

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293502 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.03

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

(22) Дата подачи заявки
2021.06.03

(54) КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ RNAi, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ
ЭКСПРЕССИИ HSD17B13, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/033,128

(32) 2020.06.01

(33) US

(86) PCT/US2021/035730

(87) WO 2021/247885 2021.12.09

(88) 2022.02.10

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Лин Дэниэл С.Х., Оллманн Майкл,

Мюррей Джастин К., Херберич

Брэдли Дж., Дас Амрита, Коллинз

Патрик, Хоманн Оливер (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к конструкциям для RNAi, предназначенным для снижения экспрессии гена HSD17B13. Также описаны способы применения таких конструкций для RNAi для лечения или предупреждения заболевания печени, представляющего собой неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD).

A1

202293502

202293502

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576584EA/032

КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ RNAi, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ HSD17B13, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к композициям и способам для модулирования экспрессии 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы 13 типа (HSD17B13) в печени. В частности, настоящее изобретение относится к терапевтическим средствам на основе нуклеиновой кислоты, предназначенным для снижения экспрессии HSD17B13 посредством РНК-интерференции, и к способам применения таких терапевтических средств на основе нуклеиновой кислоты для лечения или предупреждения заболевания печени, такого как неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD).

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Являясь частью спектра патологий печени, неалкогольная жировая болезнь печени (NAFLD) представляет собой самое распространенное хроническое заболевание печени в мире, заболеваемость которым удвоилась за последние 20 лет, и в настоящее время по оценкам она затрагивает приблизительно 20% населения в мире (Sattar et al. (2014) BMJ 349:g4596; Loomba and Sanyal (2013) Nature Reviews Gastroenterology & hepatology 10(11):686-690; Kim and Kim (2017) Clin Gastroenterol Hepatol 15(4):474-485; Petta et al. (2016) Dig Liver Dis 48(3):333-342). NAFLD начинается с накопления триглицеридов в печени и определяется наличием цитоплазматических липидных капель в более чем 5% гепатоцитов у индивидуума 1) без значительного потребления алкоголя в анамнезе и 2) у которого были исключены диагнозы других типов заболеваний печени (Zhu et al (2016) World J Gastroenterol 22(36):8226-33; Rinella (2015) JAMA 313(22):2263-73; Yki-Jarvinen (2016) Diabetologia 59(6):1104-11). У некоторых индивидуумов накопление эктопического жира в печени, называемое стеатозом, вызывает воспаление и повреждение клеток печени, что приводит к более поздней стадии заболевания, называемой неалкогольным стеатогепатитом (NASH) (Rinella, выше). По состоянию на 2015 год у 75-100 миллионов американцев прогнозируется наличие NAFLD; при этом NASH составляет примерно 10-30% случаев диагностирования NAFLD (Rinella, выше; Younossi et al (2016) Hepatology 64(5):1577-1586).

[0003] 17 β -гидроксистероиддегидрогеназа 13 типа (HSD17B13), также известная как 17 β -HSD 13 типа, является представителем семейства 17 β -гидроксистероиддегидрогеназ (HSD17B), которое включает в себя семейство ферментов, катализирующих превращение между 17-кето- и 17-гидроксистероидами (Su et al. (2019) Molecular and Cellular Endocrinology; 489:119-125). HSD17B13, первоначально названная SCDR9, была впервые клонирована из библиотеки кДНК печени человека в 2007 г. (Liu et al. (2007) Acta Biochim 54:213-218). В 2008 г. Horiguchi идентифицировал HSD17B13 в качестве нового белка, ассоциированного с LD, экспрессия которого ограничена главным образом печенью (Horiguchi et al. (2008) Biochem Biophys Res Commun 370:235-238).

Сверхэкспрессия HSD17B13 в печени способствует накоплению липидов в печени. Экспрессия HSD17B13 значительно повышена у пациентов и мышей с неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD) (Su et al. (2014) PNAS 111:11437-11442). Соответственно, новые терапевтические средства, целенаправленно воздействующие на HSD17B13, представляют новый подход к снижению уровней HSD17B13 и лечению гепатологических заболеваний, таких как неалкогольная жировая болезнь печени.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение частично основано на конструировании и получении конструкций для RNAi, которые целенаправленно воздействуют на мРНК HSD17B13 и снижают экспрессию HSD17B13 в клетках печени. Специфичное в отношении последовательности подавление экспрессии HSD17B13 является применимым для лечения или предупреждения состояний, ассоциированных с экспрессией HSD17B13, таких как заболевания печени, такие как, например, простая жировая инфильтрация печени (стеатоз), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени (необратимое рубцевание печени на поздней стадии) или ожирение, связанное с HSD17B13. Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлена конструкция для RNAi, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок, имеющий последовательность, которая является комплементарной последовательности мРНК HSD17B13. В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить содержит участок, имеющий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из антисмысловой последовательности, представленной в таблице 1 или таблице 2.

[0005] В некоторых вариантах осуществления смысловая нить конструкций для RNAi, описанных в данном документе, содержит последовательность, которая комплементарна последовательности антисмысловой нити в достаточной степени, чтобы образовать дуплексный участок длиной от приблизительно 15 до приблизительно 30 пар оснований. В этих и других вариантах осуществления каждая из смысловой и антисмысловой нити имеет длину, составляющую от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по меньшей мере один "тупой" конец. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по меньшей мере один нуклеотидный "липкий" конец. Такие нуклеотидные "липкие" концы могут содержать по меньшей мере 1-6 неспаренных нуклеотидов и могут быть расположены на 3'-конце смысловой нити, 3'-конце антисмысловой нити или 3'-конце как смысловой, так и антисмысловой нитей. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат "липкий" конец из двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат "липкий" конец из двух неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити и "тупой" конец на 3'-конце смысловой нити/5'-конце антисмысловой нити.

[0006] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут содержать один

или несколько модифицированных нуклеотидов, в том числе нуклеотиды, имеющие модификации рибозного кольца, нуклеинового основания или фосфодиэфирного остова. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-модифицированных нуклеотидов. Такие 2'-модифицированные нуклеотиды могут включать 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-дезоксид-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метоксиэтил-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-аллил-модифицированные нуклеотиды, бициклические нуклеиновые кислоты (BNA), гликолевые нуклеиновые кислоты (GNA), инвертированные основания (например, инвертированный аденозин) или их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой и антисмысловой нитях конструкции для RNAi представляют собой модифицированные нуклеотиды.

[0007] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат по меньшей мере одну модификацию остова, такую как модифицированная межнуклеотидная или межнуклеозидная связь. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь. В конкретных вариантах осуществления фосфотиоатные межнуклеотидные связи могут быть расположены на 3'- или 5'-концах смысловой и/или антисмысловой нитей.

[0008] В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить и/или смысловая нить конструкций для RNAi по настоящему изобретению могут содержать последовательность из антисмысловой и смысловой последовательностей, представленных в таблицах 1 или 2, или состоять из нее. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi может представлять собой любое из дуплексных соединений, представленных в любой из таблиц 1 или 2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] Настоящее изобретение направлено на композиции и способы для регуляции экспрессии гена 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы 13 типа (HSD17B13). В некоторых вариантах осуществления ген может находиться внутри клетки или организма субъекта, такого как млекопитающее (например, человек). В некоторых вариантах осуществления композиции по настоящему изобретению содержат конструкции для RNAi, которые целенаправленно воздействуют на мРНК HSD17B13 и снижают экспрессию HSD17B13 в клетке или у млекопитающего. Такие конструкции для RNAi являются применимыми для лечения или предупреждения разных форм заболеваний печени, таких как, например, простая жировая инфильтрация печени (стеатоз), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени (необратимое рубцевание печени на поздней стадии) или ожирение, связанное с HSD17B13.

[0010] РНК-интерференция (RNAi) представляет собой процесс введения

экзогенной РНК в клетку, который приводит к специфичному разрушению мРНК, кодирующей подвергаемый нацеливанию белок, с последующим в результате снижением экспрессии белка. Достижения как в области технологии RNAi, так и в области доставки в печень, а также растущие положительные результаты применения других средств терапии на основе RNAi позволяют предположить, что RNAi представляет собой убедительное средство терапевтического лечения NAFLD путем непосредственного целенаправленного воздействия на HSD17B13.

[0011] Используемый в данном документе термин "конструкция для RNAi" относится к средству, содержащему молекулу РНК, которая при введении в клетку способна снижать экспрессию гена-мишени (например, HSD17B13) посредством механизма РНК-интерференции. РНК-интерференция представляет собой процесс, посредством которого молекула нуклеиновой кислоты вызывает расщепление и разрушение молекулы РНК-мишени (например, матричной РНК или мРНК) специфичным в отношении последовательности образом, например, посредством пути РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит двухнитевую молекулу РНК, содержащую две антипараллельные нити из смежных нуклеотидов, которые комплементарны друг другу в достаточной степени, чтобы гибридизироваться с образованием дуплексного участка. "Гибридизироваться" или "гибридизация" относятся к спариванию комплементарных полинуклеотидов, обычно посредством образования водородных связей (например, образования водородных связей в уотсон-криковских, хугстиновских или обратных хугстиновских парах оснований) между комплементарными основаниями в двух полинуклеотидах. Нить, содержащую участок, имеющий последовательность, которая по сути комплементарна последовательности-мишени (например, мРНК-мишени), называют "антисмысловой нитью". "Смысловая нить" относится к нити, которая содержит участок, по сути комплементарный участку антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить может содержать участок, имеющий последовательность, которая по сути идентична последовательности-мишени.

[0012] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлена конструкция для RNAi, направленная на HSD17B13. В некоторых вариантах осуществления в настоящее изобретение включена конструкция для RNAi, которая содержит любую из последовательностей, перечисленных в таблице 1 или таблице 2.

[0013] Двухнитевая молекула РНК может содержать химические модификации рибонуклеотидов, в том числе модификации компонентов рибонуклеотидов, представляющих собой рибозный сахар, основание или остов, таких как те, которые описаны в данном документе или известны из уровня техники. Любые такие модификации, которые используются в двухнитевой молекуле РНК (например, siRNA, shRNA или им подобные), охватываются термином "двухнитевая РНК" в целях настоящего изобретения.

[0014] Как используется в данном документе, первая последовательность

"комплементарна" второй последовательности, если полинуклеотид, содержащий первую последовательность, может гибридизироваться с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, с образованием дуплексного участка при определенных условиях, таких как физиологические условия. Другие такие условия могут включать умеренные или жесткие условия гибридизации, которые известны специалистам в данной области. Первая последовательность считается полностью комплементарной (комплементарной на 100%) второй последовательности, если полинуклеотид, содержащий первую последовательность оснований, образует пары оснований с полинуклеотидом, содержащим вторую последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей без каких-либо ошибок спаривания. Последовательность является "по сути комплементарной" последовательности-мишени, если эта последовательность на по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% комплементарна последовательности-мишени. Процент комплементарности может быть рассчитан путем деления количества оснований в первой последовательности, которые являются комплементарными основаниям в соответствующих положениях во второй последовательности или последовательности-мишени, на общую длину первой последовательности. Можно также сказать, что последовательность является по сути комплементарной другой последовательности, если при гибридизации этих двух последовательностей имеется не более 5, 4, 3, 2 или 1 ошибки спаривания в дуплексном участке из 30 пар оснований. Как правило, если присутствуют какие-либо нуклеотидные "липкие" концы, как это определено в данном документе, последовательность таких "липких" концов не учитывается при определении степени комплементарности между двумя последовательностями. В качестве примера, смысловая нить длиной 21 нуклеотид и антисмысловая нить длиной 21 нуклеотид, которые гибридизируются с образованием дуплексного участка из 19 пар оснований с 2 нуклеотидными "липкими" концами на 3'-конце каждой нити, будут считаться полностью комплементарными в соответствии с термином, используемым в данном документе.

[0015] В некоторых вариантах осуществления участок антисмысловой нити содержит последовательность, которая полностью комплементарна участку последовательности РНК-мишени (например, мРНК HSD17B13). В таких вариантах осуществления смысловая нить может содержать последовательность, которая полностью комплементарна последовательности антисмысловой нити. В других таких вариантах осуществления смысловая нить может содержать последовательность, которая по сути комплементарна последовательности антисмысловой нити, например, имея 1, 2, 3, 4 или 5 ошибок спаривания в дуплексном участке, образованном смысловой и антисмысловой нитями. В определенных вариантах осуществления предпочтительно, чтобы любые ошибки спаривания находились в концевых участках (например, в пределах 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 5'- и/или 3'-концов нитей). В одном варианте осуществления любые ошибки спаривания в дуплексном участке, образованном из смысловой и антисмысловой нитей, находятся в пределах 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотидов от 5'-конца антисмысловой

нити.

[0016] В определенных вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить двухнитевой РНК могут представлять собой две отдельные молекулы, которые гибридизируются с образованием дуплексного участка, но в остальном не соединены. Такие двухнитевые молекулы РНК, образованные двумя отдельными нитями, называют "малыми интерферирующими РНК" или "короткими интерферирующими РНК" (siRNA). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат siRNA.

[0017] Если две по сути комплементарные нити dsRNA образованы отдельными молекулами РНК, эти молекулы не обязательно должны, но могут быть ковалентно соединены. Если две нити ковалентно соединены иным способом, чем образование непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной нити и 5'-концом соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединяющую структуру называют "линкером". Нити РНК могут иметь одинаковое или разное количество нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований в дуплексе соответствует количеству нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA за вычетом любых "липких" концов, которые присутствуют в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре конструкция для RNAi может содержать один или несколько нуклеотидных "липких" концов.

[0018] В других вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить, которые гибридизируются с образованием дуплексного участка, могут быть частью одиночной молекулы РНК, т. е. смысловая и антисмысловая нити являются частью самокомплементарного участка одиночной молекулы РНК. В таких случаях одиночная молекула РНК содержит дуплексный участок (также называемый стеблевым участком) и петлевой участок. 3'-конец смысловой нити соединяется с 5'-концом антисмысловой нити непрерывной последовательностью неспаренных нуклеотидов, которые будут образовывать петлевой участок. Петлевой участок обычно имеет длину, достаточную для того, чтобы обеспечить молекуле РНК возможность самосворачивания так, чтобы антисмысловая нить могла образовывать пары оснований со смысловой нитью, образуя дуплекс или стеблевой участок. Петлевой участок может содержать от приблизительно 3 до приблизительно 25, от приблизительно 5 до приблизительно 15 или от приблизительно 8 до приблизительно 12 неспаренных нуклеотидов. Такие молекулы РНК с по меньшей мере частично самокомплементарными участками называют "короткими шпильковыми РНК" (shRNA). В некоторых вариантах осуществления петлевой участок может содержать по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 или 25 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлевой участок может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или меньше неспаренных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат shRNA. Длина одиночной по меньшей мере частично самокомплементарной молекулы РНК может составлять от приблизительно 35 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно

45 нуклеотидов до приблизительно 85 нуклеотидов или от приблизительно 50 нуклеотидов до приблизительно 60 нуклеотидов, и она содержит дуплексный участок и петлевой участок, каждый из которых имеет длину, упоминаемую в данном документе.

