharmaceutical Dosage Forms», Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1988, p. 285).

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

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд, когда она растворена или диспергирована в воде, поверхностно-активное вещество классифицируется как

анионогенное. Анионогенные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламида аминокислот, эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты и фосфаты. Наиболее значительными членами класса анионогенных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и мыла.

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

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

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

Мицеллы и другие мембранные препараты. Для простоты описания мицеллярные и другие препараты, композиции и способы в данном разделе большей частью обсуждаются в отношении немодифицированных соединений миРНК. Однако, понятно, что такие мицеллярные и другие препараты, композиции и способы могут быть осуществлены с другими соединениями миРНК, например, модифицированными миРНК, и такая практика входит в изобретение. Композиция соединения миРНК, например, соединения двухцепочечной миРНК, или соединения кмиРНК (ssiRNA) (например, предшественника, например, более крупного соединения миРНК, которое может быть процессировано до соединения кмиРНК, или

ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например, двухцепочечную миРНК, или соединения кмиРНК, или его предшественника) может быть предоставлена в мицеллярном препарате. В настоящем описании «мицеллы» определяются как определенный тип скопления молекул, в котором амфипатические молекулы располагаются в сферической структуре, так что все гидрофобные части молекул направлены внутрь, оставляя гидрофильные части в контакте с окружающей водной фазой. Существует обратное расположение, если окружающая среда является гидрофобной.

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

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

щелочного металла и, по меньшей мере одно из мицеллообразующих соединений и затем добавляя остальные мицеллообразующие соединения.

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

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

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

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

Частицы. Для простоты описания частицы, препараты, композиции и способы в данном разделе большей частью обсуждаются в отношении немодифицированных соединений миРНК. Однако можно понять, что такие частицы, препараты, композиции и способы могут быть осуществлены с другими соединениями миРНК, например, модифицированными миРНК, и такая практика входит в изобретение. В другом варианте осуществления препараты

соединения миРНК, например, соединения двухцепочечной миРНК, или соединения кмиРНК (например, предшественника, например, более крупного соединения миРНК, которое может быть процессировано до соединения кмиРНК, или ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например, двухцепочечную миРНК, или соединение кмиРНК, или его предшественника) могут быть включены в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получить распылительной сушкой, но также можно получить другими способами, включая лиофилизацию, выпаривание, сушку в псевдооживленном слое, вакуумную сушку, или комбинацией таких методов.

Фармацевтические композиции

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

Фармацевтические композиции могут быть составлены специально для введения в твердой или жидкой форме, включая формы, адаптированные для следующего: (1) перорального введения, например, формы для вливания (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например, имеющие целью трансбуккальное, сублингвальное и системное всасывание, болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; (2) парентерального введения, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидермальной инъекции, например, в виде стерильного раствора или суспензии, или препарата с отсроченным высвобождением; (3) местного введения, например, в виде крема, мази или пэчча с регулируемым высвобождением, или спрея, наносимого на кожу; (4) интравагинального или интаректального введения, например, в виде pessaria, крема или пенки; (5) сублингвального введения; (6) внутриглазного введения; (7) трансдермального введения или (8) назального введения. Доставка с использованием подкожного

или внутривенного способа может быть особенно предпочтительной.

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

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

Выражение «фармацевтически приемлемый носитель», используемое в настоящем описании, обозначает фармацевтически приемлемый материал, композицию или среду, такую как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, вспомогательное вещество при получении (например, смазывающее вещество, тальк, стеараты магния, кальция или цинка или стеариновая кислота) или инкапсулирующий растворитель материал, вовлеченные в перемещение или перенос соединения в организме индивида из одного органа или части организма в другой орган или часть организма. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами препарата и не наносить вред пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) измельченный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие вещества, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) эксципиенты, такие как масло какао и воски

для суппозиторий; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, подсолнечное масло, сезамовое масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферирующие вещества, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апиrogenную воду; (17) изотоничный солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH-буферные растворы; (21) сложные полиэфиры, поликарбонат и/или полиангидриды; (22) наполнители, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) сывороточный компонент, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических препаратах.

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

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

вышеуказанный препарат придает пероральную биодоступность соединению по настоящему изобретению.

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

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

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

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

Термин «лечение» предназначен для обозначения также профилактики, лечения и исцеления. Пациентом, получающим такое

лечение, является любое животное, нуждающееся в этом, включая приматов, в частности, человека, и других млекопитающих, таких как лошади, крупный рогатый скот, свиньи и овцы, и домашнюю птицу и всех домашних животных.

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

Пути доставки

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

Молекулы иРНК по изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции, как правило, содержат один или несколько видов иРНК и фармацевтически приемлемый носитель. Используемая в настоящем описании формулировка «фармацевтически приемлемый носитель» предназначена для включения любого и всех растворителей, диспергирующих сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, средств изотоничности и средств, замедляющих абсорбцию, и тому подобное, совместимых с

фармацевтическим введением. Использование таких сред и средств с фармацевтически активными веществами хорошо известно в данной области. Их использование в композиции предполагается за исключением случая, когда любая обычная среда или средство несовместимы с активным соединением. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

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

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

Дозировка

В одном из аспектов особенностью изобретения является способ введения индивиду (например, человеку) средства дцРНК, например, средства миРНК. Способ включает введение стандартной дозы средства дцРНК, например, средства миРНК, например, двухцепочечного средства миРНК, которая (а) имеет двухцепочечную часть длиной в 14-30 нуклеотидов (нк), например, 21-23 нк, (b) комплементарна РНК-мишени (например, эндогенной или патогенной РНК-мишени) и необязательно (с) включает, по меньшей мере, один 3'-выступ длиной в 1-5 нуклеотидов. В одном из вариантов осуществления стандартная доза составляет менее 10 мг на кг массы тела или менее 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005 или 0,00001 мг на кг массы тела, и

менее 200 нмоль средства РНК (например, примерно $4,4 \times 10^{16}$ копий) на кг массы тела или менее 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075 или 0,00015 нмоль средства РНК на кг массы тела.

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

В некоторых вариантах осуществления стандартную дозу вводят реже одного раза в сутки, например, реже, чем каждые 2, 4, 8 или 30 дней. В другом варианте осуществления стандартную дозу вводят нерегулярно. Например, стандартная доза может быть введена однократно.

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

В одном из вариантов осуществления индивиду вводят начальную дозу и одну или несколько поддерживающих доз средства дцРНК, например, средства миРНК (например, предшественника, например, средства более крупной дцРНК, которая может быть процессирована в средство миРНК, или ДНК, которая кодирует средство дцРНК, например, средство миРНК, или его предшественника). Поддерживающая доза или дозы могут быть такими же или меньше, чем начальная доза, например, наполовину меньше начальной дозы. Схема поддерживающего лечения может

включать лечение индивида дозой или дозами, колеблющимися от 0,01 до 15 мг/кг массы тела в сутки, например, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 или 0,00001 мг на кг массы тела в сутки. Поддерживающие дозы вводят, например, не чаще, чем один раз каждые 2, 5, 10 или 30 дней. Кроме того, схема лечения может длиться в течение периода времени, который будет изменяться в зависимости от характера определенного заболевания, его тяжести и общего состояния пациента. В некоторых вариантах осуществления дозировка может доставляться не более одного раза в сутки, например, не более одного раза в 24, 36 или 48 или более часов, например, не более одного раза каждые 5 или 8 дней. После лечения пациента можно проконтролировать на изменения в его состоянии и на облегчение симптомов болезненного состояния. Дозировка соединения может быть или увеличена в случае, когда пациент не реагирует в достаточной степени на текущие уровни дозировки, или доза может быть уменьшена, если наблюдается облегчение симптомов болезненного состояния, если болезненное состояние не устраняется или если наблюдают побочное действие.

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

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

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

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

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

Способы ингибирования экспрессии гена-мишени

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

Другой аспект изобретения относится к способу модуляции экспрессии гена-мишени в клетке, включающему предоставление указанной клетке средства дцРНК по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления ген-мишень выбирают из группы, состоящей из фактора VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, гена PDGF-бета, гена Erb-B, гена Src, гена CRK, гена CRB2, гена RAS, гена MEKK, гена JNK, гена RAF, гена Ercl/2, гена PCNA(p21), гена MYB, гена JUN, гена FOS, гена BCL-2, гепцидена, активированного белка C, гена циклина D, гена VEGF, гена EGFR,

гена циклина А, гена циклина Е, гена WNT-1, гена бета-катенина, гена с-МЕТ, гена РКС, гена NFКВ, гена STAT3, гена сурвивина, гена Her2/Neu, гена топоизомеразы I, гена топоизомеразы II альфа, мутаций в гене p73, мутаций в гене p21 (WAF1/CIP1), мутаций в гене p27(KIP1), мутаций в гене PPM1D, мутаций в гене RAS, мутаций в гене кавеолина I, мутаций в гене MIB I, мутаций в гене MTA1, мутаций в гене M68, мутаций в опухолевых генах-супрессорах и мутаций в опухолевом гене-супрессоре p53.

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

Примеры

Пример 1. Скрининг миРНК-дуплексов *in vitro*

Клеточная культура и трансфекции

Клетки человека Her3В или клетки крысы H.II.4.E (ATCC, Manassas, VA) выращивают почти до слияния при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в RPMI (ATCC) с добавлением 10% FBS, стрептомицина и глутамина (ATCC) и затем извлекают из чашки трипсинизацией. Трансфекцию выполняют, добавляя к 5 мкл миРНК-дуплексов на лунку в 96-луночной планшете 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл липофектамина RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad, CA, кат. № 13788-150), и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси миРНК добавляют 80 мкл полной среды для выращивания без антибиотиков, содержащей ~2×10⁴ клеток Her3В. Клетки инкубируют или 24 или 120 часов и затем очищают РНК. Эксперименты с однократной дозой выполняют при конечной концентрации дуплексов 10 нМ и 0,1 нМ, и эксперименты по зависимости реакции от дозы выполняют с использованием 8, 4-кратных серийных разведений с максимальной дозой дуплексов в конечной концентрации 10 нМ.

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

Клетки собирают и лизируют в 150 мкл буфера для

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

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

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

ПЦР в реальном времени

К основной смеси, содержащей 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan (Applied Biosystems, кат.№ 4236317E (человека), кат.№ 4308313 (грызуна)), 0,5 мкл зонда TTR TaqMan (Applied Biosystems, кат.№ HS00174914_m1 (человека), кат.№ Rn00562124_m1 (крысы)) и 5 мкл основной смеси зонда Lightcycler 480 (Roche, кат.№

04887301001), на лунку в 384-луночном планшете (Roche, кат.№ 04887301001) добавляют 2 мкл кДНК. ПЦР в реальном времени проводят в аппарате для ПЦР в реальном времени Roche LC 480 (Roche). Каждый дуплекс испытывают при по меньшей мере двух независимых трансфекциях, и каждую трансфекцию анализируют двукратно, если не указано иное.

Для того, чтобы вычислить относительное кратное изменение, данные в реальном времени анализируют с использованием метода $\Delta\Delta Ct$ и нормализуют к анализам, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или мнимотрансфицированными клетками. IC_{50} вычисляют с использованием 4-параметрической модели соответствия с использованием XLFit и нормализуют к клеткам, трансфицированным AD-1955, или наивным клеткам в одном и том же интервале доз или к их собственной наименьшей дозе. IC_{50} вычисляют для каждой отдельной трансфекции, а также в комбинации, где одна IC_{50} соответствует данным из обеих трансфекций.

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

Пример 2. Синтез РНК и отжиг дуплексов

1. Синтез олигонуклеотидов

Все олигонуклеотиды синтезируют в синтезаторе АКТАoligopilot или синтезаторе ABI 394. Для синтеза олигонуклеотидов используют, если не указано иное, коммерчески доступный твердый носитель из пористого стекла с определенным размером пор (dT-CPG, 500Å, Prime Synthesis) и фосфорамидиты РНК со стандартными защитными группами 5'-O-диметокситритил-N6-бензоил-2'-трет-бутилдиметилсилиладенозин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5'-O-диметокситритил-N4-ацетил-2'-трет-бутилдиметилсилилцитидин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит, 5'-O-диметокситритил-N2-изобутирил-2'-трет-бутилдиметилсилилгуанозин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-цианоэтилфосфорамидит и 5'-O-диметокситритил-2'-трет-бутилдиметилсилилуридин-3'-O-N,N'-диизопропил-2-

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

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

Конъюгации выбранного лиганда с нужным положением, например, 5'-концом последовательности достигают, присоединяя соответствующий фосфорамидит к растущей цепи в стандартных условиях фосфорамидитного сочетания, если не указано иное. На

протяжении 15 мин сочетание 0,1 М раствора фосфорамидита в безводном CH_3CN в присутствии активатора 5-(этилтио)-1Н-тетразола связывает его с олигонуклеотидом. Окисление интернуклеозидного фосфита до фосфата осуществляют с использованием стандартной иодной воды, как сообщается в (1), или путем обработки смесью трет-бутилгидроксипероксид/ацетонитрил/вода (10:87:3) с 10-мин временем выдержки для окисления конъюгированного олигонуклеотида. Фосфоротиоат вводят окислением фосфита до Фосфоротиоата с использованием реагента переносчика серы, такого как DDTT (закупают у AM Chemicals), PADS и/или реагента Бокажа. Холестеринфосфорамидит синтезируют на фирме и используют в концентрации 0,1 М в дихлорметане. Время сочетания для холестеринфосфорамидита составляет 16 минут.

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

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

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

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

4. Анализ

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

5. Очистка ВЭЖХ

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

6. Получение миРНК

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

Таблица 2.