[0019] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению содержат смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок, имеющий последовательность, которая по сути или полностью комплементарна последовательности матричной РНК (мРНК) HSD17B13. Как используется в данном документе, "последовательность мРНК HSD17B13" относится к любой последовательности матричной РНК, включая сплайс-варианты, кодирующие белок HSD17B13, в том числе варианты или изоформы белка HSD17B13 из любых видов (например, мыши, крысы, отличного от человека примата, человека).

[0020] Последовательность мРНК HSD17B13 также включает последовательность транскрипта, экспрессируемую в виде соответствующей ей последовательности комплементарной ДНК (кДНК). Последовательность кДНК относится к последовательности мРНК-транскрипта, экспрессируемой в виде оснований ДНК (например, гуанина, аденина, тимина и цитозина), а не оснований РНК (например, гуанина, аденина, урацила и цитозина). Таким образом, антисмысловая нить конструкций для RNAi по настоящему изобретению может содержать участок, имеющий последовательность, которая по сути или полностью комплементарна последовательности мРНК-мишени HSD17B13 или последовательности кДНК-мишени HSD17B13. Последовательность мРНК или кДНК HSD17B13 может включать без ограничения любую последовательность мРНК или кДНК HSD17B13, такую как те, которые могут быть получены из эталонной последовательности из NCBI NM_178135.4 или NM_001136230.2.

[0021] Участок антисмысловой нити может быть по сути комплементарен или полностью комплементарен по меньшей мере 15 последовательным нуклеотидам из последовательности мРНК HSD17B13. В некоторых вариантах осуществления участок-мишень последовательности мРНК HSD17B13, участок комплементарности к которому содержит антисмысловая нить, может иметь размер в диапазоне от приблизительно 15 до приблизительно 30 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 16 до приблизительно 28 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 18 до приблизительно 26 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 17 до приблизительно 24 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 25 последовательных нуклеотидов, от приблизительно 19 до приблизительно 23 последовательных нуклеотидов или от приблизительно 19 до приблизительно 21 последовательного нуклеотида. В определенных вариантах осуществления участок антисмысловой нити, содержащий последовательность, которая по сути или полностью комплементарна последовательности мРНК HSD17B13, в некоторых вариантах осуществления может содержать по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из антисмысловой последовательности, представленной в таблице 1 или таблице 2. В других вариантах осуществления антисмысловая последовательность

содержит по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18 или по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов из антисмысловой последовательности, представленной в таблице 1 или таблице 2. В некоторых вариантах осуществления смысловая и/или антисмысловая последовательность содержит по меньшей мере 15 нуклеотидов из последовательности, представленной в таблице 1 или таблице 2, с не более чем 1, 2 или 3 ошибочно спаренными нуклеотидами.

[0022] Смысловая нить конструкции для RNAi обычно содержит последовательность, которая в достаточной степени комплементарна последовательности антисмысловой нити, так что две нити гибридизируются в физиологических условиях с образованием дуплексного участка. "Дуплексный участок" относится к участку в двух комплементарных или по сути комплементарных полинуклеотидах, которые образуют пары оснований друг с другом посредством образования уотсон-криковских пар оснований либо посредством другого взаимодействия с образованием водородных связей, создавая дуплекс между двумя полинуклеотидами. Дуплексный участок конструкции для RNAi должен иметь достаточную длину для обеспечения возможности вхождения конструкции для RNAi в путь РНК-интерференции, например, посредством взаимодействия с ферментом Dicer и/или комплексом RISC. Например, в некоторых вариантах осуществления дуплексный участок имеет длину от приблизительно 15 до приблизительно 30 пар оснований. Другие значения длины дуплексного участка в данном диапазоне также являются подходящими, такие как от приблизительно 15 до приблизительно 28 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 26 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 24 пар оснований, от приблизительно 15 до приблизительно 22 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 28 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 26 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 24 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 23 пар оснований, от приблизительно 17 до приблизительно 21 пары оснований, от приблизительно 19 до приблизительно 25 пар оснований, от приблизительно 19 до приблизительно 23 пар оснований или от приблизительно 19 до приблизительно 21 пары оснований. В одном варианте осуществления дуплексный участок имеет длину от приблизительно 17 до приблизительно 24 пар оснований. В другом варианте осуществления дуплексный участок имеет длину от приблизительно 19 до приблизительно 21 пары оснований.

[0023] В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi по настоящему изобретению содержит дуплексный участок длиной от приблизительно 24 до приблизительно 30 нуклеотидов, который взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени HSD17B13, направляя расщепление РНК-мишени. Не желая ограничиваться теорией, полагают, что длинная двухнитевая РНК, вводимая в клетки, может быть разрушена до siRNA посредством эндонуклеазы III типа, известной как Dicer (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Dicer, представляющий собой фермент, подобный рибонуклеазе III, осуществляет процессинг

dsRNA с образованием коротких интерферирующих РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными 3'-"липкими" концами из двух оснований (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363). Затем siRNA встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз расплетают дуплекс siRNA, что позволяет комплементарной антисмысловой нити направлять распознавание мишени (Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309). При связывании с соответствующей мРНК-мишенью одна или несколько эндонуклеаз в составе RISC расщепляют мишень с индуцированием сайленсинга (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15: 188).

[0024] Для тех вариантов осуществления, в которых смысловая нить и антисмысловая нить являются двумя отдельными молекулами (например, в том случае, когда конструкция для RNAi содержит siRNA), смысловая нить и антисмысловая нить не обязательно должны быть такой же длины, как длина дуплексного участка. Например, одна или обе нити могут быть длиннее дуплексного участка и содержать один или несколько неспаренных нуклеотидов или ошибок спаривания, фланкирующих дуплексный участок. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный "липкий" конец. Как используется в данном документе, "нуклеотидный "липкий" конец" относится к неспаренному нуклеотиду или нуклеотидам, которые выступают за пределы дуплексного участка на концах нитей. Нуклеотидные "липкие" концы обычно образуются в том случае, когда 3'-конец одной нити выступает за пределы 5'-конца другой нити, или когда 5'-конец одной нити выступает за пределы 3'-конца другой нити. Длина нуклеотидного "липкого" конца обычно составляет от 1 до 6 нуклеотидов, от 1 до 5 нуклеотидов, от 1 до 4 нуклеотидов, от 1 до 3 нуклеотидов, от 2 до 6 нуклеотидов, от 2 до 5 нуклеотидов или от 2 до 4 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидный "липкий" конец содержит 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В одном конкретном варианте осуществления нуклеотидный "липкий" конец содержит от 1 до 4 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотидный "липкий" конец содержит 2 нуклеотида. Нуклеотиды в составе "липкого" конца могут представлять собой рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или модифицированные нуклеотиды, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления "липкий" конец содержит динуклеотид 5'-уридин-уридин-3' (5'-UU-3'). В таких вариантах осуществления динуклеотид UU может содержать рибонуклеотиды или модифицированные нуклеотиды, например, 2'-модифицированные нуклеотиды. В других вариантах осуществления "липкий" конец содержит динуклеотид 5'-дезокситимидин-дезокситимидин-3' (5'-dTdT-3').

[0025] Нуклеотидный "липкий" конец может находиться на 5'-конце или 3'-конце одной или обеих нитей. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный "липкий" конец на 5'-конце и на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный "липкий" конец на 5'-конце и на 3'-конце смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный "липкий" конец на 5'-

конце смысловой нити и на 5'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный "липкий" конец на 3'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити.

[0026] Конструкции для RNAi могут содержать один нуклеотидный "липкий" конец на одном конце двухнитевой молекулы РНК и "тупой" конец на другом. "Тупой" конец" означает, что смысловая нить и антисмысловая нить полностью спарены по основаниям на конце молекулы и что неспаренные нуклеотиды, которые выступают за пределы дуплексного участка, отсутствуют. В некоторых вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный "липкий" конец на 3'-конце смысловой нити и "тупой" конец на 5'-конце смысловой нити и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит нуклеотидный "липкий" конец на 3'-конце антисмысловой нити и "тупой" конец на 5'-конце антисмысловой нити и на 3'-конце смысловой нити. В определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит "тупой" конец на обоих концах двухнитевой молекулы РНК. В таких вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину, а дуплексный участок имеет такую же длину, как смысловая и антисмысловая нити (т. е. молекула является двухнитевой по всей ее длине).

[0027] Каждая из смысловой нити и антисмысловой нити может независимо иметь длину от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов, длину от приблизительно 18 до приблизительно 28 нуклеотидов, длину от приблизительно 19 до приблизительно 27 нуклеотидов, длину от приблизительно 19 до приблизительно 25 нуклеотидов, длину от приблизительно 19 до приблизительно 23 нуклеотидов, длину от приблизительно 21 до приблизительно 25 нуклеотидов или длину от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити составляет приблизительно 18, приблизительно 19, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24 или приблизительно 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить имеют одинаковую длину, но образуют дуплексный участок, который короче данных нитей, так что конструкция для RNAi содержит два нуклеотидных "липких" конца. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид, (ii) дуплексный участок, имеющий длину 19 пар оснований, и (iii) нуклеотидные "липкие" концы из 2 неспаренных нуклеотидов как на 3'-конце смысловой нити, так и на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 23 нуклеотида, (ii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований, и (iii) нуклеотидные "липкие" концы из 2 неспаренных нуклеотидов как на 3'-конце смысловой нити, так и на 3'-конце антисмысловой нити. В других вариантах осуществления смысловая нить и

антисмысловая нить имеют одинаковую длину и образуют дуплексный участок по всей их длине, так что на обоих концах двухнитевой молекулы отсутствуют нуклеотидные "липкие" концы. В одном таком варианте осуществления конструкция для RNAi имеет "тупые" концы и содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 21 нуклеотид, и (ii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований. В другом таком варианте осуществления конструкция для RNAi имеет "тупые" концы и содержит (i) смысловую нить и антисмысловую нить, каждая из которых имеет длину 23 нуклеотида, и (ii) дуплексный участок, имеющий длину 23 пары оснований.

[0028] В других вариантах осуществления смысловая нить или антисмысловая нить длиннее другой нити, и при этом две нити образуют дуплексный участок, длина которого равна длине более короткой нити, так что конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный "липкий" конец. Например, в одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить длиной 19 нуклеотидов, (ii) антисмысловую нить длиной 21 нуклеотид, (iii) дуплексный участок, имеющий длину 19 пар оснований, и (iv) один нуклеотидный "липкий" конец из 2 неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит (i) смысловую нить длиной 21 нуклеотид, (ii) антисмысловую нить длиной 23 нуклеотида, (iii) дуплексный участок, имеющий длину 21 пара оснований, и (iv) один нуклеотидный "липкий" конец из 2 неспаренных нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой нити.

[0029] Антисмысловая нить конструкций для RNAi по настоящему изобретению может содержать последовательность из любой из антисмысловых последовательностей, представленных в таблице 1 или таблице 2, или последовательность нуклеотидов 1-19 из любой из данных антисмысловых последовательностей. Каждая из антисмысловых последовательностей, представленных в таблицах 1 и 6, содержит последовательность из 19 последовательных нуклеотидов (первых 19 нуклеотидов, считая с 5'-конца), которая комплементарна последовательности мРНК HSD17B13, и последовательность нуклеотидного "липкого" конца из двух нуклеотидов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит последовательность нуклеотидов 1-19 из любой из SEQ ID NO: 1-646 или 648-1292.

Модифицированные нуклеотиды

[0030] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов. "Модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, который имеет одну или несколько химических модификаций нуклеозида, нуклеинового основания, пентозного кольца или фосфатной группы. Как используется в данном документе, модифицированные нуклеотиды не охватывают рибонуклеотиды, содержащие аденозинмонофосфат, гуанозинмонофосфат, уридинмонофосфат и цитидинмонофосфат, и дезоксирибонуклеотиды, содержащие дезоксиаденозинмонофосфат, дезоксигуанозинмонофосфат, дезокситимидинмонофосфат и дезоксицитидинмонофосфат. Однако конструкции для RNAi могут содержать

комбинации модифицированных нуклеотидов, рибонуклеотидов и дезоксирибонуклеотидов. Встраивание модифицированных нуклеотидов в одну или обе нити двухнитевых молекул РНК может улучшать стабильность молекул РНК *in vivo*, например, благодаря снижению восприимчивости молекул к нуклеазам и другим процессам разрушения. Активность конструкций для RNAi в отношении снижения экспрессии гена-мишени также можно повысить путем встраивания модифицированных нуклеотидов.

[0031] В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды имеют модификацию рибозного сахара. Данные модификации сахара могут включать модификации в 2'- и/или 5'-положении пентозного кольца, а также бициклические модификации сахара. 2'-модифицированный нуклеотид относится к нуклеотиду, имеющему пентозное кольцо с заместителем в 2'-положении, отличным от H или OH. Такие 2'-модификации включают без ограничения 2'-O-алкил (например, O-C1-C10- или замещенный O-C1-C10-алкил), 2'-O-аллил (O-CH₂CH=CH₂), 2'-C-аллил, 2'-фтор, 2'-O-метил (OCH₃), 2'-O-метоксиэтил (O-(CH₂)₂OCH₃), 2'-OCF₃, 2'-O(CH₂)₂SCH₃, 2'-O-аминоалкил, 2'-амино (например, NH₂), 2'-O-этиламин и 2'-азидо. Модификации в 5'-положении пентозного кольца включают без ограничения 5'-метил (R или S); 5'-винил и 5'-метокси.