Модифицированный дуплекс ANGPTL3

Дуплекс ID	S ID	Смысловая цепь (S)	AS ID	Антисмысловая цепь (AS)	% мРНК оставшейся конц. мИРНК			IC50 (нМ)
					1 нМ	0.1 нМ	0.01 нМ	
D1000	S1000	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1000	AfUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.1	0.47	0.006
D1001	S1001	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1001	aUfsgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.10	0.49	0.0065
D1002	S1002	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1002	aUfgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.10	0.46	0.0068
D1003	S1003	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1003	aUfgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfsuAfcAfusGfsa	0.05	0.12	0.56	0.0073
D1004	S1004	aUGuaACccAGagUAuuCCasu	AS1004	AUggAAuaCUcuUGguUAcaUsGsa	0.07	0.13	0.44	0.008
D1005	S1005	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1005	aUfgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfsuAfcAfusGfsa	0.06	0.11	0.53	0.0093
D1006	S1006	AfuGfuAfAfccAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1006	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfGfuuAfcAfusGfsa	0.05	0.16	0.55	0.0095
D1007	S1007	AfuGfuAfAfCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1007	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfguuAfcAfusGfsa	0.05	0.14	0.48	0.0098
D1008	S1008	auguaaccaadGadGudAudAccGasu	AS1008	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.11	0.33	0.010
D1009	S1009	UfgGfGfAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfAfAfgsAf	AS1009	uCfuugGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.03	0.14	0.56	0.0101
D1010	S1010	UfgGfgauUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1010	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.03	0.14	0.65	0.0101
D1011	S1011	aUfGfuAfAfccAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1011	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfGfuuAfcUfsgsa	0.06	0.10	0.55	0.011
D1012	S1012	UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaaacCfaAfgsAf	AS1012	uCfuUfgGfUfuCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.13	0.54	0.0114
D1013	S1013	auguaaccaadGadGudAudAccGasu	AS1013	aUfgGfaAfuAfcUfcUfugdGudTadCadTsgsa	0.11	0.19	0.49	0.011
D1014	S1014	AfuGfuAaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1014	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.16	0.59	0.013
D1015	S1015	AfuguAfacAfaGfdAGfdTAdTudCcdAsu	AS1015	dAUdGgdAadTAfdCUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.15	0.51	0.013
D1016	S1016	auGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1016	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfUfsGfsa	0.05	0.14	0.64	0.013
D1017	S1017	UfGfggAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1017	uCfuUfgGfuuAfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.41	0.74	0.0133
D1018	S1018	AfuguAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1018	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.14	0.61	0.014
D1019	S1019	AfuGfuAfacAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1019	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.02	0.2	0.7	0.014
D1020	S1020	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1020	asUfsgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.04	0.16	0.67	0.0156
D1021	S1021	aUfguAfAfccAfAfgagUfaUfuCfasUf	AS1021	aUfGfgAfaUfaCfUfcuuGfGfuuAfcUfsgsa	0.11	0.24	0.64	0.016

D1022	S1022	dTdGgdAdTuudCdAugdTdAacdCdAagsdA	AS1022	udCdTugdGdTuadCdAugdAdAaudCdCcasdTsc	0.08	0.27	0.64	0.0161
D1023	S1023	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1023	aUfgsGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.19	0.63	0.0163
D1024	S1024	UfgGfgAfuUfuCfAfUfguaAfcCfaAfgsAf	AS1024	uCfuUfgGfuUfaAfcfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.05	0.25	0.69	0.0164
D1025	S1025	UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1025	uCfuUfgGfuuaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.18	0.75	0.0166
D1026	S1026	UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1026	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.19	0.66	0.0178
D1027	S1027	UfgGfgAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1027	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.19	0.69	0.018
D1028	S1028	dAdTgudAdAccdAdAgadGdTaudTdCcasdT	AS1028	adTdGgadAdTacdTdcuudGdGuudAdCausdGsa	0.15	0.29	0.72	0.018
D1029	S1029	AdTgdTAdACdCAdAGdAGdTAdTudCCdAsU	AS1029	dAuDGgdAAdTAdCUdCUdTGdGUdTAdCAdTsGsdA	0.1	0.27	0.61	0.018
D1030	S1030	UfgGfGfAfuuuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1030	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuuccCfasUfsc	0.04	0.21	0.64	0.0187
D1031	S1031	AfuGfuAfaFccAfAfGfAfGfuAfuuccAfsu	AS1031	AfUfGfGfAfAfuAfcUfcUfUfuGfGfuAfcAfusGfsa	0.06	0.15	0.62	0.019
D1032	S1032	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1032	asUfgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfsuAfcAfusGfsa	0.09	0.34	0.78	0.021
D1033	S1033	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaaacCfaAfgsAf	AS1033	uCfuUfgGfUfUfacaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.06	0.26	0.57	0.0212
D1034	S1034	AfuGfuAfaFccAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1034	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfGfuAfcAfusGfsa	0.11	0.39	0.82	0.0216
D1035	S1035	UfgGfgAfuuuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1035	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.04	0.16	0.56	0.0222
D1036	S1036	UfgGfGfAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1036	uCfuugGfuUfaCfaUfgAfaAfuuccCfasUfsc	0.06	0.31	0.78	0.0234
D1037	S1037	UfgGfGfAfuUfuCfAfUfgUfaAfcCfaAfgsAf	AS1037	uCfuUfgGfuUfaCfaugAfaAfuuccCfasUfsc	0.03	0.14	0.62	0.0235
D1038	S1038	UfGfggAfUfuuCfAfugUfaFacCfaAfgsAf	AS1038	uCfUfugGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.39	0.78	0.0239
D1039	S1039	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1039	aUfgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.14	0.59	0.025
D1040	S1040	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfccasUf	AS1040	aUfGfGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.13	0.56	0.025
D1041	S1041	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1041	asUfgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.27	0.79	0.0252
D1042	S1042	UfgGfgAfuuuCfAfUfgUfAfAfcCfaAfgsAf	AS1042	uCfuUfgGfuuaCfaugAfaAfuCfcCfasUfsc	0.05	0.27	0.67	0.0259
D1043	S1043	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuauUfcCfasUf	AS1043	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.02	0.16	0.63	0.027
D1044	S1044	AfsuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuucCfasUf	AS1044	asUfgGfAfAfuAfcUfcuuGfgUfsuAfcAfusGfsa	0.06	0.30	0.81	0.0271
D1045	S1045	aUfguAfAfccAfAfgaGfgfauUfcCfasUf	AS1045	aUfGfgaAfUfacUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.29	0.8	0.028
D1046	S1046	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaguAfuUfcCfasUf	AS1046	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.03	0.15	0.59	0.030
D1047	S1047	UfgGfGfAfuUfuCfaUfgUfAfAfcCfaAfgsAf	AS1047	uCfuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfuuccCfasUfsc	0.08	0.44	0.83	0.0324
D1048	S1048	AfuGfuAfaCfcAfAfGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1048	aUfgGfaAfuAfcUfcuuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.23	0.67	0.036
D1049	S1049	AfuGfuAfaFccAfAfGfAfGfuAfuuccAfsu	AS1049	AfUfGfGfAfAfuAfcUfcUfUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.23	0.73	0.037

D1050	S1050	UfgGfgAfuuuCfaUfgUfaAfcCfAfAfgsAf	AS1050	uCfuugGfuUfaCfaUfgAfAfAfufCfcCfasUfsc	0.06	0.29	0.78	0.0372
D1051	S1051	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1051	aUfgGfaAfudAccTcdTudGgdTuAfcAfusgsa	0.12	0.41	0.86	0.040
D1052	S1052	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTUdCcdAsu	AS1052	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.22	0.72	0.042
D1053	S1053	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTUdCcdAsu	AS1053	dAUdGGdAAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.31	0.69	0.044
D1054	S1054	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGdTafuUfcdCdAsUf	AS1054	adTdGGfaAfudAdCUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.75	0.047
D1055	S1055	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTUdCcdAsu	AS1055	dAUdGGdAadTafUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.26	0.7	0.049
D1056	S1056	AuGuAaCcAaGaGuAuUcCasU	AS1056	aUgGaAuAcUcUuGgUuAcAusGsa	0.08	0.24	0.65	0.050
D1057	S1057	AfuguAfaccAfaGfaGfuauUfccasUf	AS1057	aUfGfGfaAfUfAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.42	0.62	0.051
D1058	S1058	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1058	aUfgGfaAfudAccTcdTudGgdTuAfcAfusGfsa	0.12	0.36	0.86	0.053
D1059	S1059	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTUdCcdAsu	AS1059	dAUdGGdAadTafCUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.27	0.7	0.054
D1060	S1060	adTgudAdAccdAdAgagdTadTudCcasdT	AS1060	adTdGgdAadTadCdTdcuudGdGuudAdCadTsgsa	0.11	0.37	0.66	0.056
D1061	S1061	AfuGfuAfaCfcAfaGfdAdGuAfuUfcdCdAsUf	AS1061	adTdGGfaAfuAfdCdTcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.31	0.77	0.059
D1062	S1062	AfuguAfaccAfaGfdAGfdTAdTUdCcdAsu	AS1062	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.27	0.65	0.059
D1063	S1063	adTdGuadAdCccdAdGagdTdaudCdCasu	AS1063	dAdTggdAdAuadCdTcdTdgudTdadTsdGsa	0.12	0.44	0.82	0.064
D1064	S1064	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfdTadUfcdCdAsUf	AS1064	adTdGGfaAfdTadUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.32	0.83	0.064
D1065	S1065	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTUdCcdAsu	AS1065	dAUdGgdAadTafUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.34	0.72	0.066
D1066	S1066	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfdAdTUfcdCdAsUf	AS1066	adTdGGfadAdTafUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.33	0.72	0.067
D1067	S1067	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTUdCcdAsu	AS1067	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.37	0.62	0.070
D1068	S1068	AfuguAfaccAfaGfaGfdTAdTUdCcdAsu	AS1068	dAUdGGdAAuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.33	0.64	0.072
D1069	S1069	aUfGfuaAfCfccAfGfagUfAfuUfcCfasu	AS1069	AfUfggAfAfuaCfUfcUfGfgUfAfcaUfsGfsa	0.14	0.43	0.73	0.074
D1070	S1070	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1070	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.42	0.94	0.075
D1071	S1071	UfgGfgAfuuuCfaUfgUfaAfcCfAfAfgsAf	AS1071	uCfuUfgGfuUfaCfaUfgAfAfAfufCfcCfasUfsc	0.14	0.28	0.83	0.0797
D1072	S1072	AfuGfuAfaCfcAfaGfAfGfuauUfcCfasUf	AS1072	aUfgGfaAfUfAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.26	0.8	0.082
D1073	S1073	AfuGfuAfaCfcAfaGfadGdTadTUfCfcfasUf	AS1073	aUfgGfadAdTadCUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.41	0.73	0.083
D1074	S1074	AfUfguAfAfccAfAfgaGfUfauUfcCfasUf	AS1074	aUfGfgaAfUfcaUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.44	0.75	0.086
D1075	S1075	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1075	aUfgGfdAdAdTadUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.41	0.72	0.088
D1076	S1076	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfdAdTdTdCCfasUf	AS1076	aUfgdGdAdAdTafUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.45	0.86	0.088

D1077	S1077	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1077	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.46	0.95	0.092
D1078	S1078	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1078	dAUdGGdAadTAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.32	0.76	0.093
D1079	S1079	AfuguAfacAfaGfaGfdTadTudCcdAsu	AS1079	dAudGgdAadTAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.38	0.76	0.095
D1080	S1080	AfuGfuAfaCfcAfaGfAfGfuAfuUfcCfasUf	AS1080	aUfgGfAfAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.42	0.86	0.099
D1081	S1081	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfdCdCdAsdT	AS1081	dAdTdGdGaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.47	0.9	0.105
D1082	S1082	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1082	aUfgGfaAfuACfudCUfudGGfudTAfcAfusgsa	0.12	0.44	0.83	0.106
D1083	S1083	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1083	adTdGGfaAfdTdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.34	0.74	0.109
D1084	S1084	AfuGfuAfAfcCfcAfaGfaGfuauUfcCfasUf	AS1084	aUfgGfaAfUfAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.93	0.117
D1085	S1085	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGfuauUfcCfasUf	AS1085	aUfgGfaAfUfAfcUfcUfuGfgUfuacAfusGfsa	0.07	0.42	0.78	0.120
D1086	S1086	aUfguAfAfccAfAfgaGfuAfuUfcCfasUf	AS1086	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfcUfsgsa	0.17	0.45	0.83	0.1197
D1087	S1087	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfUfAfuUfcCfasu	AS1087	AfUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.3	0.7	0.120
D1088	S1088	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1088	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.11	0.46	0.8	0.120
D1089	S1089	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfUfAfuUfcCfasUf	AS1089	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.49	0.85	0.122
D1090	S1090	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuauUfcCfasUf	AS1090	aUfgGfaAfUfAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.41	0.85	0.125
D1091	S1091	AfuguAfacAfaGfaGfdTadTudCcdAsu	AS1091	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.38	0.77	0.125
D1092	S1092	AfuGfuAfaCfcAfaGfAfGfuAfuUfcCfasu	AS1092	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.31	0.93	0.126
D1093	S1093	auGfuAfaCfcAfaGfAfGfuAfuUfcCfasUf	AS1093	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.33	0.9	0.135
D1094	S1094	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfUfAfuUfccasUf	AS1094	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.39	0.85	0.142
D1095	S1095	AfuGfuAfaCfcAfaGfAfGfuAfuUfcCfasUf	AS1095	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.39	0.76	0.146
D1096	S1096	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfUfAfuUfcCfasUf	AS1096	aUfgGfAfAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.38	0.85	0.147
D1097	S1097	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1097	aUfgGfAfAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfusGfsa	0.12	0.47	0.87	0.147
D1098	S1098	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1098	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.42	0.85	0.151
D1099	S1099	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1099	dAUdGGdAadTAfdCUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.41	0.85	0.152
D1100	S1100	AfuguAfacAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1100	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.48	0.72	0.152
D1101	S1101	AfuGfuAfaCfcAfaGfAfGfuAfuUfccasUf	AS1101	aUfgGfAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.38	0.94	0.158
D1102	S1102	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1102	aUfgGfaAfuAfdCuCfdTuGfdGuUfacAfusGfsa	0.21	0.45	0.89	0.162
D1103	S1103	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1103	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfUfAfcAfusGfsa	0.14	0.49	0.95	0.163