[0032] "Бициклическая модификация сахара" относится к модификации пентозного кольца, при которой мостик соединяет два атома кольца с образованием второго кольца, что приводит в результате к образованию бициклической структуры сахара. В некоторых вариантах осуществления бициклическая модификация сахара предусматривает мостик между 4'- и 2'-атомами углерода пентозного кольца. Нуклеотиды, содержащие сахарный фрагмент с бициклической модификацией сахара, называются в данном документе бициклическими нуклеиновыми кислотами или BNA. Иллюстративные бициклические модификации сахара включают без ограничения α-L-метиленокси- (4'-CH₂-O-2') бициклическую нуклеиновую кислоту (BNA); β-D-метиленокси- (4'-CH₂-O-2') BNA (также называемую запертой нуклеиновой кислотой или LNA); этиленокси- (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA; аминокси- (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA; оксиамино- (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA; метил(метиленокси)- (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (также называемую конформационно затрудненную этилом или cEt); метилентио- (4'-CH₂-S-2') BNA; метиленамино- (4'-CH₂-N(R)-2') BNA; метилкарбоциклическую (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA; пропиленкарбоциклическую (4'-(CH₂)₃-2') BNA и метокси(этиленокси)- (4'-CH(CH₂OMe)-O-2') BNA (также называемую конформационно затрудненной MOE или cMOE). Эти и другие нуклеотиды с модифицированными сахарами, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патенте США № 9181551, в публикации заявки на патент США № 2016/0122761 и у Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, Vol. 19: 937-954, 2012, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0033] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат

один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метоксиэтил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-аллил-модифицированных нуклеотидов, бициклических нуклеиновых кислот (BNA), гликолевых нуклеиновых кислот или их комбинации. В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метоксиэтил-модифицированных нуклеотидов или их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления конструкции для RNAi содержат один или несколько 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов или их комбинации.

[0034] Как смысловые, так и антисмысловые нити конструкций для RNAi могут содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше модифицированных нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше модифицированных нуклеотидов. В других вариантах осуществления все нуклеотиды в антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В определенных других вариантах осуществления все нуклеотиды в смысловой нити и все нуклеотиды в антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды. В этих и других вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды могут представлять собой 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

[0035] В некоторых вариантах осуществления все пиримидиновые нуклеотиды, предшествующие аденозинному нуклеотиду в смысловой нити, антисмысловой нити или в обеих нитях, представляют собой модифицированные нуклеотиды. Например, в случае, если в любой из двух нитей появляется последовательность 5'-CA-3' или 5'-UA-3', цитидиновые и уридиновые нуклеотиды представляют собой модифицированные нуклеотиды, предпочтительно 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды. В определенных вариантах осуществления все пиримидиновые нуклеотиды в смысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды (например, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды), и 5'-нуклеотиды во всех случаях появления последовательности 5'-CA-3' или 5'-UA-3' в антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды (например, 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды). В других вариантах осуществления все нуклеотиды в дуплексном участке представляют собой модифицированные нуклеотиды. В таких вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды предпочтительно представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

[0036] В вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит

нуклеотидный "липкий" конец, нуклеотиды в "липком" конце могут представлять собой рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды или модифицированные нуклеотиды. В одном варианте осуществления нуклеотиды в "липком" конце представляют собой дезоксирибонуклеотиды, например, дезокситимидин. В другом варианте осуществления нуклеотиды в "липком" конце представляют собой модифицированные нуклеотиды. Например, в некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в "липком" конце представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды, 2'-метоксиэтил-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

[0037] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут также содержать одну или несколько модифицированных межнуклеотидных связей. Используемый в данном документе термин "модифицированная межнуклеотидная связь" относится к межнуклеотидной связи, отличной от природной 3'-5'-фосфодиэфирной связи. В некоторых вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой фосфорсодержащую межнуклеотидную связь, такую как фосфотриэфирная, аминоалкилфосфотриэфирная, алкилфосфонатная (например, метилфосфонатная, 3'-алкиленфосфонатная), фосфинатная, фосфорамидатная (например, 3'-аминофосфорамидатная и аминоалкилфосфорамидатная), фосфотиоатная (P=S), хиральная фосфотиоатная, фосфодитиоатная, тионофосфорамидатная, тионоалкилфосфонатная, тионоалкилфосфотриэфирная и боранофосфатная. В одном варианте осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой 2'-5'-фосфодиэфирную связь. В других вариантах осуществления модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой не содержащую фосфор межнуклеотидную связь и, таким образом, может называться модифицированной межнуклеозидной связью. Такие не содержащие фосфор связи включают без ограничения морфолиновые связи (образованные частично из сахарной части нуклеозида); силоксановые связи (-O-Si(H)₂-O-); сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые связи; формацетильные и тиоформацетильные связи; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленметиляминовые (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-) и метиленгидразиновые связи; сульфонатные и сульфонамидные связи; амидные связи и другие, имеющие смешанные составные части из N, O, S и CH₂. В одном варианте осуществления модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой пептидную связь (например, аминоксилотную) для создания пептидной нуклеиновой кислоты или PNA, такой как описанные в патентах США №№ 5539082; 5714331 и 5719262. Другие подходящие модифицированные межнуклеотидные и межнуклеозидные связи, которые могут использоваться в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патенте США № 6693187, патенте США № 9181551, публикации заявки на патент США № 2016/0122761 и у Deleavey and Damha, Chemistry and Biology, Vol. 19: 937-954, 2012, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0038] В определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi содержат

одну или несколько фосфотиоатных межнуклеотидных связей. Фосфотиоатные межнуклеотидные связи могут присутствовать в смысловой нити, антисмысловой нити или в обеих нитях конструкций для RNAi. Например, в некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В других вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В еще нескольких других вариантах осуществления обе нити содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или больше фосфотиоатных межнуклеотидных связей. Конструкции для RNAi могут содержать одну или несколько фосфотиоатных межнуклеотидных связей на 3'-конце, 5'-конце или как на 3'-, так и на 5'-концах смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. Например, в определенных вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит от приблизительно 1 до приблизительно 6 или больше (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) последовательных фосфотиоатных межнуклеотидных связей на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В других вариантах осуществления конструкция для RNAi содержит от приблизительно 1 до приблизительно 6 или больше (например, приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6 или больше) последовательных фосфотиоатных межнуклеотидных связей на 5'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь на 3'-конце смысловой нити и одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь на 3'-конце антисмысловой нити. В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце антисмысловой нити (т. е. фосфотиоатную межнуклеотидную связь на месте первой и второй межнуклеотидных связей на 3'-конце антисмысловой нити). В другом варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфотиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфотиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-конце антисмысловой нити и две последовательные фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце смысловой нити. В еще одном варианте осуществления конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфотиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-конце антисмысловой нити и две последовательных фосфотиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-конце смысловой нити (т. е. фосфотиоатную межнуклеотидную связь на месте первой и второй межнуклеотидных связей как на 5'-, так и на 3'-конце антисмысловой нити и фосфотиоатную межнуклеотидную связь на месте первой и второй межнуклеотидных связей как на 5'-, так и на 3'-конце смысловой нити). В любом из вариантов осуществления, в котором одна или обе нити содержат одну или несколько фосфотиоатных межнуклеотидных связей, остальные межнуклеотидные связи в нитях могут представлять собой природные 3'-5'-фосфодиэфирные связи. Например, в некоторых вариантах осуществления каждая межнуклеотидная связь в смысловой и

антисмысловой нитях выбрана из фосфодиэфирной и фосфотиоатной, где по меньшей мере одна межнуклеотидная связь является фосфотиоатной.

[0039] В вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит нуклеотидный "липкий" конец, два или более неспаренных нуклеотида в "липком" конце могут быть соединены фосфотиоатной межнуклеотидной связью. В определенных вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в нуклеотидном "липком" конце на 3'-конце антисмысловой нити и/или смысловой нити соединены фосфотиоатными межнуклеотидными связями. В других вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в нуклеотидном "липком" конце на 5'-конце антисмысловой нити и/или смысловой нити соединены фосфотиоатными межнуклеотидными связями. В еще нескольких других вариантах осуществления все неспаренные нуклеотиды в любом нуклеотидном "липком" конце соединены фосфотиоатными межнуклеотидными связями.

[0040] В определенных вариантах осуществления модифицированные нуклеотиды, встроенные в одну или обе нити конструкций для RNAi по настоящему изобретению, имеют модификацию нуклеинового основания (также называемого в данном документе как "основание"). "Модифицированное нуклеиновое основание" или "модифицированное основание" относится к основанию, отличному от встречающихся в природе пуриновых оснований аденина (A) и гуанина (G) и пиримидиновых оснований тимина (T), цитозина (C) и урацила (U). Модифицированные нуклеиновые основания могут представлять собой синтетические или встречающиеся в природе модификации и включают без ограничения универсальные основания, 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин (X), гипоксантин (I), 2-аминоаденин, 6-метиладенин, 6-метилгуанин и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропильные и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезазагуанин и 7-дезазааденин и 3-дезазагуанин и 3-дезазааденин, а также остатки с удаленными азотистыми основаниями (апуриновые/апиримидиновые остатки, в которых отсутствует пуриновое или пиримидиновое основание, отсутствует нуклеотидное основание в положении 1 рибозного сахара) и инвертированные нуклеотиды (нуклеотиды, имеющие 3'-3'-связь, которые могут представлять собой инвертированные нуклеотиды из любого из перечисленного выше, включая инвертированные нуклеотиды с удаленными азотистыми основаниями и инвертированные дезоксинуклеотиды).

[0041] В некоторых вариантах осуществления модифицированное основание представляет собой универсальное основание. "Универсальное основание" относится к аналогу основания, который неизбирательно образует пары оснований со всеми природными основаниями в РНК и ДНК без изменения структуры двойной спирали у

образующегося в результате дуплексного участка. Универсальные основания известны специалистам в данной области и включают без ограничения инозин, С-фенил, С-нафтил и другие ароматические производные, азолкарбоксамиды и нитроазольные производные, такие как 3-нитропиррол, 4-нитроиндол, 5-нитроиндол и 6-нитроиндол.

[0042] Другие подходящие модифицированные основания, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, включают те, которые описаны в Herdewijn, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, Vol. 10:297-310, 2000 и Peacock et al., *J. Org. Chem.*, Vol. 76: 7295-7300, 2011, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимин и урацил могут быть замещены другими нуклеиновыми основаниями, такими как модифицированные нуклеиновые основания, описанные выше, без существенного изменения свойств образования пар оснований у полинуклеотида, содержащего нуклеотид с таким замещенным нуклеиновым основанием.

[0043] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению 5'-конец смысловой нити, антисмысловой нити или как антисмысловой, так и смысловой нитей содержит фосфатный фрагмент. Используемый в данном документе термин "фосфатный фрагмент" относится к концевой фосфатной группе, которая включает в себя немодифицированные фосфаты ($-O-P=O(OH)OH$), а также модифицированные фосфаты. Модифицированные фосфаты включают фосфаты, в которых одна или несколько групп О и ОН замещены Н, О, S, N (R) или алкилом, где R представляет собой Н, защитную группу для аминогруппы или незамещенный или замещенный алкил. Иллюстративные фосфатные фрагменты включают без ограничения 5'-монофосфат; 5'-дифосфат; 5'-трифосфат; 5'-гуанозиновый кэп (7-метилированный или неметилированный); 5'-аденозиновый кэп или любую другую модифицированную или немодифицированную нуклеотидную кэп-структуру; 5'-монотиофосфат (фосфотиоат); 5'-монодитиофосфат (фосфодитиоат); 5'-альфа-тиотрифосфат; 5'-гамма-тиотрифосфат, 5'-фосфорамидаты; 5'-винилфосфаты; 5'-алкилфосфонаты (например, алкил=метил, этил, изопропил, пропил и т. д.) и 5'-алкилэфирфосфонаты (например, алкилэфир=метоксиметил, этоксиметил и т. д.).

[0044] Модифицированные нуклеотиды, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, могут иметь более одной химической модификации из описанных в данном документе. Например, модифицированный нуклеотид может иметь модификацию рибозного сахара, а также модификацию нуклеинового основания. В качестве примера модифицированный нуклеотид может содержать 2'-модификацию сахара (например, 2'-фтор и 2'-метил) и содержать модифицированное основание (например, 5-метилцитозин или псевдоурацил). В других вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара в комбинации с модификацией 5'-фосфата, что будет обуславливать образование модифицированной межнуклеотидной или межнуклеозидной связи при встраивании модифицированного нуклеотида в полинуклеотид. Например, в некоторых вариантах

осуществления модифицированный нуклеотид может содержать модификацию сахара, такую как 2'-фтор-модификация, 2'-О-метил-модификация или бициклическая модификация сахара, а также 5'-фосфотиоатную группу. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления одна или обе нити конструкций для RNAi по настоящему изобретению содержат комбинацию 2'-модифицированных нуклеотидов или BNA и фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В определенных вариантах осуществления как смысловые, так и антисмысловые нити конструкций для RNAi по настоящему изобретению содержат комбинацию 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, 2'-О-метил-модифицированных нуклеотидов и фосфотиоатных межнуклеотидных связей. Иллюстративные конструкции для RNAi, содержащие модифицированные нуклеотиды и межнуклеотидные связи, показаны в таблице 2.

Функционирование конструкций для RNAi

[0045] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению предпочтительно снижают или подавляют экспрессию HSD17B13 в клетках, в частности в клетках печени. Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ снижения экспрессии HSD17B13 в клетке путем приведения клетки в контакт с любой конструкцией для RNAi, описанной в данном документе. Клетка может находиться в условиях *in vitro* или *in vivo*. Экспрессию HSD17B13 можно оценивать путем измерения количества или уровня мРНК HSD17B13, белка HSD17B13 или другого биомаркера, связанного с экспрессией HSD17B13. Снижение экспрессии HSD17B13 в клетках или у животных, обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению, можно определить по сравнению с экспрессией HSD17B13 в клетках или у животных, не обработанных конструкцией для RNAi либо обработанных контрольной конструкцией для RNAi. Например, в некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии HSD17B13 оценивают путем (а) измерения количества или уровня мРНК HSD17B13 в клетках печени, обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению, (b) измерения количества или уровня мРНК HSD17B13 в клетках печени, обработанных контрольной конструкцией для RNAi (например, конструкцией для RNAi, направленной на молекулу РНК, не экспрессируемую в клетках печени, или конструкцией для RNAi, имеющей нонсенс- или скремблированную последовательность) или не обработанных конструкцией, и (с) сравнения измеренных уровней мРНК HSD17B13 в обработанных клетках из (а) с измеренными уровнями мРНК HSD17B13 в контрольных клетках из (b). Уровни мРНК HSD17B13 в обработанных клетках и в контрольных клетках перед сравнением могут быть нормализованы относительно уровней РНК контрольного гена (например, 18S рибосомальной РНК). Уровни мРНК HSD17B13 можно измерять с помощью различных методик, включая нозерн-блот-анализ, анализы защиты от действия нуклеаз, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), ПЦР с обратной транскриптазой ((RT)-PCR), ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR), количественную ПЦР и т. п.

[0046] В других вариантах осуществления снижение экспрессии HSD17B13 оценивают путем (а) измерения количества или уровня белка HSD17B13 в клетках печени,

обработанных конструкцией для RNAi по настоящему изобретению, (b) измерения количества или уровня белка HSD17B13 в клетках печени, обработанных контрольной конструкцией для RNAi (например, конструкцией для RNAi, направленной на молекулу РНК, не экспрессируемую в клетках печени, или конструкцией для RNAi, имеющей нонсенс- или скремблированную последовательность) или не обработанных конструкцией, и (c) сравнения измеренных уровней белка HSD17B13 в обработанных клетках из (a) с измеренными уровнями белка HSD17B13 в контрольных клетках из (b). Методики измерения уровней белка HSD17B13 известны специалистам в данной области и включают вестерн-блоттинг, иммунологические анализы (например, ELISA) и проточную цитометрию. Иллюстративная методика цифровой капельной ПЦР для оценки экспрессии белка HSD17B13 описана в примере 2. Для оценки эффективности конструкций для RNAi по настоящему изобретению можно применять любую методику, дающую возможность измерять уровень мРНК или белка HSD17B13.

[0047] В некоторых вариантах осуществления методики оценки уровней экспрессии HSD17B13 выполняют *in vitro* в клетках, которые в нативном состоянии экспрессируют HSD17B13 (например, в клетках печени), или в клетках, которые были сконструированы таким образом, что они экспрессируют HSD17B13. В определенных вариантах осуществления методики проводят *in vitro* в клетках печени. Подходящие клетки печени включают без ограничения первичные гепатоциты (например, гепатоциты человека, отличных от человека приматов или грызунов), клетки HepAD38, клетки HuH-6, клетки HuH-7, клетки HuH-5-2, клетки BNLCL2, клетки Hep3B или клетки HepG2.

[0048] В других вариантах осуществления методики оценки уровней экспрессии HSD17B13 проводят *in vivo*. Можно вводить конструкции для RNAi и любые контрольные конструкции для RNAi животному (например, грызуну или отличному от человека примату) и оценивать уровни мРНК или белка HSD17B13 в ткани печени, собранной у животного после обработки. В качестве альтернативы или дополнительно биомаркер или функциональный фенотип, ассоциированный с экспрессией HSD17B13, можно оценивать у животных, подвергнутых обработке.

[0049] В определенных вариантах осуществления экспрессия HSD17B13 снижается в клетках печени на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45% или по меньшей мере 50% благодаря конструкции для RNAi по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления экспрессия HSD17B13 снижается в клетках печени на по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 85% благодаря конструкции для RNAi по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления экспрессия HSD17B13 снижается в клетках печени на приблизительно 90% или больше, например, на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше, благодаря конструкции для RNAi по настоящему изобретению. Процент снижения экспрессии HSD17B13 можно измерять посредством любых методик,

описанных в данном документе, а также других методик, известных из уровня техники. Например, в определенных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению подавляют экспрессию HSD17B13 на по меньшей мере 70% при 5 нМ в первичных клетках печени (экспрессирующих HSD17B13 дикого типа) *in vitro*. В связанных вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению подавляют экспрессию HSD17B13 на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 75% при 5 нМ *in vitro*. В других вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению подавляют экспрессию HSD17B13 на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 96% или по меньшей мере 98% при 5 нМ в первичных гепатоцитах *in vitro*. Снижение уровня HSD17B13 можно измерять с помощью различных методик, в том числе FISH РНК или цифровой капельной ПЦР, как это описано в примере 2.

[0050] В некоторых вариантах осуществления значение IC₅₀ рассчитывают для оценки активности конструкции для RNAi по настоящему изобретению в отношении подавления экспрессии HSD17B13 в клетках печени. "Значение IC₅₀" означает дозу/концентрацию, необходимую для достижения 50% подавления биологической или биохимической функции или уровня. Значение IC₅₀ для любого конкретного вещества или антагониста можно определить путем построения кривой зависимости "доза-ответ" и изучения эффекта различных концентраций вещества или антагониста в отношении уровней экспрессии или функциональной активности в любом анализе. Значения IC₅₀ можно рассчитать для данного антагониста или вещества путем определения концентрации, необходимой для подавления половины максимального биологического ответа или уровней нативной экспрессии. Таким образом, значение IC₅₀ для любой конструкции для RNAi можно рассчитать путем определения концентрации конструкции для RNAi, необходимой для подавления половины уровня нативной экспрессии HSD17B13 в клетках печени (например, уровня экспрессии HSD17B13 в контрольных клетках печени), в любом анализе, таком как иммунологический анализ, или анализ FISH РНК, или анализы методом цифровой капельной ПЦР, которые описаны в примерах. Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут подавлять экспрессию HSD17B13 в клетках печени (например, в первичных гепатоцитах) при IC₅₀, составляющей менее чем приблизительно 40 нМ. Например, конструкции для RNAi подавляют экспрессию HSD17B13 в клетках печени при IC₅₀, составляющей от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 40 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 30 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 20 нМ, от приблизительно 0,001 нМ до приблизительно 15 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 10 нМ, от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 5 нМ или от приблизительно 0,1 нМ до приблизительно 1 нМ.

[0051] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению можно легко получить с помощью методик, известных из уровня техники, например, с помощью традиционного

твердофазного синтеза нуклеиновых кислот. Полинуклеотиды конструкций для RNAi можно собирать на подходящем синтезаторе нуклеиновых кислот с использованием стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов (например, фосфорамидитов). Автоматизированные синтезаторы нуклеиновых кислот реализуются на коммерческой основе несколькими поставщиками, в том числе синтезаторы ДНК/РНК от Applied Biosystems (Фостер-Сити, Калифорния), синтезаторы MerMade от BioAutomation (Ирвинг, Техас) и синтезаторы OligoPilot от GE Healthcare Life Sciences (Питтсбург, Пенсильвания).

[0052] Для синтеза олигонуклеотидов посредством фосфорамидитной химии можно использовать 2'-силильную защитную группу в сочетании с кислотолабильным диметокситритилом (DMT) в 5'-положении рибонуклеозидов. Известно, что условия удаления защитной группы на конечном этапе не приводят к значительному разрушению РНК-продуктов. Все процессы синтеза можно проводить в любом автоматическом или ручном синтезаторе в большом, среднем или малом масштабе. Синтез также можно проводить в многолуночных планшетах, колонках или на предметных стеклах.

[0053] 2'-О-силильную группу можно удалить путем воздействия фторид-ионов, которые могут предусматривать любой источник фторид-иона, например, те соли, которые содержат фторид-ион в паре с неорганическими противоионами, например, фторид цезия и фторид калия, или те соли, которые содержат фторид-ион в паре с органическим противоионом, например, фторид тетраалкиламмония. В реакции удаления защитной группы можно использовать краун-эфирный катализатор в комбинации с неорганическим фторидом. Предпочтительным источником фторид-ионов являются фторид тетрабутиламмония или аминокислоты (например, объединение водного HF с триэтиламином в диполярном апротонном растворителе, например, диметилформамиде).

[0054] Выбор защитных групп для использования в сложных фосфиттриэфирах и сложных фосфотриэфирах может привести к изменению стабильности сложных триэфиров по отношению к фтору. Защита сложного фосфотриэфира или сложного фосфиттриэфира с помощью метильной группы может стабилизировать связь против фторид-ионов и улучшить технологический выход процесса.

[0055] Поскольку рибонуклеозиды имеют реакционноспособный 2'-гидроксильный заместитель, может быть желательной защита реакционноспособного 2'-положения в РНК защитной группой, которая является ортогональной по отношению к 5'-О-диметокситритильной защитной группе, например, стабильной к обработке кислотой. Силильные защитные группы соответствуют этому критерию и могут быть легко удалены на конечной стадии удаления защитной группы с помощью фторида, что может приводить к минимальному разрушению РНК.

[0056] В стандартной реакции фосфорамидитного сочетания можно использовать тетразольные катализаторы. Предпочтительные катализаторы включают, например, тетразол, S-этилтетразол, бензилтиотетразол, нитрофенилтетразол.

[0057] Как может быть понятно специалисту в данной области, дополнительные

способы синтеза конструкций для RNAi, описанные в данном документе, будут очевидны средним специалистам в данной области. Кроме того, различные стадии синтеза могут быть выполнены в альтернативных последовательности или порядке с получением требуемых соединений. Другие превращения в рамках синтетической химии, защитные группы (например, для гидроксила, amino и т. д., присутствующие в основаниях) и методики использования защитных групп (введения и удаления защитных групп), применимые при синтезе конструкций для RNAi, описанных в данном документе, известны из уровня техники и включают, например, описанные в R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994) и L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995) и их последующих изданиях. Синтез конструкций для RNAi по индивидуальному заказу также доступен у нескольких коммерческих поставщиков, в том числе от Dharmacon, Inc. (Лафайет, Колорадо), AxoLabs GmbH (Кульмбах, Германия) и Ambion, Inc. (Фостер-Сити, Калифорния).

[0058] Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут содержать лиганд. Как используется в данном документе, "лиганд" относится к любому соединению или любой молекуле, которые способны непосредственно или опосредованно взаимодействовать с другим соединением или молекулой. Взаимодействие лиганда с другим соединением или молекулой может вызывать биологический ответ (например, инициировать каскад передачи сигнала, индуцировать рецепторно-опосредованный эндоцитоз) или может просто представлять собой физическую ассоциацию. Лиганд может модифицировать одно или несколько свойств молекулы двухнитевой РНК, к которой он присоединен, таких как свойства фармакодинамики, фармакокинетики, связывания, всасывания, распределения в клетках, захвата клеткой, заряда и/или клиренса молекулы РНК.

[0059] Лиганд может включать белок сыворотки крови (например, человеческий сывороточный альбумин, липопротейн низкой плотности, глобулин), холестеринный фрагмент, витамин (биотин, витамин Е, витамин В12), фолатный фрагмент, стероид, желчную кислоту (например, холевую кислоту), жирную кислоту (например, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту), углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновую кислоту), гликозид, фосфолипид или антитело или его связывающий фрагмент (например, антитело или связывающий фрагмент, которые нацеливают конструкцию для RNAi на конкретный тип клеток, такой как клетки печени). Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например, EDTA), липофильные молекулы, например, адамантануксусную

кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, 03-(олеоил)литохолевую кислоту, 03-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин, пептиды (например, пептид Antennapedia, пептид Tat, пептиды RGD), алкилирующие средства, полимеры, такие как полиэтиленгликоль (PEG) (например, PEG-40K), полиаминокислоты и полиамины (например, спермин, спермидин).

[0060] В определенных вариантах осуществления лиганды обладают эндосомолитическими свойствами. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту конструкции для RNAi по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой поликатионный пептид или пептидомиметик, который проявляет pH-зависимую активность в отношении мембраны и фузогенность. В одном варианте осуществления эндосомолитический лиганд принимает свою активную конформацию при pH эндосомы. "Активная" конформация является конформацией, при которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспорту конструкции для RNAi по настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, Vol. 26: 2964-2972, 1987), пептид EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 118: 1581-1586, 1996) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, Vol. 1559: 56-68, 2002). В одном варианте осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая подвергается изменению заряда или протонированию в ответ на изменение pH. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

[0061] В некоторых вариантах осуществления лиганд включает в себя липид или другую гидрофобную молекулу. В одном варианте осуществления лиганд включает в себя холестеринный фрагмент или другой стероид. Сообщалось, что конъюгированные с холестерином олигонуклеотиды были более активными, чем их неконъюгированные аналоги (Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Development*, Vol. 12: 103-228, 2002). Лиганды, включающие в себя холестеринные фрагменты и другие липиды для конъюгации с молекулами нуклеиновых кислот, также были описаны в патентах США №№ 7851615; 7745608 и 7833992, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В другом варианте осуществления лиганд включает в себя фолатный фрагмент. Полинуклеотиды, конъюгированные с фолатными фрагментами, могут поглощаться клетками посредством пути рецепторно-опосредованного эндоцитоза. Такие конъюгаты фолат-полинуклеотид описаны в патенте США № 8188247, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0062] С учетом того, что HSD17B13 экспрессируется в клетках печени (например,

в гепатоцитах), в определенных вариантах осуществления желательно специфично доставлять конструкцию для RNAi в эти клетки печени. В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi могут специфично нацеливаться на печень благодаря использованию лигандов, которые связываются или взаимодействуют с белками, экспрессируемыми на поверхности клеток печени. Например, в определенных вариантах осуществления лиганды могут содержать антигенсвязывающие белки (например, антитела или их связывающие фрагменты (например, Fab, scFv)), которые специфично связываются с рецептором, экспрессируемым на гепатоцитах, таким как, например, ASGR1.

[0063] В определенных вариантах осуществления лиганд включает в себя углевод. "Углевод" относится к соединению, состоящему из одного или нескольких моносахаридных звеньев, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (которые могут быть линейными, разветвленными или циклическими), при этом с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы. Углеводы включают без ограничения сахара (например, моносахариды, дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и олигосахариды, содержащие от приблизительно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных звеньев) и полисахариды, такие как разновидности крахмала, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. В некоторых вариантах осуществления углевод, встроенный в лиганд, представляет собой моносахарид, выбранный из пентозы, гексозы или гептозы, и ди- и трисахариды, содержащие такие моносахаридные звенья. В других вариантах осуществления углевод, встроенный в лиганд, представляет собой аминсахар, такой как галактозамин, глюкозамин, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилглюкозамин.