D1104	S1104	AfuGfuAfacAfaGfaGfUfAfuUfcCfasUf	AS1104	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.36	0.92	0.163
D1105	S1105	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1105	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.1	0.45	0.84	0.167
D1106	S1106	AfuGfuAaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1106	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.43	0.91	0.170
D1107	S1107	AfuGfuAfacAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1107	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.46	1	0.171
D1108	S1108	AfuguAfacAfaGfaGfdTadTudCcdAsu	AS1108	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.39	0.71	0.176
D1109	S1109	AfuGfUfAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1109	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuacAfusGfsa	0.1	0.43	0.9	0.180
D1110	S1110	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1110	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.42	0.88	0.182
D1111	S1111	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1111	dAUdGGdAAuAfcUfcUfuGfGfUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.49	0.79	0.183
D1112	S1112	AfuGfUfAfacAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1112	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfusGfsa	0.14	0.48	0.85	0.195
D1113	S1113	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1113	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.41	0.85	0.201
D1114	S1114	auGfuAfaCfcAfaGfaGfUfAfuUfcCfasUf	AS1114	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfuUfsGfsa	0.05	0.44	0.94	0.201
D1115	S1115	AfuguAfaCfcAfaGfaGfUfAfuUfcCfasUf	AS1115	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.41	0.96	0.204
D1116	S1116	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1116	adTdGGfadAdTAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.47	0.79	0.208
D1117	S1117	AfuGfuAaCfcAfaGfaGfUfAfuUfcCfasUf	AS1117	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.42	0.92	0.224
D1118	S1118	auguaaccaagaguauuccasu	AS1118	AfUfGfGfAfaUfAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfuUfsGfsa	0.19	0.5	0.87	0.303
D1119	S1119	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1119	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.55	0.89	
D1120	S1120	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1120	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.63	0.72	
D1121	S1121	AfuGfuAfacAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1121	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.61	0.91	
D1122	S1122	AfUfGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1122	aUfGfGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.54	0.95	
D1123	S1123	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1123	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfuUfsGfsa	0.13	0.61	0.97	
D1124	S1124	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1124	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.56	0.94	
D1125	S1125	AfuGfuAfaCfaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1125	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.21	0.74	0.95	
D1126	S1126	AfUfGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuucCfasUf	AS1126	aUfgGfAfaAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.2	0.69	0.91	
D1127	S1127	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1127	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfguuAfcAfusGfsa	0.17	0.7	0.96	
D1128	S1128	AfUfGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1128	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.62	0.85	
D1129	S1129	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1129	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.23	0.76	0.98	
D1130	S1130	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1130	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.21	0.64	0.9	

D1131	S1131	AfuGfuAfaCfcAaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1131	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuUfgGfuUfcAfcAfcGfsa	0.17	0.7	1.01	
D1132	S1132	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1132	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfcGfsa	0.17	0.58	0.87	
D1133	S1133	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1133	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.33	0.89	1.05	
D1134	S1134	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1134	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.16	0.64	0.96	
D1135	S1135	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1135	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfcGfsa	0.12	0.53	0.96	
D1136	S1136	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1136	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.16	0.58	0.98	
D1137	S1137	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1137	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.16	0.6	0.91	
D1138	S1138	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1138	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.1	0.54	0.91	
D1139	S1139	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1139	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.24	0.68	0.98	
D1140	S1140	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1140	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfcGfsa	0.13	0.75	0.9	
D1141	S1141	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1141	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.15	0.52	1.05	
D1142	S1142	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1142	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfcGfsa	0.16	0.66	0.89	
D1143	S1143	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1143	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.12	0.51	0.89	
D1144	S1144	AfuGfuAfaCfcAaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1144	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.25	0.71	0.95	
D1145	S1145	AfuGfuAfaCfcAaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1145	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfcGfsa	0.17	0.74	0.98	
D1146	S1146	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1146	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.11	0.51	0.86	
D1147	S1147	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1147	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.1	0.52	0.83	
D1148	S1148	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1148	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.14	0.63	0.98	
D1149	S1149	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1149	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.13	0.58	0.88	
D1150	S1150	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1150	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.15	0.62	0.94	
D1151	S1151	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1151	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.18	0.73	0.94	
D1152	S1152	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1152	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuacAfcGfsa	0.13	0.53	0.97	
D1153	S1153	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasUf	AS1153	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfcGfsa	0.13	0.53	0.98	
D1154	S1154	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfcGfsa	AS1154	uCuUfgGfuUfaCfaUfgUfaAfuCfcCfasUfsc	0.09	0.5	0.78	
D1155	S1155	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfcGfsa	AS1155	uCuUfgGfuUfaCfaUfgUfaAfuCfcCfasUfsc	0.13	0.62	0.89	
D1156	S1156	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfcGfsa	AS1156	uCuUfgGfuUfaCfaUfgUfaAfuCfcCfasUfsc	0.12	0.65	0.85	
D1157	S1157	UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfcGfsa	AS1157	uCuUfgGfuUfaCfaUfgUfaAfuCfcCfasUfsc	0.11	0.54	0.85	

D1158	S1158	UfgGfgAfuuuCfaUfgUfAfaAfcCfaAfgsAf	AS1158	uCfuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.13	0.53	0.8	
D1159	S1159	UfgGfgAfUfuUfcAfuGfuAfaAfcAfaAfgsAf	AS1159	uCfuUfgGfuuaAfcAfuGaAfaUfcCfcasUfsc	0.59	0.89	0.81	
D1160	S1160	UfgGfgAfUfuUfcAfuGfuAfaAfcCfaAfgsAf	AS1160	uCfuUfgGfuuaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.16	0.72	0.9	
D1161	S1161	UfgGfgAfuUfuUfcAfuGfuAfaAfcCfaAfgsAf	AS1161	uCfuUfgGfuUfacaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	0.27	0.69	0.86	
D1162	S1162	AfuGfuAfaCfcaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1162	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.6	0.95	
D1163	S1163	AfuGfuAfaCfcaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1163	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.05	0.56	1.02	
D1164	S1164	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1164	aUfgGfaAfuacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.55	1	
D1165	S1165	AfuGfuAfaCfcaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1165	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.6	0.97	
D1166	S1166	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1166	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.59	0.91	
D1167	S1167	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1167	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.59	1	
D1168	S1168	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1168	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.57	0.94	
D1169	S1169	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1169	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.08	0.5	0.9	
D1170	S1170	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1170	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.06	0.53	0.91	
D1171	S1171	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1171	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.56	0.89	
D1172	S1172	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1172	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.59	0.98	
D1173	S1173	AfuGfuAfaCfcaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1173	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfusGfsa	0.2	0.65	1.03	
D1174	S1174	AfuGfuuaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1174	aUfgGfaauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.07	0.51	0.95	
D1175	S1175	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1175	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.2	0.53	0.76	
D1176	S1176	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1176	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.74	0.98	0.81	
D1177	S1177	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1177	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.43	0.64	0.88	
D1178	S1178	auguaaccAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1178	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.49	0.81	
D1179	S1179	AfuGfuuaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1179	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.22	0.65	0.73	
D1180	S1180	AfuguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1180	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.6	1.09	0.8	
D1181	S1181	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1181	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.3	0.78	0.78	
D1182	S1182	auguaaccAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1182	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.35	0.73	0.84	
D1183	S1183	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1183	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.6	0.94	
D1184	S1184	AfuGfuuaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1184	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.61	1.08	0.8	

D1185	S1185	auGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuuccasu	AS1185	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.52	0.72	
D1186	S1186	auguaaccaagaGfuAfuUfcCfasUf	AS1186	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.2	0.53	0.74	
D1187	S1187	AfuGfuAfaCfcaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1187	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.34	0.66	0.85	
D1188	S1188	AfuGfuAfacAfaGfaGfuAfuUfcCfAfsUf	AS1188	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.61	0.98	1.02	
D1189	S1189	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuuccasu	AS1189	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.3	0.73	0.85	
D1190	S1190	auguaaccaagaguauuccasu	AS1190	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.28	0.69	0.78	
D1191	S1191	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1191	aUfgGfaAfuAfcUfcUfugdGudTadCadTsgsa	0.33	0.88	0.64	
D1192	S1192	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1192	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.31	0.64	0.83	
D1193	S1193	AfuGfuAfaCfcaaGfaGfuAfuUfcCfAfsUf	AS1193	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.64	0.82	0.92	
D1194	S1194	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuauuccasu	AS1194	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.21	0.62	0.77	
D1195	S1195	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1195	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.7	0.95	
D1196	S1196	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfasUf	AS1196	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.71	0.65	
D1197	S1197	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfAfsUf	AS1197	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.64	0.82	0.93	
D1198	S1198	auguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfccasu	AS1198	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.65	0.72	
D1199	S1199	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuauUfcCfasUf	AS1199	aUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.52	0.64	
D1200	S1200	AfuGfuAfaCfcAfaGfaguAfuUfcCfAfsUf	AS1200	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.48	0.74	0.92	
D1201	S1201	auguAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1201	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.17	0.71	0.77	
D1202	S1202	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuauUfcCfAfsUf	AS1202	augGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.43	0.69	0.85	
D1203	S1203	auguaaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1203	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.61	0.76	
D1204	S1204	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1204	adTdGGfaAfudAdCUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.56	0.89	
D1205	S1205	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfdTdAdTdTcCfasUf	AS1205	aUfgGfdAdAdTdAcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.13	0.57	0.9	
D1206	S1206	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1206	adTdGdGdAAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.29	0.73	0.89	
D1207	S1207	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1207	adTdGGfaAfuAfdCdTcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.56	0.78	
D1208	S1208	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1208	aUfdGdGdAdAuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.22	0.67	0.89	
D1209	S1209	AfuguAfacAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1209	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.55	0.78	
D1210	S1210	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1210	aUfgdGdAdAdTAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.5	0.84	
D1211	S1211	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1211	aUfgGfadAdTdAdCUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.14	0.59	0.72	

D1212	S1212	auguaaccaaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1212	aUfgGfaAfuAfcUfcUfugdGudTadCadTsgsa	0.21	0.74	0.77	
D1213	S1213	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1213	adTdGdGdAAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.15	0.53	0.91	
D1214	S1214	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1214	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.12	0.71	0.87	
D1215	S1215	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1215	aUfdGdGdAdAuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.67	0.97	
D1216	S1216	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1216	aUfgGfaAfuacucuuggUfuAfcAfusgsa	0.36	0.87	1.07	
D1217	S1217	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1217	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.37	0.73	1.03	
D1218	S1218	AfUfguAfAfccAfAfgaGfuUfuUfcCfasUf	AS1218	aUfGfgaAfUfacUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.23	0.42	0.84	
D1219	S1219	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1219	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.43	0.71	1.03	
D1220	S1220	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1220	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.37	0.63	0.99	
D1221	S1221	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1221	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.29	0.84	0.88	
D1222	S1222	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1222	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.31	0.8	0.99	
D1223	S1223	auGfuAfAfccAfAfgaGfuUfuUfcCfasUf	AS1223	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusgsa	0.09	0.52	0.82	
D1224	S1224	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1224	aUfgGfaAfuadCudCudTgdGuuAfcAfusgsa	0.22	0.79	1	
D1225	S1225	auGfuaAfccAfagAfguAfuUfcCfasUf	AS1225	aUfGfgAfAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.31	0.76	0.84	
D1226	S1226	AfuGfuAfaccaagaguAfuUfcCfasUf	AS1226	aUfgGfaAfuadCUfcdTUfgdGuuAfcAfusgsa	0.26	0.64	0.87	
D1227	S1227	augUfaacCfaagAfguaUfuccAfsu	AS1227	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.33	0.79	0.81	
D1228	S1228	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1228	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.464	0.932	0.978	
D1229	S1229	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1229	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.453	1.047	1.178	
D1230	S1230	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1230	aUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.831	0.967	1.151	
D1231	S1231	auGfuAfAfcCfaAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1231	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.09	0.5	1.07	
D1232	S1232	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1232	AfUfgGfaAfuAfcUfcUfuggUfuAfcAfusGfsa	0.11	0.54	1.1	
D1233	S1233	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasu	AS1233	AfUfggaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.61	0.74	
D1234	S1234	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1234	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAf	0.22	0.61	0.98	
D1235	S1235	aUfgUfaAfcCfaAfgAfgUfaUfuCfcAfsu	AS1235	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAf	0.27	0.69	0.92	
D1236	S1236	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1236	AfuGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsAf	0.54	1.08	0.8	
D1237	S1237	augUfaAfccaAfgAfguaUfuCfcasu	AS1237	AfUfGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsa	0.29	0.61	0.79	
D1238	S1238	AfugUfaAfccaAfgAfguaUfuCfcasu	AS1238	AfUfGfgAfaUfaCfuCfuUfgGfuUfaCfaUfsgsa	0.31	0.6	0.88	

D1239	S1239	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1239	dAUdGGdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.2	0.67	0.85	
D1240	S1240	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1240	dAUdGgdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.23	0.58	0.68	
D1241	S1241	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1241	dAudGgdAauAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.25	0.65	0.78	
D1242	S1242	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1242	dAUdGgdAadTAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.18	0.64	0.84	
D1243	S1243	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1243	dAUdGGdAAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.19	0.72	0.87	
D1244	S1244	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1244	dAUdGgdAadTAfdCUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.55	0.8	
D1245	S1245	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1245	dAUdGGdAAuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.22	0.51	0.9	
D1246	S1246	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1246	dAudGgdAadTAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.27	0.78	0.66	
D1247	S1247	AfuGfuAfaCfcAfaGfaGfuAfuUfcCfasUf	AS1247	dAdTdGdGaAfuAfcUfcUfuGfgUfuAfcAfusGfsa	0.16	0.57	0.97	
D1248	S1248	AfacaAfuguUfcUfuGfdCUdCudAudAsa	AS1248	dTUdAudAgdAGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.09	0.36	0.0047
D1249	S1249	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1249	UfUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.10	0.47	0.005
D1250	S1250	AfaCfaGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1250	uUfauaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.55	0.005
D1251	S1251	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1251	uUfauaGfAfGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.49	0.006
D1252	S1252	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1252	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.006
D1253	S1253	AfaCfaGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1253	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.12	0.43	0.006
D1254	S1254	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1254	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.39	0.006
D1255	S1255	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1255	UfUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.48	0.007
D1256	S1256	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1256	UfUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.14	0.40	0.007
D1257	S1257	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1257	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.07	0.12	0.40	0.007
D1258	S1258	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1258	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.13	0.41	0.007
D1259	S1259	AfaCfAfGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1259	uUfaUfaGfAfGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.11	0.35	0.008
D1260	S1260	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1260	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.40	0.008
D1261	S1261	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1261	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.42	0.008
D1262	S1262	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1262	uUfaUfaGfAfGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.37	0.008
D1263	S1263	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1263	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.008
D1264	S1264	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1264	uUfAfUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.12	0.50	0.008
D1265	S1265	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1265	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.12	0.13	0.48	0.009