[0064] В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит гексозу или гексозамин. Гексоза может быть выбрана из глюкозы, галактозы, маннозы, фукозы или фруктозы. Гексозамин может быть выбран из фруктозамина, галактозамина, глюкозамина или маннозамина. В определенных вариантах осуществления лиганд содержит глюкозу, галактозу, галактозамин или глюкозамин. В одном варианте осуществления лиганд содержит глюкозу, глюкозамин или N-ацетилглюкозамин. В другом варианте осуществления лиганд содержит галактозу, галактозамин или N-ацетилгалактозамин. В конкретных вариантах осуществления лиганд содержит N-ацетилгалактозамин. Лиганды, содержащие глюкозу, галактозу и N-ацетилгалактозамин (GalNAc), особенно эффективны в нацеливании соединений на клетки печени. См., например, D'Souza and Devarajan, J. Control Release, Vol. 203: 126-139, 2015. Примеры лигандов, содержащих GalNAc или галактозу, которые могут быть встроены в конструкции для RNAi по настоящему изобретению, описаны в патентах США №№ 7491805; 8106022 и 8877917; в публикации заявки на патент США № 20030130186 и публикации WIPO № WO2013166155, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0065] В определенных вариантах осуществления лиганд содержит многовалентный углеводный фрагмент. Как используется в данном документе, "многовалентный углеводный фрагмент" относится к фрагменту, содержащему два или

более углеводных звена, способных независимо связываться или взаимодействовать с другими молекулами. Например, многовалентный углеводный фрагмент содержит два или более связывающих домена, состоящих из углеводов, которые могут связываться с двумя или более различными молекулами или двумя или более различными сайтами на одной и той же молекуле. Валентность углеводного фрагмента обозначает количество отдельных связывающих доменов в углеводном фрагменте. Например, термины "одновалентный", "двухвалентный", "трехвалентный" и "четырёхвалентный", относящиеся к углеводному фрагменту, относятся к углеводным фрагментам с одним, двумя, тремя и четырьмя связывающими доменами соответственно. Многовалентный углеводный фрагмент может включать в себя многовалентный лактозный фрагмент, многовалентный галактозный фрагмент, многовалентный глюкозный фрагмент, многовалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент, многовалентный N-ацетилглюкозаминовый фрагмент, многовалентный маннозный фрагмент или многовалентный фукозный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления лиганд содержит многовалентный галактозный фрагмент. В других вариантах осуществления лиганд содержит многовалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент. В этих и других вариантах осуществления многовалентный углеводный фрагмент является двухвалентным, трехвалентным или четырехвалентным. В таких вариантах осуществления многовалентный углеводный фрагмент может быть двухантенным или трехантенным. В одном конкретном варианте осуществления многовалентный N-ацетилгалактозаминовый фрагмент является трехвалентным или четырехвалентным. В другом конкретном варианте осуществления многовалентный галактозный фрагмент является трехвалентным или четырехвалентным. Иллюстративные трехвалентные и четырехвалентные лиганды, содержащие GalNAc, для встраивания в конструкции для RNAi по настоящему изобретению подробно описаны ниже.

[0066] Лиганд может быть присоединен к молекуле РНК в конструкции для RNAi или конъюгирован с ней непосредственно или опосредованно. Например, в некоторых вариантах осуществления лиганд непосредственно ковалентно присоединен к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi. В других вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен к смысловой или антисмысловой нити конструкции для RNAi посредством линкера. Лиганд может быть присоединен к нуклеиновым основаниям, сахарным фрагментам или межнуклеотидным связям полинуклеотидов (например, смысловой нити или антисмысловой нити) конструкций для RNAi по настоящему изобретению. Конъюгация или присоединение к пуриновым нуклеиновым основаниям или их производным может происходить по любому положению, включая эндоциклические и экзоциклические атомы. В определенных вариантах осуществления 2-, 6-, 7- или 8-положения пуринового нуклеинового основания присоединены к лиганду. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеиновыми основаниями или их производными или присоединение к ним также может происходить по любому положению. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового нуклеинового основания

могут быть присоединены к лиганду. Конъюгация с сахарными фрагментами нуклеотидов или присоединение к ним может происходить по любому атому углерода. Иллюстративные атомы углерода сахарного фрагмента, которые могут быть присоединены к лиганду, включают 2'-, 3'- и 5'-атомы углерода. Атом в 1'-положении также может быть присоединен к лиганду, как, например, в остатке с удаленным азотистым основанием. Межнуклеотидные связи также могут содействовать присоединению лиганда. В случае фосфорсодержащих связей (например, фосфодизфирной, фосфотиоатной, фосфодитиоатной, фосфорамидатной и т.п.) лиганд может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. В случае аминсодержащих или амидсодержащих межнуклеозидных связей (например, PNA) лиганд может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

[0067] В определенных вариантах осуществления лиганд может быть присоединен к 3'- или 5'-концу смысловой или антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен к 5'-концу смысловой нити. В других вариантах осуществления лиганд ковалентно присоединен к 3'-концу смысловой нити. Например, в некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к 3'-концевому нуклеотиду смысловой нити. В некоторых таких вариантах осуществления лиганд присоединен по 3'-положению 3'-концевого нуклеотида смысловой нити. В альтернативных вариантах осуществления лиганд присоединен вблизи 3'-конца смысловой нити, но перед одним или несколькими концевыми нуклеотидами (т. е. перед 1, 2, 3 или 4 концевыми нуклеотидами). В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен по 2'-положению сахара в 3'-концевом нуклеотиде смысловой нити.

[0068] В определенных вариантах осуществления лиганд присоединен к смысловой или антисмысловой нити посредством линкера. "Линкер" означает атом или группу атомов, которые ковалентно соединяют лиганд с полинуклеотидным компонентом конструкции для RNAi. Линкер может иметь длину от приблизительно 1 до приблизительно 30 атомов, длину от приблизительно 2 до приблизительно 28 атомов, длину от приблизительно 3 до приблизительно 26 атомов, длину от приблизительно 4 до приблизительно 24 атомов, длину от приблизительно 6 до приблизительно 20 атомов, длину от приблизительно 7 до приблизительно 20 атомов, длину от приблизительно 8 до приблизительно 20 атомов, длину от приблизительно 8 до приблизительно 18 атомов, длину от приблизительно 10 до приблизительно 18 атомов и длину от приблизительно 12 до приблизительно 18 атомов. В некоторых вариантах осуществления линкер может содержать бифункциональный связывающий фрагмент, который обычно содержит алкильный фрагмент с двумя функциональными группами. Одна из функциональных групп выбрана для связывания с представляющим интерес соединением (например, смысловой или антисмысловой нитью конструкции для RNAi), а другая выбрана для связывания с по сути любой выбранной группой, такой как лиганд, как это описано в данном документе. В определенных вариантах осуществления линкер содержит структуру

цепи или олигомер из повторяющихся звеньев, таких как этиленгликолевые или аминокислотные звенья. Примеры функциональных групп, которые обычно используются в бифункциональном связывающем фрагменте, включают без ограничения электрофилы для реакции с нуклеофильными группами и нуклеофилы для реакции с электрофильными группами. В некоторых вариантах осуществления бифункциональные связывающие фрагменты включают в себя аминогруппу, гидроксильную группу, группу карбоновой кислоты, тиольную группу, ненасыщенные связи (например, двойные или тройные связи) и т. п.

[0069] Линкеры, которые можно использовать для присоединения лиганда к смысловой или антисмысловой нити в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению, включают без ограничения пирролидин, 8-амино-3,6-диоксооктановую кислоту, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, 6-аминогексановую кислоту, замещенный C1-C10-алкил, замещенный или незамещенный C2-C10-алкенил или замещенный или незамещенный C2-C10-алкинил. Предпочтительные замещающие группы для таких линкеров включают без ограничения гидроксил, амино, алкокси, карбокси, бензил, фенил, нитро, тиол, тιοалкокси, галоген, алкил, арил, алкенил и алкинил.

[0070] В определенных вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми. Расщепляемый линкер представляет собой линкер, который в достаточной степени стабилен вне клетки, но который после попадания в клетку-мишень расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер расщепляется в по меньшей мере 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или больше или в по меньшей мере 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первом эталонном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта или при втором эталонном условии (которое может быть выбрано, например, для имитации или представления условий, обнаруживаемых в крови или сыворотке крови).

[0071] Расщепляемые линкеры восприимчивы к факторам расщепления, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул. Как правило, расщепляющие средства более распространены или обнаруживаются внутри клеток при более высоких уровнях или значениях активности, чем в сыворотке крови или крови. Примеры таких разрушающих средств включают: окислительно-восстановительные средства, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, в том числе, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановители, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать линкер, расщепляемый под действием окислительно-восстановительных условий, путем восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, такие, которые приводят к pH, составляющему пять или меньше; ферменты, которые

могут гидролизовать или разрушать линкер, расщепляемый кислотой, выступая в качестве общей кислоты, пептидазы (которые могут обладать субстратной специфичностью) и фосфатазы.

[0072] Расщепляемый линкер может содержать фрагмент, восприимчивый к рН. рН сыворотки крови составляет 7,4, тогда как средний внутриклеточный рН немного ниже и находится в диапазоне приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислым рН в диапазоне 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислым рН, составляющим около 5,0. Некоторые линкеры будут содержать расщепляемую группу, которая расщепляется при предпочтительном рН, за счет чего обеспечивается высвобождение молекулы РНК от лиганда внутри клетки или в требуемом компартменте клетки.

[0073] Линкер может содержать расщепляемую группу, которая расщепляется под действием определенного фермента. Тип расщепляемой группы, встроенной в линкер, может зависеть от клетки, подлежащей нацеливанию. Например, лиганды, нацеливающие на печень, могут быть связаны с молекулами РНК посредством линкера, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет более эффективно расщепляться в клетках печени, чем в других типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатые эстеразами, включают клетки легкого, коркового вещества почки и яичка. Линкеры, содержащие пептидные связи, могут использоваться при нацеливании на клетки, богатые пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

[0074] В целом пригодность расщепляемого линкера-кандидата можно оценивать путем тестирования способности разрушающего средства (или состояния) к расщеплению линкера-кандидата. Также будет желательно протестировать расщепляемый линкер-кандидат в отношении способности противостоять расщеплению в крови или при контакте с другой нецелевой тканью. Таким образом, можно определять относительную восприимчивость к расщеплению между первым и вторым условиями, где первое условие выбрано так, что оно указывает на расщепление в клетке-мишени, а второе условие выбрано так, что оно указывает на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке крови. Такое оценивание можно проводить в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органов или тканей или у целых животных. Может быть полезно провести первоначальное оценивание в условиях бесклеточных систем или в условиях культивирования и подтвердить результаты дополнительным оцениванием у целых животных. В некоторых вариантах осуществления применимые линкеры-кандидаты расщепляются в по меньшей мере 2, 4, 10, 20, 50, 70 или 100 раз быстрее в клетке-мишени (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой крови (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

[0075] В других вариантах осуществления используют линкеры, расщепляемые под действием окислительно-восстановительных условий. Линкеры, расщепляемые под действием окислительно-восстановительных условий, расщепляются при окислении или

восстановлении. Примером группы, расщепляемой при восстановлении, является дисульфидная связывающая группа (-S-S-). Чтобы определить, является ли расщепляемый линкер-кандидат подходящим "линкером, расщепляемым при восстановлении" или, например, подходит ли он для использования с конкретной конструкцией для RNAi и конкретным лигандом, можно применять одну или несколько методик, описанных в данном документе. Например, линкер-кандидат можно оценить путем инкубирования с дитиотрептолом (DTT) или другим восстановителем, известным из уровня техники, что имитирует скорость расщепления, которая будет наблюдается в клетке, например, в клетке-мишени. Линкеры-кандидаты также можно оценивать в условиях, выбранных для имитации условий в крови или сыворотки крови. В конкретном варианте осуществления линкеры-кандидаты расщепляются в крови на не более чем 10%. В других вариантах осуществления применимые линкеры-кандидаты разрушаются в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внутриклеточных условий) в по меньшей мере 2, 4, 10, 20, 50, 70 или 100 раз быстрее по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитации внеклеточных условий).

[0076] В еще нескольких других вариантах осуществления расщепляемые линкеры на основе фосфатов расщепляются средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, которое гидролизует фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как внутриклеточные фосфатазы. Примерами расщепляемых 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-. Конкретные варианты осуществления включают -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-, -SP(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-. Другим конкретным вариантом осуществления является -O-P(O)(OH)-O-. Данные линкеры-кандидаты можно оценивать с использованием методик, аналогичных описанным выше.

[0077] В других вариантах осуществления линкеры могут содержать группы, расщепляемые кислотой, которые представляют собой группы, расщепляемые в кислых условиях. В некоторых вариантах осуществления группы, расщепляемые кислотой, расщепляются в кислой среде при pH, составляющем приблизительно 6,5 или меньше (например, приблизительно 6,0, 5,5, 5,0 или меньше), или под действием средств, таких как ферменты, которые могут выступать в качестве общей кислоты. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать среду для расщепления групп, расщепляемых кислотой. Примеры связывающих групп, расщепляемых кислотой, включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Группы, расщепляемые кислотой, могут иметь общую формулу -C=NN-, C(O)O или -OC(O). Конкретным вариантом осуществления является случай, когда атом углерода, присоединенный к атому кислорода

сложного эфира (алкоксигруппа), представляет собой арильную группу, замещенную алкильную группу или третичную алкильную группу, такую как диметил, пентил или трет-бутил. Данные группы-кандидаты можно оценивать с использованием методик, аналогичных описанным выше.

[0078] В других вариантах осуществления линкеры могут содержать расщепляемые группы на основе сложных эфиров, которые расщепляются под действием ферментов, таких как внутриклеточные эстеразы и амидазы. Примеры расщепляемых групп на основе сложных эфиров включают без ограничения сложные эфиры алкиленовых, алкениленовых и алкиниленовых групп. Сложноэфирные расщепляемые группы имеют общую формулу -C(O)O- или -OC(O)-. Данные линкеры-кандидаты можно оценивать с использованием методик, аналогичных описанным выше.

[0079] В дополнительных вариантах осуществления линкеры могут содержать расщепляемые группы на основе пептидов, которые расщепляются под действием ферментов, таких как внутриклеточные пептидазы и протеазы. Расщепляемые группы на основе пептидов представляют собой пептидные связи, образующиеся между аминокислотами с получением олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т. д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептидов не включают в себя амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образующийся между аминокислотами с получением пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептидов обычно ограничена пептидной связью (т. е. амидной связью), образующейся между аминокислотами с получением пептидов и белков, и не включает в себя всю амидную функциональную группу. Расщепляемые связывающие группы на основе пептидов имеют общую формулу -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, где RA и RB являются R-группами двух смежных аминокислот. Данные группы-кандидаты можно оценивать с использованием методик, аналогичных описанным выше.

[0080] Другие типы линкеров, подходящие для присоединения лигандов к смысловой или антисмысловой нитям в конструкциях для RNAi по настоящему изобретению, известны из уровня техники и могут включать в себя линкеры, описанные в патентах США №№ 7723509; 8017762; 8828956; 8877917 и 9181551, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0081] В определенных вариантах осуществления лиганд, ковалентно присоединенный к смысловой или антисмысловой нити конструкций для RNAi по настоящему изобретению, содержит фрагмент GalNAc, например, многовалентный фрагмент GalNAc. В некоторых вариантах осуществления многовалентный фрагмент GalNAc представляет собой трехвалентный фрагмент GalNAc и присоединен к 3'-концу смысловой нити. В других вариантах осуществления многовалентный фрагмент GalNAc представляет собой трехвалентный фрагмент GalNAc и присоединен к 5'-концу смысловой нити. В еще нескольких других вариантах осуществления многовалентный

фрагмент GalNAc представляет собой четырехвалентный фрагмент GalNAc и присоединен к 3'-концу смысловой нити. В еще нескольких других вариантах осуществления многовалентный фрагмент GalNAc представляет собой четырехвалентный фрагмент GalNAc и присоединен к 5'-концу смысловой нити. В еще нескольких других вариантах осуществления многовалентный фрагмент GalNAc представляет собой четырехвалентный фрагмент GalNAc и присоединен к 3'-концу смысловой нити. В еще нескольких других вариантах осуществления многовалентный фрагмент GalNAc представляет собой четырехвалентный фрагмент GalNAc и присоединен к 5'-концу смысловой нити. В некоторых вариантах осуществления фрагмент GalNAc присоединен к 5'-концу смысловой нити последовательностей с нечетным номером под SEQ ID NO: 1-645 или 647-1291.

[0082] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть доставлены в представляющие интерес клетку или ткань путем введения вектора, который кодирует конструкцию для RNAi и контролирует ее внутриклеточную экспрессию. "Вектор" (также называемый в данном документе "вектором экспрессии") относится к композиции, которую можно применять для доставки представляющей интерес нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Из уровня техники известны многочисленные векторы, в том числе без ограничения линейные полинуклеотиды, полинуклеотиды, связанные с ионными или амфифильными соединениями, плазмиды и вирусы. Таким образом, термин "вектор" включает автономно реплицирующуюся плазмиду или вирус. Примеры вирусных векторов включают без ограничения аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса, ретровирусные векторы и т. п. Вектор может реплицироваться в живой клетке или может быть получен синтетическим путем.

[0083] Как правило, вектор для экспрессии конструкции для RNAi по настоящему изобретению будет содержать один или несколько промоторов, функционально связанных с последовательностями, кодирующими конструкцию для RNAi. Используемые в данном документе фразы "функционально связанный" или "под транскрипционным контролем" означают, что промотор находится в правильных местоположении и ориентации относительно полинуклеотидной последовательности для контроля инициации транскрипции РНК-полимеразой и экспрессии полинуклеотидной последовательности. "Промотор" относится к последовательности, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом, необходимой для инициации специфической транскрипции последовательности гена. Подходящие промоторы включают без ограничения промоторы RNA pol I, pol II, RNA pol III HI или U6, а также вирусные промоторы (например, промотор гена немедленно-раннего ответа цитомегаловируса человека (CMV), ранний промотор SV40 и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса). В некоторых вариантах осуществления предпочтительным является промотор RNA pol III HI или U6. Промотор может являться тканеспецифичным или индуцируемым промотором. Особый интерес представляют промоторы, специфичные

для печени, такие как промоторные последовательности гена альфа-1-антитрипсина, гена альбумина, гена гемопексина и гена печеночной липазы человека. Индуцируемые промоторы включают промоторы, регулируемые экдизоном, эстрогеном, прогестероном, тетрациклином и изопропил-PD1-тиогалактопиранозидом (IPTG).

[0084] В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит siRNA, две отдельные нити (смысловая и антисмысловая нити) могут экспрессироваться из одного вектора или из двух отдельных векторов. Например, в одном варианте осуществления последовательность, кодирующая смысловую нить, функционально связана с промотором в первом векторе, а последовательность, кодирующая антисмысловую нить, функционально связана с промотором во втором векторе. В таком варианте осуществления первый и второй векторы вводят совместно, например, путем инфекции или трансфекции, в клетку-мишень, так что смысловая и антисмысловая нити после прохождения транскрипции будут гибридизоваться внутри клетки с образованием молекулы siRNA. В другом варианте осуществления смысловая и антисмысловая нити транскрибируются из двух разных промоторов, расположенных в одном векторе. В некоторых таких вариантах осуществления последовательность, кодирующая смысловую нить, функционально связана с первым промотором, а последовательность, кодирующая антисмысловую нить, функционально связана со вторым промотором, при этом первый и второй промоторы расположены в одном векторе. В одном варианте осуществления вектор содержит первый промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей молекулу siRNA, и второй промотор, функционально связанный с той же последовательностью в противоположном направлении, так что транскрипция последовательности из первого промотора приводит к синтезу смысловой нити молекулы siRNA, а транскрипция последовательности из второго промотора приводит к синтезу антисмысловой нити молекулы siRNA.

[0085] В других вариантах осуществления, в которых конструкция для RNAi содержит shRNA, последовательность, кодирующая одиночную по меньшей мере частично самокомплементарную молекулу РНК, функционально связана с промотором, что приводит к образованию единого транскрипта. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая shRNA, содержит инвертированный повтор, соединенный линкерной полинуклеотидной последовательностью, что приводит к образованию структуры "стебель-петля" в shRNA после транскрипции.

[0086] В некоторых вариантах осуществления вектор, кодирующий конструкцию для RNAi по настоящему изобретению, представляет собой вирусный вектор. Различные вирусные векторные системы, подходящие для экспрессии конструкций для RNAi, описанных в данном документе, включают без ограничения аденовирусные векторы, ретровирусные векторы (например, лентивирусные векторы, вирус лейкоза мышей Молони), векторы на основе аденоассоциированного вируса; векторы на основе вируса простого герпеса; векторы на основе SV40; векторы на основе вируса полиомы; векторы на основе вируса папилломы; векторы на основе пикорнавируса и векторы на основе

поксвируса (например, вируса осповакцины). В определенных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор).

[0087] Различные векторы, подходящие для применения в настоящем изобретении, способы вставки последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих молекулы siRNA или shRNA, в векторы и способы доставки векторов в представляющие интерес клетки находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. См., например, Dornburg, *Gene Therap.*, Vol. 2: 301-310, 1995; Eglitis, *Biotechniques*, Vol. 6: 608-614, 1988; Miller, *HumGene Therap.*, Vol. 1: 5-14, 1990; Anderson, *Nature*, Vol. 392: 25-30, 1998; Robinson D A et al., *Nat. Genet.*, Vol. 33: 401-406, 2003; Brummelkamp et al., *Science*, Vol. 296: 550-553, 2002; Brummelkamp et al., *Cancer Cell*, Vol. 2: 243-247, 2002; Lee et al., *Nat Biotechnol*, Vol. 20:500-505, 2002; Miyagishi et al., *Nat Biotechnol*, Vol. 20: 497-500, 2002; Paddison et al., *GenesDev*, Vol. 16: 948-958, 2002; Paul et al., *Nat Biotechnol*, Vol. 20: 505-508, 2002; Sui et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 99: 5515-5520, 2002 и Yu et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 99:6047-6052, 2002, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0088] В настоящее изобретение также включены фармацевтические композиции и составы, содержащие описанные в данном документе конструкции для RNAi и фармацевтически приемлемые носители, наполнители или разбавители. Такие композиции и составы применимы для снижения экспрессии HSD17B13 у субъекта, нуждающегося в этом. Если предполагаются клинические пути применения, фармацевтические композиции и составы будут получать в форме, подходящей для предполагаемого применения. Как правило, это предусматривает получение композиций, которые по сути не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для людей или животных.

[0089] Фразы "фармацевтически приемлемый" или "фармакологически приемлемый" относятся к молекулярным веществам и композициям, которые не вызывают нежелательных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. Как используется в данном документе, "фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель" включает растворители, буферы, растворы, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие всасывание, и им подобные, приемлемые для использования в составлении фармацевтических препаратов, как, например, фармацевтических препаратов, подходящих для введения людям. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно из уровня техники. За исключением случаев, когда какие-либо традиционные среды или средство несовместимы с конструкциями для RNAi по настоящему изобретению, предполагается их применение в терапевтических композициях. Дополнительные активные ингредиенты также могут быть включены в композиции, при условии, что они не инактивируют векторы или конструкции для RNAi в

данных композициях.

[0090] Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от целого ряда критериев, включающих без ограничения путь введения, тип и степень заболевания или нарушения, подлежащих лечению, или дозу, подлежащую введению. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены, исходя из предполагаемого пути доставки. Например, в определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции составлены для парентеральной доставки. Парентеральные формы доставки включают внутривенную, внутриаартериальную, подкожную, интратекальную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутривенной доставки. В таком варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать средство доставки на основе липидов. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция составлена для подкожной доставки. В таком варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать нацеливающий лиганд (например, описанные в данном документе лиганды, содержащие GalNAc).

[0091] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции содержат эффективное количество описанной в данном документе конструкции для RNAi. "Эффективное количество" означает количество, достаточное для получения благоприятного или желаемого клинического результата. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество означает количество, достаточное для снижения экспрессии HSD17B13 в гепатоцитах субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество может представлять собой количество, достаточное только для частичного снижения экспрессии HSD17B13, например, до уровня, сопоставимого с экспрессией аллеля HSD17B13 дикого типа у гетерозиготных людей.

[0092] Эффективное количество конструкции для RNAi по настоящему изобретению может составлять от приблизительно 0,01 мг/кг массы тела до приблизительно 100 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,05 мг/кг массы тела до приблизительно 75 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 50 мг/кг массы тела, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг массы тела, от приблизительно 2,5 мг/кг массы тела до приблизительно 20 мг/кг массы тела или от приблизительно 5 мг/кг массы тела до приблизительно 15 мг/кг массы тела. В определенных вариантах осуществления однократная эффективная доза конструкции для RNAi по настоящему изобретению может составлять приблизительно 0,1 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг. Фармацевтическую композицию, содержащую эффективное количество конструкции для RNAi, можно вводить еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально или раз в два года. Точное определение того, что считается эффективными количеством и частотой введения, может основываться на нескольких

факторах, включающих массу, возраст и общее состояние пациента, тип подлежащего лечению нарушения (например, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, гиперхолестеринемия), конкретную используемую конструкцию для RNAi и путь введения. Оценки эффективных дозировок и периодов полужизни *in vivo* для любой конкретной конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть установлены с использованием традиционных методик и/или тестирования в соответствующих животных моделях.

[0093] Введение фармацевтических композиций по настоящему изобретению можно осуществлять любым традиционным путем, при условии, что ткань-мишень доступна посредством данного пути. Такие пути включают без ограничения парентеральный (например, подкожный, внутримышечный, внутрибрюшинный или внутривенный), пероральный, назальный, трансбуккальный, внутрикожный, трансдермальный и сублингвальный пути или прямую инъекцию в ткань печени или доставку через воротную вену печени. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально. Например, в определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят подкожно.

[0094] Коллоидные дисперсные системы, такие как макромолекулярные комплексы, нанокапсулы, микросферы, гранулы и системы на основе липидов, в том числе эмульсии типа "масло в воде", мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы, могут применяться в качестве средств доставки конструкций для RNAi по настоящему изобретению или векторов, кодирующих такие конструкции. Коммерчески доступные жировые эмульсии, которые подходят для доставки нуклеиновых кислот по настоящему изобретению, включают Intralipid®, Liposyn®, Liposyn®II, Liposyn®III, Nutrilipid и другие подобные липидные эмульсии. Предпочтительной коллоидной системой, предназначенной для применения в качестве средства доставки *in vivo*, является липосома (т. е. искусственная мембранная везикула). Конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут быть инкапсулированы в липосомы или могут образовывать комплексы с ними, в частности с катионными липосомами. В качестве альтернативы конструкции для RNAi по настоящему изобретению могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоилфосфатидилхолин (DMPC) и дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), дистеароилфосфатидилхолин), отрицательно заряженные (например, димиристоилфосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеоилфосфатидилэтаноламин (DOTMA)). Получение и применение таких коллоидных дисперсных систем хорошо известно из уровня техники. Иллюстративные составы также раскрыты в патенте США № 5981505; патенте США № 6217900; патенте США № 6383512; патенте США № 5783565; патенте США № 7202227; патенте США № 6379965; патенте США № 6127170; патенте

США № 5837533; патенте США № 6747014 и W003/093449.

[0095] В некоторых вариантах осуществления конструкции для RNAi по настоящему изобретению полностью инкапсулированы в липидный состав, например, с образованием SPLP, pSPLP, SNALP или других частиц типа "нуклеиновая кислота-липид". Используемый в данном документе термин "SNALP" относится к стабильной частице типа "нуклеиновая кислота-липид", включая SPLP. Используемый в данном документе термин "SPLP" относится к частице типа "нуклеиновая кислота-липид", которая содержит плазмидную ДНК, инкапсулированную в липидную везикулу. SNALP и SPLP обычно содержат катионный липид, некаатионный липид и липид, который предотвращает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). SNALP и SPLP исключительно полезны для системных путей применения, поскольку после внутривенной инъекции они демонстрируют увеличенное время жизни в кровотоке и накапливаются в отдаленных участках (например, участках, физически отделенных от участка введения). SPLP включают в себя "pSPLP", которые включают в себя инкапсулированный комплекс конденсирующего средства и нуклеиновой кислоты, как изложено в публикации согласно РСТ № WO00/03683. Частицы типа "нуклеиновая кислота-липид" обычно имеют средний диаметр, составляющий от приблизительно 50 нм до приблизительно 150 нм, от приблизительно 60 нм до приблизительно 130 нм, от приблизительно 70 нм до приблизительно 110 нм или от приблизительно 70 нм до приблизительно 90 нм, и по сути являются нетоксичными. Кроме того, в случае присутствия нуклеиновых кислот в частицах типа "нуклеиновая кислота-липид" в водном растворе они являются устойчивыми к разрушению под действием нуклеазы. Частицы типа "нуклеиновая кислота-липид" и способ их получения раскрыты, например, в патентах США №№ 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432 и публикации согласно РСТ № WO96/40964.

[0096] Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают, например, стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Как правило, данные препараты являются стерильными и жидкими до такой степени, что они способны легко проходить через иглу при введении. Препараты должны быть стабильными в условиях изготовления и хранения и должны предохраняться от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Подходящие растворители или дисперсионные среды могут содержать, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, благодаря использованию покрытия, такого как лецитин, благодаря поддержанию требуемого размера частиц в случае дисперсии и благодаря использованию поверхностно-активных веществ. Предотвращение воздействия микроорганизмов может обеспечиваться различными антибактериальными и противогрибковыми средствами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом,

сорбиновой кислотой, тимеросалом и т. п. Во многих случаях будет предпочтительным включение изотонических средств, например, сахаров или хлорида натрия. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций может обеспечиваться благодаря использованию в композициях средств, замедляющих всасывание, например, моностеарата алюминия и желатина.