D1266	S1266	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1266	uUfauaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.51	0.009
D1267	S1267	AfacaAfuguUfcUfuGfdCudCudAudAsa	AS1267	dTudAudAgdAGfcAfaGfaAfcAfcAfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.48	0.0088
D1268	S1268	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcucUfaUfasAf	AS1268	uUfaUfaGfAfGfcAfagaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.09	0.35	0.009
D1269	S1269	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1269	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.009
D1270	S1270	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1270	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.49	0.009
D1271	S1271	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfcucUfaUfasAf	AS1271	uUfaUfaGfAfGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.06	0.10	0.36	0.009
D1272	S1272	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1272	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.009
D1273	S1273	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1273	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsUf	0.06	0.13	0.51	0.009
D1274	S1274	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1274	uUfaUfAfGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.46	0.010
D1275	S1275	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1275	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.010
D1276	S1276	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1276	uUfaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.47	0.010
D1277	S1277	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1277	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.50	0.010
D1278	S1278	AfaCfaGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1278	uUfaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.43	0.010
D1279	S1279	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	AS1279	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT				0.010
D1280	S1280	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1280	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.06	0.14	0.45	0.010
D1281	S1281	AfaCfAfGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1281	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.46	0.011
D1282	S1282	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1282	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.55	0.011
D1283	S1283	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcucUfaUfasAf	AS1283	uUfaUfaGfAfGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.12	0.45	0.011
D1284	S1284	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1284	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.48	0.011
D1285	S1285	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcucUfaUfasAf	AS1285	uUfaUfaGfAfGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.06	0.11	0.40	0.011
D1286	S1286	AfaCfAfGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1286	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.16	0.47	0.011
D1287	S1287	AfaCfaGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1287	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.19	0.46	0.012
D1288	S1288	AfaCfaGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1288	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.17	0.46	0.012
D1289	S1289	AfaCfaGfuGfuUfcUfUfGfcucUfaUfasAf	AS1289	uUfaUfaGfAfGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.05	0.09	0.31	0.012
D1290	S1290	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1290	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.06	0.16	0.49	0.013
D1291	S1291	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1291	uUfaUfaGfaGfcAfagaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.06	0.11	0.32	0.013
D1292	S1292	AfaCfAfGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1292	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.44	0.013

D1293	S1293	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1293	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.39	0.013
D1294	S1294	AfaCfAfGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1294	uUfaUfAfGfaGfcAfaGfaAfcAfcugUfusUfsu	0.07	0.18	0.41	0.014
D1295	S1295	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1295	uUfaUfAfGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.47	0.014
D1296	S1296	adAdCagdTdGuudCdTugdCdTcudAdTasa	AS1296	dTdTaudAdGagdCdAagdAdAcadCdTgudTsdTsu	0.12	0.21	0.68	0.0146
D1297	S1297	AfacaGfUfGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1297	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.06	0.15	0.50	0.016
D1298	S1298	AfaCfaGfUfGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1298	uUfAfUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.50	0.016
D1299	S1299	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1299	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.16	0.50	0.018
D1300	S1300	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1300	uUfAfUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.43	0.020
D1301	S1301	AfaCfaGfUfGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1301	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcacUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.45	0.021
D1302	S1302	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1302	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.49	0.021
D1303	S1303	AfAfCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1303	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.07	0.24	0.51	0.022
D1304	S1304	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1304	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.09	0.27	0.47	0.033
D1305	S1305	aadCdAgudGdTucdTdTgcdTdCuadTdAsa	AS1305	udTadTdAgadGdCaadGdAacdAdCugdTdTusu	0.19	0.36	0.86	0.045
D1306	S1306	AfacaGfuguUfcUfuGfdCUdCUdAudAsa	AS1306	dTUdAUdAGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.22	0.61	
D1307	S1307	AfacaGfuguUfcUfdTGfdCUdCUdAudAsa	AS1307	dTUdAUdAGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.39	0.84	
D1308	S1308	AfacaGfuguUfcUfuGfdCUdCUdAudAsa	AS1308	dTUdAUdAgdAGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.13	0.48	
D1309	S1309	AfacaGfuguUfcUfdTGfdCUdCUdAudAsa	AS1309	dTUdAUdAgdAGfdCAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.13	0.58	
D1310	S1310	AfacaAfuguUfcUfdTGfdCUdCUdAudAsa	AS1310	dTUdAUdAgdAGfdCAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.55	
D1311	S1311	AfaCfaAfugfuUfcUfuGfcUfcUfdAdTdAsdA	AS1311	dTdTdAdTaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.30	0.66	
D1312	S1312	AfacaGfuguUfcUfuGfdCUdCUdAudAsa	AS1312	dTUdAUdAgdAGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.13	0.48	
D1313	S1313	AfAfCfaGfuGfuucUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1313	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.14	0.38	0.74	
D1314	S1314	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1314	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.19	0.54	
D1315	S1315	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1315	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.55	
D1316	S1316	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1316	uUfAfUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.16	0.53	
D1317	S1317	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1317	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.16	0.55	
D1318	S1318	AfAfCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1318	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.10	0.32	0.61	
D1319	S1319	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1319	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.08	0.16	0.53	

D1320	S1320	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1320	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.08	0.16	0.61	
D1321	S1321	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1321	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.14	0.58	
D1322	S1322	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1322	uUfaUfaGfaGfcAfAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.15	0.49	0.84	
D1323	S1323	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1323	uUfaUfAfGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.07	0.20	0.62	
D1324	S1324	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1324	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.08	0.25	0.78	
D1325	S1325	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1325	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.08	0.18	0.80	
D1326	S1326	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1326	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.21	0.66	
D1327	S1327	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1327	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.31	0.70	
D1328	S1328	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1328	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.07	0.15	0.55	
D1329	S1329	AfaCfAfGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1329	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.71	
D1330	S1330	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1330	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.27	0.76	
D1331	S1331	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1331	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.21	0.65	
D1332	S1332	AfAfCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1332	uUfaUfAfGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.07	0.17	0.53	
D1333	S1333	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1333	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.25	0.73	
D1334	S1334	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1334	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.54	
D1335	S1335	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1335	uUfaUfaGfaGfcAfAfGfaAfcAfcUfgUfususu	0.14	0.38	0.57	
D1336	S1336	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1336	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.50	0.96	
D1337	S1337	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1337	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.54	
D1338	S1338	AfAfCfaGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1338	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.08	0.20	0.69	
D1339	S1339	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1339	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.55	
D1340	S1340	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1340	uUfaUfAfGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.57	
D1341	S1341	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1341	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfususu	0.08	0.22	0.63	
D1342	S1342	AfAfCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1342	uUfaUfaGfaGfcAfAfGfaAfcAfcUfguusUfsu	0.21	0.56	0.86	
D1343	S1343	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1343	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.37	0.73	
D1344	S1344	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1344	uUfaUfaGfaGfcaaGfAfAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.20	0.66	
D1345	S1345	AfaCfAfGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1345	uUfaUfaGfaGfcAfAfGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.12	0.34	0.73	
D1346	S1346	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1346	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.42	0.90	

D1347	S1347	AfaCfaGfuGfUfUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1347	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfgUfusUfsUf	0.17	0.43	0.85	
D1348	S1348	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1348	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.21	0.58	
D1349	S1349	AfaCfaGfuGfUfUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1349	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfgUfusUfsu	0.21	0.39	0.88	
D1350	S1350	AfaCfaguGfuUfcUfUfGfcUfcUfaUfasAf	AS1350	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.52	
D1351	S1351	AfaCfaGfuGfUfUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1351	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.21	0.58	
D1352	S1352	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1352	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.18	0.49	0.84	
D1353	S1353	AfaCfaGfuGfUfUfcUfuGfcucUfaUfasAf	AS1353	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.25	0.68	
D1354	S1354	AfacaGfuGfuUfcUfUfGfcUfcUfaUfasAf	AS1354	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.52	
D1355	S1355	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1355	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.26	0.63	
D1356	S1356	AfaCfaGfuGfUfUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1356	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfgUfusUfsu	0.16	0.33	0.79	
D1357	S1357	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1357	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.09	0.19	0.51	
D1358	S1358	AfaCfaGfuGfUfUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1358	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfgUfusUfsu	0.22	0.48	0.71	
D1359	S1359	AfaCfaGfuGfuUfcUfUfGfcUfcUfaUfasAf	AS1359	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.10	0.17	0.61	
D1360	S1360	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1360	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.40	0.87	
D1361	S1361	AfaCfaGfuGfuUfcUfUfGfcUfcuaUfasAf	AS1361	uUfaUfaGfaGfcaaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.52	
D1362	S1362	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1362	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.10	0.28	0.81	
D1363	S1363	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1363	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.16	0.68	
D1364	S1364	AfaCfaGfuGfuUfcUfugcUfcUfaUfasAf	AS1364	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.26	0.67	
D1365	S1365	aacaguuucucucuaasa	AS1365	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.20	0.59	0.95	
D1366	S1366	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1366	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.53	
D1367	S1367	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1367	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsUf	0.08	0.16	0.53	
D1368	S1368	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1368	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.54	
D1369	S1369	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1369	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.23	0.56	0.89	
D1370	S1370	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1370	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.12	0.55	
D1371	S1371	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcuaUfasAf	AS1371	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.18	0.58	
D1372	S1372	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1372	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.15	0.56	
D1373	S1373	AfaCfaGfuGfuucUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1373	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.21	0.51	0.89	

D1374	S1374	AfacaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1374	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.21	0.64	
D1375	S1375	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1375	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.15	0.40	0.94	
D1376	S1376	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1376	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.40	0.96	
D1377	S1377	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1377	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.17	0.64	
D1378	S1378	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1378	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.18	0.50	0.97	
D1379	S1379	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1379	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.24	0.79	
D1380	S1380	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1380	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.14	0.58	
D1381	S1381	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1381	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.34	0.96	
D1382	S1382	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1382	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.18	0.69	
D1383	S1383	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1383	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.14	0.38	0.85	
D1384	S1384	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1384	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.16	0.54	
D1385	S1385	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1385	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.20	0.75	
D1386	S1386	aacaguguucUfuGfcUcUaudAsa	AS1386	uUfdAUdAGfaGfcAfaGfaadCadCudGdTdsusu	0.25	0.56	0.90	
D1387	S1387	AfaCfaguGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1387	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.70	
D1388	S1388	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1388	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.14	0.60	
D1389	S1389	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1389	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.19	0.62	
D1390	S1390	aaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1390	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.08	0.27	0.76	
D1391	S1391	aacaguguucdTudGcdTcdTadTasa	AS1391	uUfdAUdAGfaGfcAfaGfaadCadCudGudTtsusu	0.18	0.36	0.81	
D1392	S1392	AfacaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1392	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.55	
D1393	S1393	AfaCfaGfuguUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1393	uUfaUfagaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.15	0.57	
D1394	S1394	AfaCfaGfuGfuUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1394	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.26	0.68	1.06	
D1395	S1395	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1395	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.18	0.58	
D1396	S1396	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1396	uuuUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.27	0.73	
D1397	S1397	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1397	uUfadTdAdGdAGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.20	0.51	0.73	
D1398	S1398	AfacaGfuguUfcuuGfcUfcUfaUfasAf	AS1398	uUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.13	0.34	0.86	
D1399	S1399	dAcadGugudTcuudGcuudTausdA	AS1399	udTdAdTadGdAdGcdAdAdGadAdCdAcdTdTsdTsu	0.24	0.42	0.82	
D1400	S1400	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfdCdAdCdTaUfasAf	AS1400	uUfaUfdAdGdAdGdAfaGfaGfcAfcUfgUfusUfsu	0.49	0.85	0.78	

D1401	S1401	AfaCfaAfuGfuUfcUfudGdCdAdCUfaUfasAf	AS1401	uUfaUfadGdAdGdCAfaGfaGfcAfcAfgUfusUfsu	0.67	0.83	0.85	
D1402	S1402	aaCfAfguGfUfucUfUfgcUfCfuaUfAfsa	AS1402	uUfaUfAfgaGfCfaaGfAfacAfcUgUfUfsusu	0.18	0.47	0.80	
D1403	S1403	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcdAdCUfadTdAsAf	AS1403	udTdAUfadGdAGfcaAfaGfaGfcAfcAfgUfusUfsu	0.73	0.89	0.77	
D1404	S1404	aacAgugUucuUgcuCuauAsa	AS1404	uUaUAgaGCaAGaACaCuGUUsusu	0.12	0.39	0.79	
D1405	S1405	AacaGuguUcuUgcuUauasA	AS1405	uUAUaGAGcAAGaACaCUguUsUsu	0.12	0.37	0.77	
D1406	S1406	AfaCfaAfuGfuUfcUfudGdCAfcUfadTdAsAf	AS1406	udTdAUfaGfadGdCAfaGfaGfcAfcAfgUfusUfsu	0.59	0.93	0.89	
D1407	S1407	aACagUGuuCUugCUcuAUasa	AS1407	UUauAGagCAagAAcaCUguUsUsu	0.09	0.16	0.55	
D1408	S1408	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcAfdTdAdTdAsAf	AS1408	udTdAdTdAGfaGfcAfaGfaAfcAfcAfgUfusUfsu	0.22	0.64	0.86	
D1409	S1409	aaCAguGUucUUGcUCuaUAsa	AS1409	uUaUAgaGCaaGAacACugUUsusu	0.13	0.31	0.76	
D1410	S1410	AfaCfaAfuGfuUfcUfuGfcAfdCdTdAdTdAsAf	AS1410	udTdAdTdAdGaGfcAfaGfaGfcAfcAfgUfusUfsu	0.77	0.94	0.93	
D1411	S1411	aacAfgugUfucuUfgcuCfuaUfAfsa	AS1411	uUfaUfAfgAfcGfCfaAfcGfAfaCfAfcUgUfUfsusu	0.23	0.53	1.04	
D1412	S1412	aacdAgugdTucudTgcuCuauAsa	AS1412	udTadTdAgdAdGdCadAdGdAadCdAdCudGdTdTsusu	0.30	0.64	0.90	
D1413	S1413	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1413	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.09	0.19	0.63	
D1414	S1414	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1414	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaacAfcUfgUfusUfsu	0.11	0.28	0.66	
D1415	S1415	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasa	AS1415	UfUfaUfaGfagcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.06	0.13	0.53	
D1416	S1416	aacaguguucuugcucuauasa	AS1416	UfUfAfUfAfgGfAfcGfCfAfAfGfAfAfcAfcUfGfUfUfsusu	0.20	0.53	0.99	
D1417	S1417	AfaCfaGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfAfUfasa	AS1417	UfUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUfgUfusUfsu	0.07	0.17	0.53	
D1418	S1418	aAfCfagUfGfuuCfUfugCfUfcUfUfasa	AS1418	UfUfauAfGfagCfAfagAfAfcaCfUfUfUfsUfsu	0.08	0.20	0.70	
D1419	S1419	AfaCfAfGfuGfuUfcUfuGfcUfcUfaUfasAf	AS1419	uUfaUfaGfaGfcAfaGfaAfcAfcUgUfusUfsUf	0.08	0.20	0.70	

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

IC₅₀ для каждой модифицированной миРНК определяют на клетках Hep3В стандартной обратимой трансфекцией с использованием липофектамина RNAiMAX. Коротко, обратимую трансфекцию осуществляют, добавляя 5 мкл Opti-MEM к 5 мкл миРНК-дуплекса на лунку в 96-луночном планшете вместе с 10 мкл Opti-MEM плюс 0,5 мкл липофектамина RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad, CA, кат.№ 13778-150) и инкубируя при комнатной температуре в течение 15-20 минут. Затем после инкубации в каждую лунку добавляют 100 мкл полной среды для выращивания без антибиотиков, содержащей 12000-15000 клеток Hep3В. Клетки инкубируют в течение 24 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, затем лизируют и анализируют AroB и GAPDH мРНК с помощью bDNA (Quantigene). Анализируют семь различных концентраций миРНК, колеблющихся от 10 нМ до 0,6 пМ, для определения IC₅₀, и AroB/GAPDH для AroB-трансфицированных клеток нормализуют к клеткам, трансфицированным 10 нМ миРНК Luc.