[0097] Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем введения активных соединений в соответствующем количестве в растворитель вместе с любыми другими ингредиентами (например, перечисленными выше) по мере необходимости с последующей стерилизующей фильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем введения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду-носитель, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты, например, перечисленные выше. В случае стерильных порошков, предназначенных для получения стерильных инъекционных растворов, предпочтительные способы получения включают методики вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые обеспечивают получение порошка активного(активных) ингредиента(ингредиентов) вместе с любым дополнительным требуемым ингредиентом из его предварительно подвергнутого стерилизующей фильтрации раствора.

[0098] Композиции по настоящему изобретению, как правило, могут быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают, например, соли присоединения кислот (образованные со свободными аминогруппами), полученные из неорганических кислот (например, хлористоводородной или фосфорной кислот) или из органических кислот (например, уксусной, щавелевой, винной, миндальной и т. п.). Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований (например, гидроксидов натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа) или из органических оснований (например, изопропиламина, триметиламина, гистидина, прокаина и т. п.).

[0099] Например, для парентерального введения в водном растворе раствор обычно является в достаточной степени забуференным, а жидкому разбавителю сначала придают изотоничность, например, с помощью достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Такие водные растворы можно использовать, например, для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. Предпочтительно используют стерильные водные среды, известные специалистам в данной области, в частности в связи с настоящим изобретением. В качестве иллюстрации однократную дозу можно растворять в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлять к 1000 мл жидкости для гиподермоклиза, либо инъектировать в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, стр. 1035-1038 и 1570-1580). Для введения человеку препараты должны соответствовать стандартам стерильности, пирогенности, общей безопасности и чистоты, как того требуют стандарты FDA. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая

композиция по настоящему изобретению содержит стерильный физиологический раствор и описанную в данном документе конструкцию для RNAi или состоит из них. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит конструкцию для RNAi, описанную в данном документе, и стерильную воду (например, воду для инъекций, WFI) или состоит из них. В еще нескольких других вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит описанную в данном документе конструкцию для RNAi и фосфатно-солевой буферный раствор (PBS) или состоит из них.

[0100] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по настоящему изобретению упакованы с устройством для введения или хранятся внутри него. Устройства для введения инъекционных составов включают без ограничения порт-системы для инъекций, предварительно заполненные шприцы, автоматические инъекторы, инъекционные помпы, нателные инъекторы и шприцы-ручки. Устройства для введения аэрозольных или порошковых составов включают без ограничения ингаляторы, инсуффляторы, аспираторы и т. п. Таким образом, в настоящее изобретение включены устройства для введения, содержащие фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для лечения или предупреждения одного или нескольких нарушений, описанных в данном документе.

Способы подавления экспрессии HSD17B13

[0101] В настоящем изобретении также представлены способы подавления экспрессии гена HSD17B13 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с конструкцией для RNAi, например, двухнитевой конструкцией для RNAi, в количестве, которое является эффективным для подавления экспрессии HSD17B13 в клетке, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии HSD17B13 в клетке. Приведение клетки в контакт с конструкцией для RNAi, например, с двухнитевой конструкцией для RNAi, можно осуществлять *in vitro* или *in vivo*. Приведение клетки в контакт с конструкцией для RNAi *in vivo* включает приведение клетки или группы клеток в организме субъекта, например, субъекта-человека, в контакт с конструкцией для RNAi. Также возможны комбинации способов приведения клетки в контакт *in vitro* и *in vivo*.

[0102] В настоящем изобретении представлены способы снижения или подавления экспрессии HSD17B13 у нуждающегося в этом субъекта, а также способы лечения или предупреждения состояний, заболеваний или нарушений, ассоциированных с экспрессией или активностью HSD17B13. "Состояние, заболевание или нарушение, ассоциированное с экспрессией HSD17B13" относится к состояниям, заболеваниям или нарушениям, при которых наблюдаются изменения уровней экспрессии HSD17B13 или при которых повышенные уровни экспрессии HSD17B13 ассоциированы с повышенным риском развития состояния, заболевания или нарушения.

[0103] Приведение клетки в контакт может быть непосредственным или опосредованным, как обсуждалось выше. Кроме того, приведение клетки в контакт может осуществляться посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда,

описанного в данном документе или известного из уровня техники. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например, лиганд GalNAc, или трехвалентный фрагмент GalNAc, или любой другой лиганд, который направляет конструкцию для RNAi к представляющему интерес участку.

[0104] В одном варианте осуществления приведение клетки в контакт с конструкцией для RNAi включает "введение" или "доставку конструкции для RNAi в клетку" путем облегчения или осуществления захвата клеткой или абсорбции внутрь клетки. Абсорбция или захват конструкции для RNAi может происходить в результате самостоятельных диффузионных или активных клеточных процессов либо посредством вспомогательных средств или устройств. Введение конструкции для RNAi в клетку может осуществляться *in vitro* и/или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* конструкции для RNAi можно инъектировать в участок ткани или вводить системно. Введение в клетку *in vitro* включает способы, известные из уровня техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны в данном документе ниже и/или известны из уровня техники.

[0105] Термин "подавление", используемый в данном документе, используется взаимозаменяемо с терминами "снижение", "сайленсинг", "отрицательная регуляция", "супрессия" и другими подобными терминами и включает любой уровень подавления.

[0106] Фраза "подавление экспрессии HSD17B13" предполагается как относящаяся к подавлению экспрессии любого гена HSD17B13 (например, такого как ген HSD17B13 мыши, ген HSD17B13 крысы, ген HSD17B13 обезьяны или ген HSD17B13 человека), а также вариантов или мутантных форм гена HSD17B13. Таким образом, ген HSD17B13 может представлять собой ген HSD17B13 дикого типа, мутантный ген HSD17B13 или трансгенный ген HSD17B13 в контексте подвергнутых генетическим манипуляциям клетки, группы клеток или организма.

[0107] "Подавление экспрессии гена HSD17B13" включает любой уровень подавления гена HSD17B13, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена HSD17B13. Экспрессию гена HSD17B13 можно оценивать, исходя из уровня или изменения уровня любого параметра, ассоциированного с экспрессией гена HSD17B13, например, уровня мРНК HSD17B13, белка HSD17B13 или количества или степени тяжести амилоидных отложений. Этот уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, в образце, полученном от субъекта.

[0108] Подавление можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одного или нескольких параметров, ассоциированных с экспрессией HSD17B13, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой любой тип контрольного уровня, который используется в данной области техники, например, исходный уровень до введения дозы или уровень, определенный для аналогичного субъекта, клетки или образца, которые не подвергались обработке или обрабатывали с помощью контрольного раствора (такого как, например,

контроль, представляющий собой только буфер, или контроль, представляющий собой неактивное средство). В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена HSD17B13 подавляется на по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 91%, по меньшей мере приблизительно 92%, по меньшей мере приблизительно 93%, по меньшей мере приблизительно 94%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 96%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98% или по меньшей мере приблизительно 99%.

[0109] Подавление экспрессии гена HSD17B13 может проявляться в виде уменьшения количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген HSD17B13 и которая была или которые были обработаны (например, путем приведения клетки или клеток в контакт с конструкцией для RNAi по настоящему изобретению или путем введения конструкции для RNAi по настоящему изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали), так что происходит подавление экспрессии гена HSD17B13, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по сути идентичными первой клетке или группе клеток, но которую не подвергали или которые не подвергали такой обработке (контрольной(контрольными) клеткой(клетками)). В предпочтительных вариантах осуществления подавление оценивают, выражая уровень мРНК в обработанных клетках в виде процентной доли от уровня мРНК в контрольных клетках, используя следующую формулу:

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

[0110] В качестве альтернативы подавление экспрессии гена HSD17B13 можно оценивать по уменьшению параметра, который функционально связан с экспрессией гена HSD17B13. Сайленсинг гена HSD17B13 может быть определен в любой клетке, экспрессирующей HSD17B13 либо конститутивно, либо в результате геномной инженерии, и с помощью любого анализа, известного из уровня техники.

[0111] Подавление экспрессии белка HSD17B13 может проявляться в виде снижения уровня белка HSD17B13, экспрессируемого клеткой или группой клеток

(например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объясняется выше, для оценки супрессии мРНК подавление уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогичным образом выражено в виде процентной доли от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

[0112] Контрольные клетка или группа клеток, которые можно использовать для оценки подавления экспрессии гена HSD17B13, включают клетку или группу клеток, которые еще не были приведены в контакт с конструкцией для RNAi по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) до обработки субъекта конструкцией для RNAi.

[0113] Уровень мРНК HSD17B13, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, или уровень циркулирующей мРНК HSD17B13 можно определить с использованием любой методики, известной из уровня техники, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии HSD17B13 в образце определяют путем выявления транскрибированного полинуклеотида или его части, например, мРНК гена HSD17B13. РНК может быть экстрагирована из клеток с использованием методик экстракции РНК, в том числе, например, с использованием экстракции кислым фенолом/изотиоцианатом гуанидина (RNAzol B; Biogenesis), наборов для выделения РНК RNeasy (Qiagen) или PAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализа, в которых используется гибридизация с рибонуклеиновой кислотой, включают кинетические анализы транскрипции генов, RT-PCR, анализы защиты от действия РНКаз (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и микроматричный анализ. Циркулирующую мРНК можно выявить с использованием методик, описанных в PCT/US2012/043584, полное содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

[0114] В одном варианте осуществления уровень экспрессии HSD17B13 определяют с помощью зонда на основе нуклеиновой кислоты. Термин "зонд", используемый в данном документе, относится к любой молекуле, которая способна избирательно связываться с конкретным HSD17B13. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области или получены из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть специально сконструированы для мечения. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

[0115] Выделенную мРНК можно использовать в анализах гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения Саузерн- или нозерн-блот-анализы, анализы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и матрицы зондов. Одна из методик определения уровней мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК HSD17B13. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем прогона выделенной мРНК

в агарозном геле и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлозная мембрана. В альтернативном варианте осуществления зонд(зонды) иммобилизуют на твердой поверхности, и мРНК приводят в контакт с зондом(зондами), например, на микроматрице, представляющей собой генный чип Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы выявления мРНК для применения при определении уровня мРНК HSD17B13.

[0116] Альтернативный способ определения экспрессии HSD17B13 в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты и/или действия обратной транскриптазой (для получения кДНК), например, в отношении мРНК в образце, например, с помощью RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен у Mullis, 1987, патент США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193), самоподдерживающейся репликации последовательностей (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), системы амплификации транскрипции (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177), Q-бета-репликазы (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6: 1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033) или любого другого способа амплификации нуклеиновых кислот с последующим выявлением амплифицированных молекул с использованием методик, хорошо известных специалистам в данной области. Эти схемы выявления особенно полезны для выявления молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольших количествах. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии HSD17B13 определяют с помощью количественной RT-PCR с флуорогенными зондами (т. е. системы TaqMan™). Мониторинг уровней экспрессии мРНК HSD17B13 можно проводить с использованием мембранного блота (такого как используемый в гибридизационном анализе, как, например, нозерн-блоттинге, Саузерн-блоттинге, дот-блоттинге и т. п.) или микролунок, пробирок для образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии HSD17B13 может также включать использование зондов на основе нуклеиновых кислот в растворе.

[0117] В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с использованием, например, анализов методом "разветвленной" ДНК (bDNA), ПЦР в режиме реального времени (qPCR) или количественных анализов FISH. Применение этих способов описано и проиллюстрировано в примерах, представленных в данном документе.

[0118] Уровень экспрессии белка HSD17B13 можно определить посредством любого способа, известного из уровня техники, для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), супердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или в

геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминесцентные анализы и т. п.

[0119] В некоторых вариантах осуществления мониторинг эффективности способов по настоящему изобретению можно проводить путем выявления или мониторинга ослабления симптома заболевания, ассоциированного с HSD17B13, как, например, биомаркеров заболевания печени, таких как AST и ALT. Данные симптомы можно оценивать *in vitro* или *in vivo* посредством любого способа, известного из уровня техники.

[0120] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению конструкцию для RNAi вводят субъекту таким образом, что конструкция для RNAi доставляется в определенный участок в организме субъекта. Подавление экспрессии HSD17B13 можно оценивать с помощью измерений уровня или изменений уровня мРНК HSD17B13 или белка HSD17B13 в образце, полученном из жидкости или ткани из определенного участка в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления участок выбран из группы, состоящей из печени, сосудистого сплетения, сетчатки и поджелудочной железы. Участок также может представлять собой подчасть или подгруппу клеток из любого из вышеупомянутых участков. Участок может также содержать клетки, которые экспрессируют определенный тип рецептора.

Способы лечения или предупреждения заболеваний, ассоциированных с HSD17B13

[0121] В настоящем изобретении представлены терапевтические и профилактические способы, которые включают введение субъекту, у которого имеется заболевание, нарушение и/или состояние, ассоциированное с HSD17B13, или который предрасположен к развитию заболевания, нарушения и/или состояния, ассоциированного с HSD17B13, композиций, содержащих конструкцию для RNAi, или фармацевтических композиций, содержащих конструкцию для RNAi, или векторов, содержащих конструкцию для RNAi по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры заболеваний, ассоциированных с HSD17B13, включают, например, жировую инфильтрацию печени (стеатоз), неалкогольный стеатогепатит (NASH), цирроз печени, накопление жира в печени, воспаление печени, гепатоцеллюлярный некроз, фиброз печени, ожирение или неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD). В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с HSD17B13, представляет собой NAFLD. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с HSD17B13, представляет собой NASH. В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с HSD17B13, представляет собой жировую инфильтрацию печени (стеатоз). В другом варианте осуществления заболевание, ассоциированное с HSD17B13, представляет собой инсулинорезистентность. В другом варианте осуществления

заболевание, ассоциированное с HSD17B13, не представляет собой инсулинорезистентность.

[0122] В определенных вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ снижения экспрессии HSD17B13 у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту любой из описанных в данном документе конструкций для RNAi. Термин "пациент", используемый в данном документе, относится к млекопитающему, в том числе к человеку, и может использоваться взаимозаменяемо с термином "субъект". Уровень экспрессии HSD17B13 в гепатоцитах у пациента предпочтительно снижается после введения конструкции для RNAi по сравнению с уровнем экспрессии HSD17B13 у пациента, не получающего конструкцию для RNAi.