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

Таблица 3.

Модифицированный дуплекс ANGPTL3

Дуплекс ID	Смысловая ID	Последовательность SS	AS ID	Последовательность AS	RNAimax, Нер3b		
					10нМ	0.1 нМ	0.025 нМ
D2000	S2000	UfcAfcAfaUfuAfaGfcUfcCfuUfcUfuUf	A2000	aAfaGfaAfgGfaGfcuuAfaUfuGfuGfasAfsc	0.036	0.274	0.233
D2001	S2001	UfuAfuUfgUfuCfCfUfcUfaGfuUfaUfuUf	A2001	aAfaUfaAfcUfaGfaggAfaCfaAfuAfasAfsa	0.044	0.278	0.247
D2002	S2002	GfcUfaUfgUfuAfgGfAfcGfaUfgUfaAfaAf	A2002	uUfuUfaCfaUfcGfucuAfaCfaUfaGfcsAfsa	0.062	0.474	0.449
D2003	S2003	GfgAfcAfuGfgUfCfUfuAfaAfgAfcUfuUf	A2003	aAfaGfuCfuUfuAfaGfcCfcAfuGfuCfcsCfsa	0.303	1.042	0.912
D2004	S2004	CfaAfaAfaCfuCfAfaAfcAfuAfuUfuGfaUf	A2004	aUfcAfaAfuAfuGfuugAfgUfuUfuUfgsAfsa	0.102	0.623	0.499
D2005	S2005	AfcCfaGfuGfaAfaUfcAfaAfgAfaGfaAf	A2005	uUfcUfuCfuUfuGfauuUfcAfcUfgGfusUfsu	0.124	0.901	0.756
D2006	S2006	CfaCfaAfuUfaAfgCfuCfcUfuCfuUfuUf	A2006	aAfaAfgAfaGfgAfgcuUfaAfuUfgUfgsAfsa	0.069	0.269	0.244
D2007	S2007	CfuAfuGfuUfaGfAfcGfuAfuAfaAfaAf	A2007	uUfuUfuAfcAfuCfugcUfaAfcAfuAfgsCfsa	0.052	0.622	0.589
D2008	S2008	UfcAfaCfaUfaUfUfUfgAfuCfaGfuCfuUf	A2008	aAfgAfcUfgAfuCfaaaUfaUfgUfuGfasGfsu	0.133	0.798	0.785
D2009	S2009	AfaCfuGfaGfaAfgAfaCfuAfcAfuAfuAf	A2009	uAfuAfuGfuAfgUfucuUfcUfcAfgUfusCfsc	0.097	0.671	0.528
D2010	S2010	AfcAfaUfuAfaGfCfUfcCfuUfcUfuUfuUf	A2010	aAfaAfaGfaAfgGfagcUfuAfaUfuGfusGfsa	0.145	0.308	0.293
D2011	S2011	CfuCfcAfgAfgCfCfaAfaUfcAfaGfaUf	A2011	aUfcUfuGfaUfuUfuggCfuCfuGfgAfgsAfsu	0.122	0.882	0.938
D2012	S2012	CfgAfuGfuAfaAfaAfuUfuUfaGfcCfaAf	A2012	uUfgGfcUfaAfaAfuuuUfuAfcAfuCfsgUfsc	0.102	0.843	0.733
D2013	S2013	GfuCfuUfaAfaGfAfcUfuUfuGfuCfcAfuAf	A2013	uAfuGfgAfcAfaAfgucUfuUfaAfgAfcCfsa	1.133	1.105	1.022
D2014	S2014	CfaAfcAfuAfuUfUfGfaUfcAfgUfcUfuUf	A2014	aAfaGfaCfuGfaUfcaaAfuAfuGfuUfgsAfsa	0.077	0.413	0.450
D2015	S2015	AfcUfgAfgAfaGfAfcUfaCfaUfaUfaAf	A2015	uUfaUfaUfgUfaGfuucUfuCfuCfaGfusUfsc	0.055	0.293	0.364
D2016	S2016	CfaAfgAfgCfaAfaAfaUfcAfaGfaUfuUf	A2016	aAfaUfcUfuGfaUfuuuGfgCfuCfuGfgsAfsa	0.080	0.650	0.499
D2017	S2017	GfaUfgUfaAfaAfaUfuUfuAfgCfcAfaUf	A2017	aUfuGfgCfuAfaAfauuUfuUfaCfaUfcsGfsu	0.076	0.605	0.579
D2018	S2018	UfcUfuAfaAfgAfcUfuUfgUfcCfaUfaAf	A2018	uUfaUfgGfaCfaAfaGfuCfuUfuAfaGfasCfsc	1.326	1.098	0.927
D2019	S2019	AfaCfaUfaUfuUfgAfuCfaGfuCfuUfuUf	A2019	aAfaAfgAfcUfgAfucaAfaUfaUfgUfusGfsa	0.047	0.560	0.477
D2020	S2020	CfuGfaGfaAfgAfaCfuAfcAfuAfuAfaAf	A2020	uUfuAfuAfuGfuAfguuCfuUfcUfcAfgsUfsu	0.066	0.690	0.681
D2021	S2021	AfaUfuAfaGfcUfcCfuUfcUfuUfuUfaUf	A2021	aUfaAfaAfaGfaAfggaGfcUfuAfaUfusGfsu	0.041	0.611	0.251
D2022	S2022	AfaAfuCfaAfgAfuUfuGfcUfaUfgUfuAf	A2022	uAfaCfaUfaGfcAfaaCfuUfgAfuUfusUfsg	0.053	0.555	0.516
D2023	S2023	UfuCfaGfuUfgGfGfAfcAfuGfgUfcUfuAf	A2023	uAfaGfaCfcAfuGfuuccCfaAfcUfgAfasGfsg	0.779	1.045	0.963

D2024	S2024	GfgGfcCfaAfaUfUfAfaUfgAfcAfuAfuUf	A2024	aAfuAfuGfuCfaUfuuaUfuUfgGfcCfcsUfsu	1.487	0.949	0.883
D2025	S2025	AfcAfuAfuUfuGfAfUfcAfgUfcUfuUfuUf	A2025	aAfaAfaGfaCfuGfaucAfaAfuAfuGfusUfsg	0.043	0.432	0.477
D2026	S2026	AfgAfaCfuAfcAfUfAfuAfaAfcUfaCfaAf	A2026	uUfgUfaGfuUfuAfuauGfuAfgUfuCfusUfsc	0.324	1.042	0.905
D2027	S2027	AfuUfaAfgCfuCfCfUfuCfuUfuUfuAfuUf	A2027	aAfuAfaAfaAfgAfggAfgCfuUfaAfusUfsg	0.042	0.283	0.224
D2028	S2028	AfgAfuUfuGfcUfAfUfgUfuAfgAfcGfaUf	A2028	aUfcGfuCfuAfaCfaaaGfcAfaAfuCfusUfsg	0.349	0.936	0.896
D2029	S2029	UfcAfgUfuGfgGfAfCfaUfgGfuCfuUfaAf	A2029	uUfaAfgAfcCfaUfgucCfcAfaCfuGfasAfsu	0.914	0.907	0.944
D2030	S2030	GfgCfcAfaAfuUfAfaAfuGfaCfaUfaUfuUf	A2030	aAfaUfaUfgUfcAfuuaAfuUfuGfgCfcsCfsu	0.047	0.353	0.326
D2031	S2031	CfaUfaUfuUfgAfUfCfaGfuCfuUfuUfuAf	A2031	uAfaAfaAfgAfcUfgauCfaAfaUfaUfsgUfsu	0.110	0.867	0.842
D2032	S2032	UfaCfaUfaUfaAfAfcUfaAfcAfaGfuCfaAf	A2032	uUfgAfcUfuGfuAfguuUfaUfaUfgUfasGfsu	0.200	0.699	0.656
D2033	S2033	UfuUfuAfuUfgUfUfCfcUfcUfaGfuUfaUf	A2033	aUfaAfcUfaGfaGfgaaCfaAfuAfaAfasAfsu	0.050	0.218	0.192
D2034	S2034	UfuGfcUfaUfgUfUfAfgAfcGfaUfgUfaAf	A2034	uUfaCfaUfcGfuCfuuaCfaUfaGfcAfasAfsu	0.096	0.792	0.640
D2035	S2035	CfaGfuUfgGfgAfCfaAfuGfgUfcUfuAfaAf	A2035	uUfuAfaGfaCfcAfuguCfcCfaAfcUfsgAfsa	0.127	0.936	0.890
D2036	S2036	AfaAfuUfaAfuGfAfCfaUfaUfuUfcAfaAf	A2036	uUfuGfaAfaUfaUfgucAfuUfaAfuUfusGfsg	0.061	0.683	0.668
D2037	S2037	GfaUfcAfgUfcUfUfUfuUfaUfgAfuCfuAf	A2037	uAfgAfuCfaUfaAfaaaGfaCfuGfaUfcsAfsa	0.157	1.010	0.723
D2038	S2038	AfcAfuAfuAfaAfCfUfaCfaAfgUfcAfaAf	A2038	uUfuGfaCfuUfgUfaguUfuAfuAfuGfusAfsu	0.047	0.532	0.525
D2039	S2039	UfuUfaUfuGfuUfCfCfuCfuAfgUfuAfuUf	A2039	aAfuAfaCfuAfgAfggaAfcAfaUfaAfasAfsa	0.031	0.505	0.238
D2040	S2040	UfgCfuAfuGfuUfAfGfaCfGfuAfuAfaAf	A2040	uUfuAfcAfuCfGufcuaAfcAfuAfgCfasAfsa	0.056	0.484	0.408
D2041	S2041	GfgGfaCfaUfgGfUfCfuUfaAfaGfaCfuUf	A2041	aAfgUfcUfuUfaAfgacCfaUfgUfcCfcsAfsa	0.570	0.999	0.994
D2042	S2042	UfgAfcAfuAfuUfUfCfaAfaAfaCfuCfaAf	A2042	uUfgAfgUfuUfuUfgaaAfuAfuGfuCfasUfsu	0.065	0.870	0.728
D2043	S2043	AfuCfaGfuCfuUfUfUfuAfuGfaUfcUfaUf	A2043	aUfaGfaUfcAfuAfaaaAfgAfcUfgAfusCfsa	0.048	0.362	0.282
D2044	S2044	CfaUfaUfaAfaCfUfAfcAfaGfuCfaAfaAf	A2044	uUfuUfgAfcUfuGfuagUfuUfaUfaUfsgUfsa	0.314	0.904	0.937
D2045	S2045	CfuUfgAfaCfuCfaAfcUfcAfaAfaCfuUf	A2045	aAfgUfuUfuGfaGfuugAfgUfuCfaAfgsUfsg	0.060	0.295	0.251
D2046	S2046	CfuAfcUfuCfaAfcAfaAfaAfgUfgAfaAf	A2046	uUfuCfaCfuUfuUfuguUfgAfaGfuAfgsAfsa	0.052	0.570	0.599
D2047	S2047	AfaGfaGfcAfaCfUfAfaCfuAfaCfuUfaAf	A2047	uUfaAfgUfuAfgUfuagUfuGfcUfcUfusCfsu	0.028	0.369	0.381
D2048	S2048	AfaAfcAfaGfaUfAfAfuAfgCfaUfcAfaAf	A2048	uUfuGfaUfgCfuAfuuaUfcUfuGfuUfusUfsu	0.039	0.227	0.204
D2049	S2049	GfcAfuAfgUfcAfAfAfuAfaAfaGfaAfaUf	A2049	aUfuUfcUfuUfuAfuuuGfaCfuAfuGfcsUfsg	0.032	0.437	0.422
D2050	S2050	AfuAfuAfaAfcUfAfcAfaAfgUfcAfaAfaAf	A2050	uUfuUfuGfaCfuUfguaGfuUfuAfuAfusGfsu	0.297	0.946	0.850

D2051	S2051	GfaAfcUfcAfaCfUfCfaAfaAfcUfuGfaAf	A2051	uUfcAfaGfuUfuUfgagUfuGfaGfuUfcsAfsa	0.179	0.929	0.884
D2052	S2052	UfaCfuUfcAfaCfAfAfaAfaGfuGfaAfaUf	A2052	aUfuUfcAfcUfuUfuugUfuGfaAfgUfasGfsa	0.091	0.536	0.524
D2053	S2053	AfgAfgCfaAfcUfAfAfcUfaAfcUfuAfaUf	A2053	aUfuAfaGfuUfaGfuuaGfuUfgCfuCfusUfsc	0.086	0.611	0.621
D2054	S2054	GfaUfaAfuAfgCfAfUfcAfaAfgAfcCfuUf	A2054	aAfgGfuCfuUfuGfaugCfuAfuUfaUfcsUfsu	0.058	0.676	0.591
D2055	S2055	CfaUfaGfuCfaAfAfUfaAfaAfgAfaAfuAf	A2055	uAfuUfuCfuUfuUfaauUfgAfcUfaUfcsUfsu	0.048	0.630	0.674
D2056	S2056	UfaUfaAfaCfuAfCfAfaGfuCfaAfaAfaUf	A2056	aUfuUfuUfgAfcUfuguAfgUfuUfaUfasUfsg	0.072	0.534	0.459
D2057	S2057	AfaCfuCfaAfcUfCfAfaAfaCfuUfgAfaAf	A2057	uUfuCfaAfgUfuUfugaGfuUfgAfgUfusCfsa	0.161	0.864	0.775
D2058	S2058	AfcUfuCfaAfcAfAfAfaAfgUfgAfaAfuAf	A2058	uAfuUfuCfaCfuUfuuuGfuUfgAfaGfusAfsa	0.198	0.969	0.865
D2059	S2059	GfaGfcAfaCfuAfAfCfuAfaCfuUfaAfuUf	A2059	aAfuUfaAfgUfuAfguuAfgUfuGfcUfcsUfsu	0.031	0.253	0.210
D2060	S2060	AfaCfcAfaCfaGfCfAfuAfgUfcAfaAfuAf	A2060	uAfuUfuGfaCfuAfgucUfgUfuGfgUfusUfsa	0.035	0.561	0.569
D2061	S2061	AfgUfcAfaAfaAfAfAfaGfaAfaUfaGfaAf	A2061	uUfcUfaUfuUfcUfuuuAfuUfuGfaCfusAfsu	0.057	0.668	0.386
D2062	S2062	AfgUfcAfaAfaAfUfGfaAfgAfgGfuAfaAf	A2062	uUfuAfcCfuCfuUfcauUfuUfuGfaCfusUfsg	0.720	1.017	0.924
D2063	S2063	CfuUfgAfaAfgCfCfUfcCfuAfgAfaGfaAf	A2063	uUfcUfuCfuAfgGfaggCfuUfuCfaAfgsUfsu	0.324	1.020	0.963
D2064	S2064	CfuUfcAfaCfaAfAfAfaGfuGfaAfaUfaUf	A2064	aUfaUfuUfcAfcUfuuuUfgUfuGfaAfgsUfsa	0.048	0.549	0.531
D2065	S2065	CfaAfcUfaAfcUfAfAfcUfuAfaUfuCfaAf	A2065	uUfgAfaUfuAfaGfuuaGfuUfaGfuUfcsUfsu	0.046	0.739	0.649
D2066	S2066	AfcCfaAfcAfgCfAfUfaGfuCfaAfaUfaAf	A2066	uUfaUfuUfgAfcUfaugCfuGfuUfgGfusUfsu	0.076	0.840	0.777
D2067	S2067	GfaAfcCfcAfcAfGfAfaAfuUfuCfuCfuAf	A2067	uAfgAfgAfaAfuUfucuGfuGfgGfuUfcsUfsu	0.103	0.916	0.808
D2068	S2068	GfaAfuAfuGfuCfAfCfuUfgAfaCfuCfaAf	A2068	uUfgAfgUfuCfaAfgugAfcAfuAfuUfcsUfsu	0.046	0.532	0.520
D2069	S2069	UfgAfaAfgCfcUfCfCfuAfgAfaGfaAfaAf	A2069	uUfuUfcUfuCfuAfggaGfgCfuUfuCfasAfsa	0.067	0.894	0.822
D2070	S2070	UfuCfaAfcAfaAfAfAfgUfgAfaAfuAfuUf	A2070	aAfuAfuUfuCfaCfuuuUfuGfuUfgAfasGfsu	0.052	0.557	0.395
D2071	S2071	AfaCfuAfaCfuAfAfCfuUfaAfuUfcAfaAf	A2071	uUfuGfaAfuUfaAfguuAfgUfuAfgUfusGfsc	0.025	0.220	0.232
D2072	S2072	CfcAfaCfaGfcAfUfAfgUfcAfaAfuAfaAf	A2072	uUfuAfuUfuGfaCfuaugCfuUfgUfuGfgsUfsu	0.293	0.923	0.899
D2073	S2073	AfaCfcCfaCfaGfAfAfaUfuUfcUfcUfaUf	A2073	aUfaGfaGfaAfaUfuucUfgUfgGfgUfusCfsu	0.021	0.375	0.356
D2074	S2074	UfgUfcAfcUfuGfAfAfcUfcAfaCfuCfaAf	A2074	uUfgAfgUfuGfaGfuucAfaGfuGfaCfasUfsa	0.052	0.402	0.513
D2075	S2075	GfaAfaGfcCfuCfCfUfaGfaAfgAfaAfaAf	A2075	uUfuUfuCfuUfcUfaggAfgGfcUfuUfcsAfsa	0.171	0.904	0.893
D2076	S2076	AfaUfaUfuUfaGfAfAfgAfgCfaAfcUfaAf	A2076	uUfaGfuUfgCfuCfuucUfaAfaUfaUfusUfsc	0.142	0.614	0.688
D2077	S2077	AfcUfaAfcUfaAfcUfuAfaUfuCfaAfaAf	A2077	uUfuUfgAfaUfuAfguuUfaGfuUfaGfusUfsg	0.020	0.312	0.316

D2078	S2078	CfaAfcAfgCfaUfAfGfuCfaAfaUfaAfaAf	A2078	uUfuUfaUfuUfgAfcuaUfgCfuGfuUfgsGfsu	0.026	0.313	0.393
D2079	S2079	CfcAfcAfgAfaAfUfUfuCfuCfuAfuCfuUf	A2079	aAfgAfuAfgAfgAfaauUfuCfuGfuGfgsGfsu	0.012	0.596	0.345
D2080	S2080	GfuCfaCfuUfgAfAfCfuCfaAfcUfcAfaAf	A2080	uUfuGfaGfuUfgAfguuCfaAfgUfgAfcAfsu	0.054	0.503	0.456
D2081	S2081	CfuCfcUfaGfaAfGfAfaAfaAfaUfuCfuAf	A2081	uAfgAfaUfuUfuUfucuUfcUfaGfgAfgsGfsc	0.050	0.596	0.531
D2082	S2082	AfuUfuAfgAfaGfAfGfcAfaCfuAfaCfuAf	A2082	uAfgUfuAfgUfuGfcucUfuCfuAfaAfusAfsu	0.064	0.806	0.928
D2083	S2083	CfuAfaCfuAfaCfUfUfaAfuUfcAfaAfaUf	A2083	aUfuUfuGfaAfuUfaagUfuAfgUfuAfgsUfsu	0.056	0.844	0.761
D2084	S2084	CfaGfcAfuAfgUfcAfaAfuAfaAfaGfaAf	A2084	uUfcUfuUfuAfuUfugaCfuAfuGfcUfgsUfsu	0.046	0.859	0.756
D2085	S2085	GfaAfaUfaAfgAfAfAfuGfuAfaAfaCfaUf	A2085	aUfgUfuUfuAfcAfuuuCfuUfaUfuUfcsAfsu	0.039	0.615	0.612
D2086	S2086	UfcAfcUfuGfaAfCfUfcAfaCfuCfaAfaAf	A2086	uUfuUfgAfgUfuGfaguUfcAfaGfuGfasCfsa	0.057	0.724	0.663
D2087	S2087	UfcUfaCfuUfcAfAfCfaAfaAfaGfuGfaAf	A2087	uUfcAfcUfuUfuUfguuGfaAfgUfaGfasAfsu	0.732	1.028	0.915
D2088	S2088	UfuUfaGfaAfgAfGfCfaAfcUfaAfcUfaAf	A2088	uUfaGfuUfaGfuUfgcuCfuUfcUfaAfasUfsa	0.061	0.795	0.785
D2089	S2089	AfaAfaCfaAfgAfUfAfaUfaGfcAfuCfaAf	A2089	uUfgAfuGfcUfaUfuauCfuUfgUfuUfusUfsc	0.330	1.017	0.865
D2090	S2090	AfgCfaUfaGfuCfAfAfaUfaAfaAfgAfaAf	A2090	uUfuCfuUfuUfaUfuugAfcUfaUfgCfusGfsu	0.038	0.606	0.589
D2091	S2091	AfgAfcCfcAfgCfAfAfcUfcUfcAfaGfuUf	A2091	aAfcUfuGfaGfaGfuugCfuGfgGfuCfusGfsa	0.301	0.850	0.753
D2092	S2092	AfgUfcCfaUfgGfAfCfaUfuAfaUfuCfaAf	A2092	uUfgAfaUfuAfaUfgucCfaUfgGfaCfusAfsc	0.407	0.791	0.726
D2093	S2093	GfaUfgGfaUfcAfCfAfaAfaCfuUfcAfaUf	A2093	aUfuGfaAfgUfuUfuguGfaUfcCfaUfcsUfsa	0.120	0.658	0.654
D2094	S2094	CfuAfgAfgAfaGfAfUfaUfaCfuCfcAfuAf	A2094	uAfuGfgAfgUfaUfaucUfuCfuCfuAfgsGfsc	0.071	0.610	0.645
D2095	S2095	AfaAfgAfcAfaCfAfAfaCfaUfuAfuAfuUf	A2095	aAfuAfuAfaUfgUfuugUfuGfuCfuUfusCfsc	0.029	0.306	0.461
D2096	S2096	CfaUfuAfuAfuUfGfAfaUfaUfuCfuUfuUf	A2096	aAfaAfgAfaUfaUfucaAfuAfuAfaUfgsUfsu	0.031	0.510	0.595
D2097	S2097	GfaCfcCfaGfcAfAfCfuCfuCfaAfgUfuUf	A2097	aAfaCfuUfgAfgAfguuGfcUfgGfgUfcsUfsg	0.075	0.697	0.845
D2098	S2098	GfgAfuCfaCfaAfAfAfcUfuCfaAfuGfaAf	A2098	uUfcAfuUfgAfaGfuuuUfgUfgAfuCfcsAfsu	0.130	0.831	0.951
D2099	S2099	GfaAfgAfuAfuAfcUfcCfaUfaGfuGfaAf	A2099	uUfcAfcUfaUfgGfaguAfuAfuCfuUfcsUfsc	0.058	0.828	0.938
D2100	S2100	GfaCfaAfcAfaAfCfAfuUfaUfaUfuGfaAf	A2100	uUfcAfaUfaUfaAfuguUfuGfuUfgUfcsUfsu	0.026	0.564	0.856
D2101	S2101	GfgGfaAfaUfcAfCfGfaAfaCfcAfaCfuAf	A2101	uAfgUfuGfgUfuUfcguGfaUfuUfcCfcsAfsa	0.314	0.948	1.033
D2102	S2102	AfcCfcAfgCfaAfCfUfcUfcAfaGfuUfuUf	A2102	aAfaAfcUfuGfaGfaguUfgCfuGfgGfusCfsu	0.033	0.448	0.675
D2103	S2103	GfgAfcAfuUfaAfUfUfcAfaCfaUfcGfaAf	A2103	uUfcGfaUfgUfuGfaauUfaAfuGfuCfcsAfsu	0.156	0.897	0.912
D2104	S2104	GfaUfcAfcAfaAfAfCfuUfcAfaUfgAfaAf	A2104	uUfuCfaUfuGfaAfguuUfuGfuGfaUfcsCfsa	0.056	0.619	0.769

D2105	S2105	AfcUfcCfaUfaGfUfGfaAfgCfaAfuCfuAf	A2105	uAfgAfuUfgCfuUfcacUfaUfgGfaGfusAfsu	0.100	0.823	0.925
D2106	S2106	AfcAfaCfaAfaCfAfUfuAfuAfuUfgAfaUf	A2106	aUfuCfaAfuAfuAfaugUfuUfgUfuGfusCfsu	0.035	0.565	0.843
D2107	S2107	GfgAfaAfuCfaCfGfAfaAfcCfaAfcUfaUf	A2107	aUfaGfuUfgGfuUfucgUfgAfuUfuCfcsCfsa	0.076	0.701	0.890
D2108	S2108	CfcCfaGfcAfaCfUfCfuCfaAfgUfuUfuUf	A2108	aAfaAfaCfuUfgAfgagUfuGfcUfgGfgsUfsc	0.057	0.626	0.884
D2109	S2109	GfaCfaUfuAfaUfUfCfaAfcAfuCfgAfaUf	A2109	aUfuCfgAfuGfuUfgaaUfuAfaUfgUfcsCfsa	0.160	0.873	1.012
D2110	S2110	AfaCfgUfgGfgAfGfAfaCfuAfcAfaAfuAf	A2110	uAfuUfuGfuAfgUfucuCfcCfaCfgUfusUfsc	0.101	0.881	0.981
D2111	S2111	CfuCfcAfuAfgUfGfAfaGfcAfaUfcUfaAf	A2111	uUfaGfaUfuGfcUfucaCfuAfuGfgAfgsUfsc	0.026	0.435	0.691
D2112	S2112	CfaAfcAfaAfcAfUfUfaUfaUfuGfaAfuAf	A2112	uAfuUfcAfaUfaUfaauGfuUfuGfuUfgsUfsc	0.154	0.882	1.091
D2113	S2113	GfaAfaUfcAfcGfAfAfaCfcAfaCfuAfuAf	A2113	uAfuAfgUfuGfgUfuucGfuGfaUfuUfcsCfsc	0.045	0.764	1.004
D2114	S2114	CfuCfuCfaAfgUfUfuUfcAfuGfuCfuAf	A2114	uAfgAfcAfuGfaAfaaaCfuUfgAfgAfgsUfsu	0.105	0.925	0.988
D2115	S2115	AfcAfuUfaAfuUfCfAfaCfaUfcGfaAfuAf	A2115	uAfuUfcGfaUfgUfugaAfuUfaAfuGfusCfsc	0.114	0.919	0.905
D2116	S2116	GfgGfaGfaAfcUfAfCfaAfaUfaUfgGfuUf	A2116	aAfcCfaUfaUfuUfguaGfuUfcUfcCfcsAfsu	0.234	1.023	0.951
D2117	S2117	UfcCfaUfaGfuGfAfAfgCfaAfuCfuAfaUf	A2117	aUfuAfgAfuUfgCfuucAfcUfaUfgGfasGfsu	0.033	0.566	0.778
D2118	S2118	AfaCfaAfaCfaUfUfaAfuAfuUfgAfaUfaUf	A2118	aUfaUfuCfaAfuAfuuaUfgUfuUfgUfusGfsu	0.031	0.535	0.785
D2119	S2119	UfgGfcAfaUfgUfCfCfcCfaAfuGfcAfaUf	A2119	aUfuGfcAfuUfgGfggaCfaUfuGfcCfasGfsu	0.065	0.815	0.967
D2120	S2120	UfcAfgGfuAfgUfCfCfaUfgGfaCfaUfuAf	A2120	uAfaUfgUfcCfaUfggaCfuAfcCfuGfasUfsc	0.223	0.825	0.924
D2121	S2121	UfuAfaUfuCfaAfcAfuCfcAfaUfaGfaUf	A2121	aUfcUfaUfuCfcAfuUfgAfaUfuAfasUfsg	0.083	0.781	0.915
D2122	S2122	GfgAfgAfaCfuAfcAfaAfuAfuGfgUfuUf	A2122	aAfaCfcAfuAfuUfuguAfgUfuCfuCfcsCfsa	0.079	0.680	0.767
D2123	S2123	CfcAfuAfgUfgAfaGfcAfaUfcUfaAfuUf	A2123	aAfuUfaGfaUfuGfcuuCfaCfuAfuGfgsAfsu	0.026	0.537	0.793
D2124	S2124	AfcAfaAfcAfuUfaUfaUfuGfaAfuAfuUf	A2124	aAfuAfuUfcAfaUfaaaAfuGfuUfuGfusUfsg	0.044	0.680	0.828
D2125	S2125	AfaUfgCfaAfuCfCfcGfgAfaAfcAfaAf	A2125	uUfuGfuUfuUfcCfgggAfuUfgCfaUfusGfsg	0.349	0.971	1.005
D2126	S2126	CfaGfgUfaGfuCfcAfuGfgAfcAfuUfaAf	A2126	uUfaAfuGfuCfcAfuUfgAfcUfaCfcUfgsAfsu	0.070	0.548	0.546
D2127	S2127	UfuCfaAfcAfuCfGfAfaUfaGfaUfgGfaUf	A2127	aUfcCfaUfcUfaUfucgAfuGfuUfgAfasUfsu	0.225	0.958	0.967
D2128	S2128	GfuUfgGfgCfcUfAfGfaGfaAfgAfuAfuAf	A2128	uAfuAfuCfuUfcUfcuaGfgCfcCfaAfcCfsa	0.765	0.969	0.922
D2129	S2129	CfaUfaGfuGfaAfGfCfaAfuCfuAfaUfuAf	A2129	uAfaUfuAfgAfuUfgcuUfcAfcUfaUfgsGfsa	0.028	0.583	0.777
D2130	S2130	AfaCfaUfuAfuUfUfgAfaUfaUfuCfuUf	A2130	aAfgAfaUfaUfuCfaaaAfuAfaUfgUfusUfsg	0.249	0.916	0.981
D2131	S2131	GfcAfaUfcCfcGfGfAfaAfaCfaAfaGfaUf	A2131	aUfcUfuUfgUfuUfuccGfgGfaUfuGfcsAfsu	0.435	1.002	1.019

D2132	S2132	GfgUfaGfuCfcAfUfGfgAfcAfuUfaAfuUf	A2132	aAfuUfaAfuGfuCfcGfgAfcUfaCfcsUfsg	0.427	0.988	0.918
D2133	S2133	AfuCfgAfaUfaGfAfUfgGfaUfcAfcAfaAf	A2133	uUfuGfuGfaUfcCfaucUfaUfuCfGfAfusGfsu	0.170	0.706	0.890
D2134	S2134	CfcUfaGfaGfaAfGfAfuAfuUfcCfaUf	A2134	aUfgGfaGfuAfuAfuUfcUfcUfaGfcsCfsc	0.033	0.543	0.733
D2135	S2135	GfuUfgGfaAfgAfCfUfgGfaAfaGfaCfaAf	A2135	uUfgUfcUfuUfcCfaguCfuUfcCfaAfcUfsc	0.137	0.975	0.944
D2136	S2136	AfcAfuUfaUfaUfUfGfaAfuAfuUfcUfuUf	A2136	aAfaGfaAfuAfuUfcaaUfaUfaAfuGfusUfsu	0.114	0.882	0.940
D2137	S2137	CfaAfuCfcCfGfAfAfaAfcAfaAfgAfuUf	A2137	aAfuCfuUfuGfuUfuucCfGfGfAfuUfcsCfsc	0.155	0.755	0.686
D2138	S2138	CfuAfcUfuGfgGfAfUfcAfcAfaAfgCfaAf	A2138	uUfgCfuUfuGfuGfaucCfcAfaGfuAfgsAfsa	0.196	0.825	0.658
D2139	S2139	AfcAfaCfcUfaAfaUfgGfuAfaAfuAfuAf	A2139	uAfuAfuUfuAfcCfaUuUfaGfgUfuGfusUfsu	0.133	0.704	0.671
D2140	S2140	AfuCfcAfuCfcAfAfcAfaGfaUfuCfaGfaAf	A2140	uUfcUfgAfaUfcUfguuGfgAfuGfgAfcCfsc	0.184	0.775	0.658
D2141	S2141	AfaCfuGfaGfgCfAfAfaUfuUfaAfaAfgAf	A2141	uCfuUfuUfaAfaUfuugCfcUfcAfgUfusCfsc	0.076	0.682	0.777
D2142	S2142	AfgAfgUfaUfgUfGfUfaAfaAfaUfcUfgUf	A2142	aCfaGfaUfuUfuUfacaCfaUfaCfuCfusGfsu	0.448	0.659	0.761
D2143	S2143	AfaUfcCfcGfgAfAfAfaCfaAfaGfaUfuUf	A2143	aAfaUfcUfuUfgUfuuuCfcGfgGfaUfusGfsc	0.097	0.844	0.924
D2144	S2144	UfaCfuUfgGfgAfUfcCfaAfaGfcAfaAf	A2144	uUfuGfcUfuUfgUfgauCfcCfaAfgUfasGfsa	0.084	0.875	0.947
D2145	S2145	CfaAfcCfuAfaAfUfGfgUfaAfaUfaUfaAf	A2145	uUfaUfaUfuUfaCfcUfuUfuAfgGfuUfcsUfsu	0.104	0.811	0.814
D2146	S2146	UfuGfaAfuGfaAfCfUfgAfgGfcAfaAfuUf	A2146	aAfuUfuGfcCfuCfaguUfcAfuUfcAfasAfsu	0.046	0.549	0.680
D2147	S2147	AfcUfgAfgGfcAfAfAfuUfuAfaAfaGfgAf	A2147	uCfcUfuUfuAfaAfuuuGfcCfuCfaGfusUfsc	0.079	0.890	1.005
D2148	S2148	GfaGfuAfuGfuGfUfaAfaAfaCfuGfuAf	A2148	uAfcAfgAfuUfuUfuacAfcAfuAfcUfcsUfsg	0.497	0.676	0.783
D2149	S2149	AfcUfuGfgGfaUfcAfcAfaAfgCfaAfaAf	A2149	uUfuUfgCfuUfuGfugaUfcCfcAfaGfusAfsu	0.049	0.699	0.907
D2150	S2150	AfuGfgUfaAfaUfAfUfaAfcAfaAfcCfaAf	A2150	uUfgGfuUfuGfuUfaUfuUfaCfcAfcUfcsUfsu	0.093	0.928	0.941
D2151	S2151	UfgAfaUfgAfaCfuUfgGfaGfgCfaAfaUfuUf	A2151	aAfaUfuUfgCfcUfcagUfuCfaUfuCfasAfsa	0.201	0.736	0.885
D2152	S2152	CfuGfaGfgCfaAfAfUfuUfaAfaAfgGfcAf	A2152	uGfcCfuUfuUfaAfaUfuUfgCfcUfcAfgsUfsu	0.071	0.938	0.872
D2153	S2153	AfgUfaUfgUfgUfAfAfaAfaUfcUfgUfaAf	A2153	uUfaCfaGfaUfuUfuuaCfaCfaUfaCfusCfsu	0.504	0.816	0.689
D2154	S2154	GfaAfaAfcAfaAfGfAfuUfuGfgUfgUfuUf	A2154	aAfaCfaCfcAfaAfuUfuUfuUfcUfcsCfsg	0.061	0.723	0.922
D2155	S2155	AfgUfgUfgGfaGfAfAfaAfcAfaCfcUfaAf	A2155	uUfaGfgUfuGfuUfuUfcUfcCfaCfaCfusCfsa	0.071	0.689	0.869
D2156	S2156	GfuCfuCfaAfaAfUfGfgAfaGfgUfuAfuAf	A2156	uAfuAfaCfcUfuCfcUfuUfuUfgAfgAfcUfsc	0.133	0.643	0.974
D2157	S2157	GfaAfuGfaAfcUfGfAfgGfcAfaAfuUfuAf	A2157	uAfaAfuUfuGfcCfucaGfuUfcAfuUfcsAfsa	0.204	0.751	1.008
D2158	S2158	UfgAfgGfcAfaAfUfuUfaAfaAfgCfaAf	A2158	uUfgCfcUfuUfuAfaUfuUfuGfcCfuCfasGfsu	0.089	0.820	0.937

D2159	S2159	GfuAfuGfuGfuAfaAfaAfuCfuGfuAfaUf	A2159	aUfuAfcAfgAfuUfuuuAfcAfcAfuAfcUfsc	0.535	0.697	0.788
D2160	S2160	AfaAfaCfaAfaGfaUfuUfgGfuGfuUfuUf	A2160	aAfaAfcAfcCfaAfaucUfuUfgUfuUfusCfsc	0.297	0.954	1.004
D2161	S2161	GfuGfuGfgAfgAfaAfaCfaAfcCfuAfaAf	A2161	uUfuAfgGfuUfgUfuuuCfuCfcAfcAfcUfsc	0.178	0.872	0.918
D2162	S2162	AfuGfgAfaGfgUfuAfuAfcUfcUfaUfaAf	A2162	uUfaUfaGfaGfuAfuuaCfcUfuCfcAfusUfsu	0.026	0.489	0.890
D2163	S2163	AfaUfgAfaCfuGfAfGfgCfaAfaUfuUfaAf	A2163	uUfaAfaUfuUfgCfcucAfgUfuCfaUfusCfsa	0.111	0.789	0.859
D2164	S2164	GfaGfgCfaAfaUfuUfaAfaAfgGfcAfaUf	A2164	aUfuGfcCfuUfuUfaaaUfuUfgCfcUfcsAfsG	0.241	0.956	0.869
D2165	S2165	UfaUfgUfgUfaAfAfaAfuUfcUfgUfaAfuAf	A2165	uAfuUfaCfaGfaUfuuuUfaCfaCfaUfasCfsu	0.571	0.762	0.931
D2166	S2166	AfcAfaAfgAfuUfuUfgUfgUfuUfuCfuAf	A2166	uAfgAfaAfaCfaCfaaAfuCfuUfuGfusUfsu	0.106	0.981	0.924
D2167	S2167	UfgUfgGfaGfaAfAfaAfcAfaCfcUfaAfaUf	A2167	aUfuUfaGfgUfuGfuuuUfcUfcCfaCfasCfsu	0.064	0.765	0.902
D2168	S2168	UfgGfaAfgGfuUfAfuAfaCfuCfuAfuAfaAf	A2168	uUfuAfuAfgAfgUfauaAfcCfuUfcCfasUfsu	0.029	0.675	0.859
D2169	S2169	AfuGfaAfcUfgAfgGfgCfaAfuUfuAfaAf	A2169	uUfuAfaAfuUfuGfccuAfaGfuUfcAfusUfsc	0.054	0.733	0.843
D2170	S2170	AfgGfcAfaAfuUfuAfaAfaGfgCfaAfuAf	A2170	uAfuUfgCfcUfuUfuuaAfuUfuGfcCfusCfsa	0.075	0.754	0.881
D2171	S2171	AfaGfaUfuUfgGfUfgfuUfuUfcUfaCfuUf	A2171	aAfgUfaGfaAfaAfcacCfaAfaUfcUfusUfsg	0.303	1.065	0.977
D2172	S2172	AfaAfcAfaCfcUfaAfaUfgGfuAfaAfuAf	A2172	uAfuUfuAfcCfaUfuuaGfgUfuGfuUfusUfsc	0.101	0.855	0.880
D2173	S2173	AfuAfcUfcUfaUfAfaAfaCfaAfcCfaAf	A2173	uUfgGfuUfgAfuUfuuaUfaGfaGfuAfusAfsa	0.107	0.961	0.960
D2174	S2174	UfgAfaCfuGfaGfGfcAfaAfuUfaAfaAf	A2174	uUfuUfaAfaUfuUfgccUfcAfgUfuCfasUfsu	0.078	0.714	0.878
D2175	S2175	GfgCfaAfaUfuUfAfaAfaAfgGfcAfaUfaAf	A2175	uUfaUfuGfcCfuUfuuaAfaUfuUfgCfcsUfsc	0.054	0.767	0.918
D2176	S2176	UfuUfuCfuAfcUfuUfgGfgGfaUfcAfcAfaAf	A2176	uUfuGfuGfaUfcCfaaGfuAfgAfaAfasCfsa	0.915	1.030	0.916
D2177	S2177	AfaCfaAfcCfuAfaAfuGfgUfaAfaUfaUf	A2177	aUfaUfuUfaCfcAfuuuAfgGfuUfgUfusUfsu	0.042	0.260	0.448
D2178	S2178	UfaCfuCfuAfuAfaAfaUfcAfaCfcAfaAf	A2178	uUfuGfgUfuGfaUfuuuAfuAfgAfgUfasUfsa	0.063	0.897	0.869
D2179	S2179	GfaAfcUfgAfgGfcAfaAfuUfuAfaAfaAf	A2179	uUfuUfuAfaAfuUfugcCfuCfaGfuUfcsAfsu	0.178	0.858	0.869
D2180	S2180	CfaGfaGfuAfuGfUfgfuAfaAfaAfuCfuUf	A2180	aAfgAfuUfuUfuAfcacAfuAfcUfcUfsgUfsg	0.436	0.677	0.813

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

Клеточная культура и трансфекции

Клетки Нер3В (АТСС, Manassas, VA) выращивают почти до слияния при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в RPMI (АТСС) с добавлением 10% FBS, стрептомицина и глутамина (АТСС) и затем извлекают из чашки трипсинизацией. Трансфекцию выполняют, добавляя к 5 мкл миРНК-дуплексов на лунку в 96-луночном планшете 14,8 мкл Opti-MEM плюс 0,2 мкл липофектамина RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad, CA, кат. № 13788-150), и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут. Затем к смеси миРНК добавляют 80 мкл полной среды для выращивания без антибиотиков, содержащей ~2×10⁴ клеток Нер3В. Клетки инкубируют или 24 или 120 часов и затем очищают РНК. Эксперименты с однократной дозой выполняют при конечной концентрации дуплексов 10 нМ и 0,1 нМ, и эксперименты по зависимости реакции от дозы выполняют с использованием конечной концентрации дуплексов 10, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005 и 0,00001 нМ, если не указано иное.

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

К 10 мкл полной РНК добавляют основную смесь из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию. Генерируют кДНК с использованием термоячейки Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, CA) через следующие стадии: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 с, 4°C выдержка.

ПЦР в реальном времени

К основной смеси, содержащей 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan (Applied Biosystems, кат.№ 4236317E), 0,5 мкл зонда ANGPTL TaqMan (Applied Biosystems, кат.№ Hs00205581_m1) и 5 мкл основной смеси зонда Lightcycler 480 (Roche, кат.№ 04887301001) на лунку в 50 384-луночных планшетах (Roche, кат.№ 04887301001), добавляют 2 мкл кДНК. ПЦР в реальном времени

проводят в системе для ПЦР в реальном времени ABI 7900HT (Applied Biosystems) с использованием анализа методом $\Delta\Delta Ct$ (RQ). Каждый дуплекс испытывают при двух независимых трансфекциях, и каждую трансфекцию анализируют двукратно, если в сводных таблицах не указано иное.

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

смысловая: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT;

антисмысловая: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT.

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

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

такие пункты дают право. Соответственно, формула изобретения не ограничивается раскрытием.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечное средство РНКи, способное ингибировать экспрессию гена-мишени, содержащее смысловую цепь и антисмысловую цепь, где каждая цепь имеет от 17 до 30 нуклеотидов, и образующее дуплекс длиной 17-23 нуклеотидных пар, где смысловая цепь представляет собой формулу (I):



где:

каждый i и j независимо равен 0 или 1;

каждый p и q независимо равен 0-6;

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

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой выступающую нуклеотидную последовательность; и

где N_b и Y не имеют одинаковых модификаций;

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

где

все YYY представляют собой 2'-F модифицированные нуклеотиды.

2. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где N_a и/или N_b содержит модификации альтернирующего типа.

3. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где мотив YYY находится в месте расщепления смысловой цепи или рядом с ним.

4. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где YYY находится в положениях 6, 7 и 8; или 7, 8 и 9; или 8, 9 и 10; или 9, 10 и 11; или 10, 11 и 12; или 11, 12 и 13 смысловой нити, отсчет начиная с первого нуклеотида, с 5'-конца; или, необязательно, подсчет начинается с первого спаренного нуклеотида в области дуплекса с 5'-конца.

5. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где i равно 1 и j равно 0, или i равно 0, и j равно 1, или оба i и j равны 1.

6. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где смысловая цепь представлена формулой $5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$ (Ia).

7. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где смысловая цепь представлена формулой $5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3'$ (Ib).

8. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где смысловая цепь представлена формулой $5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3'$ (Ic).

9. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где дуплексная область имеет длину 19-21 пары нуклеотидов.

10. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где дуплексная область имеет длину 21-23 пары нуклеотидов.

11. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где модифицированные нуклеотиды независимо модифицированы либо $2'-OCH_3$, либо $2'-F$.

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

13. Двухцепочечное средство РНКи по п.12, где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

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

15. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, дополнительно содержащий по меньшей мере одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

16. Двухцепочечное средство РНКи по п.1, где 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов связаны фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью на одном конце или на обоих концах смысловой и/или антисмысловой нити.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая двухцепочечное средство РНКи по любому из пп.1-16 отдельно или в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом.

18. Композиция для ингибирования экспрессии гена-мишени, содержащая Двухцепочечное средство РНКи по любому из пп.1-16 в количестве, достаточном для ингибирования экспрессии гена-мишени.

19. Композиция по п.18, где двухцепочечное средство РНКи вводят путем подкожного или внутривенного введения.

20. Композиция для доставки полинуклеотида к конкретной мишени индивида, где композиция содержит двухцепочечное средство РНКи по любому из пп.1-16 и ее вводят индивиду путем подкожного введения таким образом, чтобы полинуклеотид доставляется к конкретной мишени индивида.

По доверенности



- (51) **International Patent Classification:**
C12N 15/11 (2006.01) A61K 31/7125 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 31/713 (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/US2012/065601
- (22) **International Filing Date:**
16 November 2012 (16.11.2012)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/561,710 18 November 2011 (18.11.2011) US
- (71) **Applicant:** ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
[US/US]; 300 Third Street, Cambridge, MA 02142 (US).
- (72) **Inventors:** RAJEEV, Kallanthottathil, G.; 300 Third Street, Cambridge, MA 02142 (US). ZIMMERMANN, Tracy; 300 Third Street, Cambridge, MA 02142 (US). MANOHARAN, Muthiah; 300 Third Street, Cambridge, MA 02142 (US). MAIER, Martin; 300 Third Street, Cambridge, MA 02142 (US). KUCHIMANCHI, Satyanarayana; Alnylam Pharmaceuticals, Inc., 300 Third Street, Cambridge, MA 02142 (US). CHARISSE, Klaus; Alnylam Pharmaceuticals, Inc., 300 Third Street, Cambridge, MA 02142 (US).
- (74) **Agent:** TOWNES, Jeffrey, N.; LeClairRyan, 2318 Mill Road, Suite 1100, Alexandria, VA 22314 (US).
- (81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
- with international search report (Art. 21(3))
 - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- (88) **Date of publication of the international search report:**
8 August 2013



WO 2013/074974 A3

(54) **Title:** MODIFIED RNAI AGENTS

(57) **Abstract:** One aspect of the present invention relates to double-stranded RNAi (dsRNA) duplex agent capable of inhibiting the expression of a target gene. The dsRNA duplex comprises one or more motifs of three identical modifications on three consecutive nucleotides in one or both strand, particularly at or near the cleavage site of the strand. Other aspects of the invention relates to pharmaceutical compositions comprising these dsRNA agents suitable for therapeutic use, and methods of inhibiting the expression of a target gene by administering these dsRNA agents, e.g., for the treatment of various disease conditions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/065601

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/11 C12N15/113 A61K31/7125 A61K31/713
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61K
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, EMBL, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/148013 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; FITZGERALD KEVIN [US]; HINKLE GREGOR) 23 December 2010 (2010-12-23) pages 138,147 pages 153,155 pages 156,157 page 173	1-24, 41-46
X	WO 2009/002944 A1 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; BHAT BALKRISHEN [US]; PRAKASH THAZHA P) 31 December 2008 (2008-12-31) pages 72,80,88 page 95	1-24, 41-46
X	WO 2009/134487 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; FITZGERALD KEVIN [US]; DE FOUGEROLLE) 5 November 2009 (2009-11-05) pages 87,116	1-24, 41-46
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 March 2013	Date of mailing of the international search report 26/06/2013
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Bucka, Alexander
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/065601

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/073809 A2 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; MANOHARAN MUTHIAH [US]; RAJEEV KALLA) 11 June 2009 (2009-06-11) page 200 - page 202 -----	1-24, 41-46
X	WO 2004/015107 A2 (ATUGEN AG [DE]; GIESE KLAUS [DE]; KAUFMANN JOERG [DE]; KLIPPEL-GIESE A) 19 February 2004 (2004-02-19) figures 2,10,12,15 -----	1-24, 41-46
X	WO 2005/121370 A2 (ISIS PHARMACEUTICALS INC [US]; SWAYZE ERIC E [US]; BHAT BALKRISHEN [US]) 22 December 2005 (2005-12-22) pages 69,73,78 pages 80,82 pages 85,89 -----	1-24, 41-46
X	G. F. DELEAVEY ET AL: "Synergistic effects between analogs of DNA and RNA improve the potency of siRNA-mediated gene silencing", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 38, no. 13, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 4547-4557, XP055057675, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkq181 figures 1,2 -----	1-24, 41-46
X	MICHAEL A COLLINGWOOD ET AL: "Chemical Modification Patterns Compatible with High Potency Dicer-Substrate Small Interfering RNAs", OLIGONUCLEOTIDES, MARY ANN LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 18, no. 2, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 187-200, XP002623649, ISSN: 1545-4576, DOI: 10.1089/OLI.2008.0123 table 1 -----	1-24, 41-46
A	PRAKASH T P ET AL: "Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 48, no. 13, 27 May 2005 (2005-05-27), pages 4247-4253, XP002404764, ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/JM0500440 figures 3-9 -----	1-24, 41-46
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/US2012/065601

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. B. BRAMSEN ET AL: "A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 37, no. 9, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 2867-2881, XP055000747, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkp106 tables 1,3	1-24, 41-46
A	----- EP 2 305 805 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]) 6 April 2011 (2011-04-06) the whole document	1-24, 41-46
X,P	----- WO 2012/037254 A1 (ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC [US]; RAJEEV KALLANTHOTTATHIL G [US]; ZIMM) 22 March 2012 (2012-03-22) page 124 - page 125 -----	1-24, 41-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/065601

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-24, 44-46(completely); 41-43(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24, 44-46(completely); 41-43(partially)

A double-stranded RNAi agent capable of inhibiting the expression of a target gene, comprising a sense strand and an antisense strand, each strand having 14 to 30 nucleotides, wherein the duplex is represented by formula (III):

wherein: i, j, k, and l are each independently 0 or 1; p and q are each independently 0-6; each Na and Na' independently represents an oligonucleotide sequence comprising 0-25 nucleotides which are either modified or unmodified or combinations thereof, each sequence comprising at least two differently modified nucleotides, each Nb and Nb' independently represents an oligonucleotide sequence comprising 0-10 nucleotides which are either modified or unmodified or combinations thereof; each np, np', nq and nq' independently represents an overhang nucleotide sequence comprising 0-6 nucleotides; and XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', and Z'Z'Z' each independently represent one motif of three identical modifications on three consecutive nucleotides; and wherein the modification on Nb is different than the modification on Y and the modification on Nb' is different than the modification on Y'.

2. claims: 25-32(completely); 41-43(partially)

A double-stranded RNAi agent capable of inhibiting the expression of a target gene, comprising a sense strand and an antisense strand, each strand having 14 to 30 nucleotides, wherein the sense strand contains at least two motifs of three identical modifications on three consecutive nucleotides, one of said motifs occurring at the cleavage site in the strand and at least one of said motifs occurring at another portion of the strand that is separated from the motif at the cleavage site by at least one nucleotide; and wherein the antisense strand contains at least first motif of three identical modifications on three consecutive nucleotides, one of said motifs occurring at or near the cleavage site in the strand and a second motif occurring at another portion of the strand that is separated from the first motif by at least one nucleotide; wherein the modification in the motif occurring at the cleavage site in the sense strand is different than the modification in the motif occurring at or near the cleavage site in the antisense strand.

3. claims: 33-40(completely); 41-43(partially)

A double-stranded RNAi agent capable of inhibiting the expression of a target gene, comprising a sense strand and

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

an antisense strand, each strand having 14 to 30 nucleotides, wherein the sense strand contains at least one motif of three 2'-F modifications on three consecutive nucleotides, one of said motifs occurring at or near the cleavage site in the strand; and wherein the antisense strand contains at least one motif of three 2'-O-methyl modifications on three consecutive nucleotides, one of said motifs occurring at or near the cleavage site.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/065601

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2010148013	A2	23-12-2010	AU 2010260148 A1	02-02-2012
			CA 2764832 A1	23-12-2010
			CN 102458366 A	16-05-2012
			EA 201270019 A1	29-06-2012
			EP 2442792 A2	25-04-2012
			JP 2012530143 A	29-11-2012
			KR 20120050429 A	18-05-2012
			US 2011015252 A1	20-01-2011
			US 2013035371 A1	07-02-2013
			WO 2010148013 A2	23-12-2010
WO 2009002944	A1	31-12-2008	EP 2173358 A1	14-04-2010
			US 2011046206 A1	24-02-2011
			US 2013035369 A1	07-02-2013
			WO 2009002944 A1	31-12-2008
WO 2009134487	A2	05-11-2009	AU 2009241591 A1	05-11-2009
			CA 2713379 A1	05-11-2009
			EP 2245039 A2	03-11-2010
			JP 2011511004 A	07-04-2011
			US 2010010066 A1	14-01-2010
			US 2012016009 A1	19-01-2012
			WO 2009134487 A2	05-11-2009
WO 2009073809	A2	11-06-2009	AU 2008333811 A1	11-06-2009
			AU 2008340355 A1	02-07-2009
			CA 2708153 A1	11-06-2009
			CA 2708173 A1	02-07-2009
			CN 102006890 A	06-04-2011
			EP 2229186 A2	22-09-2010
			EP 2231195 A2	29-09-2010
			JP 2011505425 A	24-02-2011
			JP 2011505426 A	24-02-2011
			US 2009239814 A1	24-09-2009
			US 2009247608 A1	01-10-2009
			US 2012136042 A1	31-05-2012
			WO 2009073809 A2	11-06-2009
			WO 2009082607 A2	02-07-2009
WO 2004015107	A2	19-02-2004	AT 350473 T	15-01-2007
			AU 2003260370 A1	25-02-2004
			AU 2008207337 A1	04-09-2008
			BR 0313202 A	21-06-2005
			CA 2494930 A1	19-02-2004
			CN 1675359 A	28-09-2005
			DE 60310944 T2	11-10-2007
			DK 1527176 T3	07-05-2007
			EP 1527176 A2	04-05-2005
			EP 1857547 A2	21-11-2007
			EP 2258847 A2	08-12-2010
			ES 2280826 T3	16-09-2007
			JP 2011024592 A	10-02-2011
			KR 20050035877 A	19-04-2005
			MX PA05001355 A	30-09-2005
			PT 1527176 E	30-04-2007
			US 2004180351 A1	16-09-2004
			US 2009186845 A1	23-07-2009
US 2011118456 A1	19-05-2011			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/065601

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2013102769 A1	25-04-2013
		WO 2004015107 A2	19-02-2004

WO 2005121370	A2	22-12-2005	AU 2005252662 A1
			22-12-2005
			AU 2005252663 A1
			22-12-2005
			CA 2568735 A1
			22-12-2005
			CA 2569419 A1
			22-12-2005
			EP 1765415 A2
			28-03-2007
			EP 1765416 A2
			28-03-2007
			EP 1766071 A2
			28-03-2007
			JP 2008501693 A
			24-01-2008
			JP 2008501694 A
			24-01-2008
			US 2007123484 A1
			31-05-2007
			US 2007166734 A1
			19-07-2007
			US 2007167390 A1
			19-07-2007
			US 2007167391 A1
			19-07-2007
			US 2007167392 A1
			19-07-2007
			US 2007172948 A1
			26-07-2007
			US 2007173474 A1
			26-07-2007
			US 2007173475 A1
			26-07-2007
			US 2007179106 A1
			02-08-2007
			US 2007179107 A1
			02-08-2007
			US 2007179108 A1
			02-08-2007
			US 2007179109 A1
			02-08-2007
			US 2007185046 A1
			09-08-2007
			US 2007185047 A1
			09-08-2007
			US 2008119427 A1
			22-05-2008
			WO 2005121370 A2
			22-12-2005
			WO 2005121371 A2
			22-12-2005
			WO 2005121372 A2
			22-12-2005

EP 2305805	A1	06-04-2011	AU 2009267295 A1
			07-01-2010
			CA 2729762 A1
			07-01-2010
			CN 102137930 A
			27-07-2011
			EP 2305805 A1
			06-04-2011
			KR 20110028594 A
			21-03-2011
			TW 201002735 A
			16-01-2010
			US 2011152353 A1
			23-06-2011
			WO 2010001909 A1
			07-01-2010

WO 2012037254	A1	22-03-2012	AU 2011302152 A1
			02-05-2013
			CA 2812046 A1
			22-03-2012
			WO 2012037254 A1
			22-03-2012