[0123] Способы по настоящему изобретению применимы для лечения субъекта с заболеванием, ассоциированным с HSD17B13, например, субъекта, который может получить пользу от снижения экспрессии гена HSD17B13 и/или продуцирования белка HSD17B13. В одном аспекте настоящего изобретения представлены способы снижения уровня экспрессии гена 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы 13 типа (HSD17B13) у субъекта с неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы снижения уровня белка HSD17B13 у субъекта с NAFLD.

[0124] В другом аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения субъекта с NAFLD. В одном аспекте настоящего изобретения представлены способы лечения субъекта с заболеванием, ассоциированным с HSD17B13, например, с жировой инфильтрацией печени (стеатозом), неалкогольным стеатогепатитом (NASH), циррозом печени, накоплением жира в печени, воспалением печени, гепатоцеллюлярным некрозом, фиброзом печени, ожирением или неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). Способы лечения (и пути применения) по настоящему изобретению включают введение субъекту, например, человеку, терапевтически эффективного количества конструкции для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующей на ген HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей конструкцию для RNAi по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13, или вектора по настоящему изобретению, содержащего конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13.

[0125] В одном аспекте настоящего изобретения представлены способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с NAFLD, например, наличия повышенной активности сигнальных путей Hedgehog, усталости, слабости, потери веса, потери аппетита, тошноты, боли в животе, сосудистых звездочек, пожелтения кожи и глаз (желтухи), зуда, накопления жидкости и отека ног (эдемы), отека живота (асцита) и спутанности сознания. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества конструкции для RNAi, например, dsRNA, фармацевтических композиций или векторов по настоящему изобретению, за счет чего обеспечивается предупреждение по меньшей мере одного симптома у субъекта с нарушением, при

котором может быть благоприятным снижение экспрессии гена HSD17B13.

[0126] В другом аспекте настоящего изобретения представлены пути применения терапевтически эффективного количества конструкции для RNAi по настоящему изобретению для лечения субъекта, например, субъекта, который может получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена HSD17B13. В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлены пути применения конструкции для RNAi, например, dsRNA, по настоящему изобретению, целенаправленно воздействующей на ген HSD17B13, или фармацевтической композиции, содержащей конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13, при изготовлении лекарственного препарата, предназначенного для лечения субъекта, например, субъекта, который может получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена HSD17B13 и/или продуцирования белка HSD17B13, как, например, субъекта с нарушением, при котором может быть благоприятным снижение экспрессии гена HSD17B13, например, заболеванием, ассоциированным с HSD17B13.

[0127] В другом аспекте настоящего изобретения представлены пути применения средства для RNAi, например, dsRNA, по настоящему изобретению для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором может быть благоприятным снижение и/или подавление экспрессии гена HSD17B13 и/или продуцирования белка HSD17B13.

[0128] В дополнительном аспекте настоящего изобретения представлены пути применения конструкции для RNAi по настоящему изобретению при изготовлении лекарственного препарата, предназначенного для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего нарушением, при котором может быть благоприятным снижение и/или подавление экспрессии гена HSD17B13 и/или продуцирования белка HSD17B13, как, например, заболеванием, ассоциированным с HSD17B13.

[0129] В одном варианте осуществления конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на HSD17B13, вводят субъекту с заболеванием, ассоциированным с HSD17B13, например, неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD), вследствие чего экспрессия гена HSD17B13, например, в клетке, ткани, крови или другой ткани или жидкости у субъекта уменьшается на по меньшей мере приблизительно 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере приблизительно 99% или больше при введении субъекту средства на основе dsRNA.

[0130] Способы и пути применения по настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, вследствие чего экспрессия гена-

мишени HSD17B13 снижается, как, например, в течение приблизительно 1, 2, 3, 4 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или приблизительно 80 часов. В одном варианте осуществления экспрессия гена-мишени HSD17B13 снижается в течение длительного периода, например, в течение по меньшей мере приблизительно двух, трех, четырех, пяти, шести, семи дней или больше, например, в течение приблизительно одной недели, двух недель, трех недель или приблизительно четырех недель или дольше.

[0131] Введение dsRNA в соответствии со способами и путями применения по настоящему изобретению может приводить к снижению тяжести, проявления признаков, симптомов и/или уровня маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с заболеванием, ассоциированным с HSD17B13, например, неалкогольной жировой болезнью печени (NAFLD). Под "снижением" в данном контексте подразумевается статистически значимое уменьшение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере приблизительно 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или приблизительно 100%. Эффективность лечения или предупреждения заболевания можно оценивать, например, путем измерения прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного препарата, необходимого для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого поддающегося измерению параметра, соответствующего данному заболеванию, которое лечат или которое намереваются предупредить. Специалист в данной области вполне способен осуществлять мониторинг эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения NAFLD можно оценивать, например, путем периодического мониторинга симптомов NAFLD, уровней жира в печени или экспрессии генов, регулирующих последующие звенья сигнальных каскадов. Сравнение более поздних показателей с первоначальными показателями предоставляет врачу указание на то, является ли лечение эффективным. Специалист в данной области вполне способен осуществлять мониторинг эффективности лечения или предупреждения путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В связи с введением конструкции для RNAi, целенаправленно воздействующей на HSD17B13, или фармацевтической композиции на ее основе "эффективность в отношении" заболевания, ассоциированного с HSD17B13, указывает на то, что введение клинически приемлемым образом приводит к благоприятному эффекту для по меньшей мере статистически значимой доли пациентов, как, например, к улучшению симптомов, излечению, снижению тяжести заболевания, продлению жизни, улучшению качества жизни или к другому эффекту, общепризнанному в качестве положительного среди врачей-лечебников, знакомых с лечением NAFLD и/или заболевания, ассоциированного с HSD17B13, и связанных с ним причин.

[0132] Эффект лечения или предупреждения очевиден тогда, когда наблюдается

статистически значимое улучшение одного или нескольких параметров статуса заболевания, или когда не происходит ухудшение или развитие симптомов в тех случаях, в которых в иных обстоятельствах их можно было бы ожидать. В качестве примера, благоприятное изменение поддающегося измерению параметра заболевания на по меньшей мере 10% и предпочтительно на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50% или больше может свидетельствовать об эффективном лечении. Эффективность данного лекарственного средства на основе RNAi или состава с этим лекарственным средством также можно оценивать путем использования экспериментальной животной модели для данного заболевания, известной из уровня техники. При использовании экспериментальной животной модели эффективность лечения подтверждается в случае, когда наблюдается статистически значимое снижение уровня маркера или симптома.

[0133] Введение конструкции для RNAi может приводить к снижению уровней присутствующего белка HSD17B13, например, в клетке, ткани, крови, моче или другом компартменте организма пациента, на по меньшей мере приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или на по меньшей мере приблизительно 99% или больше.

[0134] Перед введением полной дозы конструкции для RNAi пациентам можно вводить меньшую дозу, как, например, инфузию 5% раствора, и проводить их мониторинг на наличие нежелательных эффектов, таких как аллергическая реакция. В другом примере можно проводить мониторинг пациента на наличие нежелательных иммуностимулирующих эффектов, таких как повышение уровня цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

[0135] Благодаря ингибирующим эффектам в отношении экспрессии HSD17B13 композиция согласно настоящему изобретению или полученная из нее фармацевтическая композиция может улучшить качество жизни.

[0136] Конструкцию для RNAi по настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме, где модифицированная или немодифицированная конструкция для RNAi непосредственно суспендирована в водном или подходящем буферном растворителе в виде "свободного средства для RNAi". Свободное средство для RNAi вводят в отсутствие фармацевтической композиции.

[0137] В качестве альтернативы средство для RNAi по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомальный состав с dsRNA.

[0138] Субъектами, которые могут получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена HSD17B13, являются субъекты с неалкогольной жировой болезнью

печени (NAFLD) и/или описанным в данном документе заболеванием или нарушением, ассоциированным с HSD17B13.

[0139] Лечение субъекта, который может получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена HSD17B13, включает терапевтическое и профилактическое лечение.

[0140] В настоящем изобретении дополнительно представлены способы и пути применения конструкции для RNAi или фармацевтической композиции на ее основе для лечения субъекта, который может получить пользу от снижения и/или подавления экспрессии гена HSD17B13, например, субъекта с заболеванием, ассоциированным с HSD17B13, в комбинации с другими фармацевтическими средствами и/или другими терапевтическими способами, например, с известными фармацевтическими средствами и/или известными терапевтическими способами, такими как, например, те, которые в настоящее время используются для лечения данных нарушений.

[0141] Например, в определенных вариантах осуществления конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13, вводят в комбинации с, например, средством, применимым при лечении заболевания, ассоциированного с HSD17B13, описанного в другом месте данного документа. Например, дополнительные терапевтические средства и терапевтические способы, подходящие для лечения субъекта, который может получить пользу от снижения экспрессии HSD17B13, например, субъекта с заболеванием, ассоциированным с HSD17B13, включают конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на другую часть гена HSD17B13, терапевтическое средство и/или процедуры для лечения заболевания, ассоциированного с HSD17B13, или комбинацию любого из вышеизложенного.

[0142] В определенных вариантах осуществления первую конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13, вводят в комбинации со второй конструкцией для RNAi, целенаправленно воздействующей на другую часть гена HSD17B13. Например, первая конструкция для RNAi содержит первую смысловую нить и первую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где по сути все нуклеотиды указанной первой смысловой нити и по сути все нуклеотиды первой антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где указанная первая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера; а вторая конструкция для RNAi содержит вторую смысловую нить и вторую антисмысловую нить, образующие двухнитевой участок, где по сути все нуклеотиды второй смысловой нити и по сути все нуклеотиды второй антисмысловой нити представляют собой модифицированные нуклеотиды, где вторая смысловая нить конъюгирована с лигандом, присоединенным на 3'-конце, и где лиганд представляет собой одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

[0143] В одном варианте осуществления все нуклеотиды первой и второй смысловых нитей и/или все нуклеотиды первой и второй антисмысловых нитей содержат модификацию.

[0144] В одном варианте осуществления по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из 3'-концевого дезокситиминового нуклеотида (dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, запертого нуклеотида, незапертого нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно затрудненного этилом нуклеотида, нуклеотида с удаленным азотистым основанием, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксил-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолинового нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогексит-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, и нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата.

[0145] В определенных вариантах осуществления первую конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13, вводят в комбинации со второй конструкцией для RNAi, целенаправленно воздействующей на ген, отличающийся от гена HSD17B13. Например, конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13, можно вводить в комбинации с конструкцией для RNAi, целенаправленно воздействующей на ген SCAP. Первую конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13, и вторую конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген, отличающийся от гена HSD17B13, например, на ген SCAP, можно вводить в качестве частей одной и той же фармацевтической композиции. В качестве альтернативы первую конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген HSD17B13, и вторую конструкцию для RNAi, целенаправленно воздействующую на ген, отличающийся от гена HSD17B13, например, на ген SCAP, можно вводить в качестве частей разных фармацевтических композиций.

[0146] Конструкцию для RNAi и дополнительное терапевтическое средство и/или средство лечения можно вводить одновременно и/или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить в качестве части отдельной композиции, или в отдельные моменты времени, и/или другим способом, известным из уровня техники или описанным в данном документе.

[0147] В настоящем изобретении также представлены способы применения конструкции для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей конструкцию для RNAi по настоящему изобретению, для снижения и/или подавления экспрессии HSD17B13 в клетке. В других аспектах настоящего изобретения представлены

конструкция для RNAi по настоящему изобретению и/или композиция, содержащая конструкцию для RNAi по настоящему изобретению, для применения при снижении и/или подавлении экспрессии гена HSD17B13 в клетке. В еще нескольких других аспектах представлено применение средства для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство для RNAi по настоящему изобретению, для изготовления лекарственного препарата для снижения и/или подавления экспрессии гена HSD17B13 в клетке. В еще нескольких других аспектах настоящего изобретения представлены средство для RNAi по настоящему изобретению и/или композиция, содержащая средство для RNAi по настоящему изобретению, для применения при снижении и/или подавлении продуцирования белка HSD17B13 в клетке. В еще нескольких других аспектах представлено применение средства для RNAi по настоящему изобретению и/или композиции, содержащей средство для RNAi по настоящему изобретению, для изготовления лекарственного препарата для снижения и/или подавления продуцирования белка HSD17B13 в клетке. Способы и пути применения включают приведение клетки в контакт с конструкцией для RNAi, например, dsRNA, по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена HSD17B13, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена HSD17B13 или подавление продуцирования белка HSD17B13 в клетке.

[0148] Снижение экспрессии гена можно оценивать любыми способами, известными из уровня техники. Например, снижение экспрессии HSD17B13 можно определить путем определения уровня экспрессии мРНК HSD17B13 с помощью методик, являющихся обычной практикой для среднего специалиста в данной области, например, с помощью нозерн-блоттинга, qRT-PCR, путем определения уровня белка HSD17B13 с помощью методик, являющихся обычной практикой для среднего специалиста в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методики, методики проточной цитометрии, ELISA, и/или путем определения биологической активности HSD17B13.

[0149] В способах и путях применения по настоящему изобретению клетки могут быть приведены в контакт *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться в организме субъекта.

[0150] Клеткой, подходящей для лечения с применением способов по настоящему изобретению, может являться любая клетка, которая экспрессирует ген HSD17B13, например, клетка от субъекта с NAFLD или клетка, которая содержит вектор экспрессии, содержащий ген HSD17B13 или часть гена HSD17B13. Клетка, подходящая для использования в способах и путях применения по настоящему изобретению, может представлять собой клетку млекопитающего, например, клетку примата (такую как клетка человека или клетка отличного от человека примата, например, клетка нечеловекообразной обезьяны или клетка шимпанзе), клетку животного, отличного от примата (такую как клетка коровы, клетка свиньи, клетка верблюда, клетка ламы, клетка лошади, клетка козы, клетка кролика, клетка овцы, клетка хомяка, клетка морской свинки, клетка кошки, клетка собаки, клетка крысы, клетка мыши, клетка льва, клетка тигра,

клетка медведя или клетка буйвола), клетку птицы (например, клетку утки или клетку гуся) или клетку кита. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека.

[0151] Экспрессия гена HSD17B13 в клетке может подавляться на по меньшей мере приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или на приблизительно 100%.

[0152] Продуцирование белка HSD17B13 в клетке может подавляться на по меньшей мере приблизительно 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или на приблизительно 100%.

[0153] Способы и пути применения *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей конструкцию для RNAi, где конструкция для RNAi содержит нуклеотидную последовательность, которая комплементарна по меньшей мере части РНК-транскрипта гена HSD17B13 млекопитающего, подлежащего лечению. Если организм, подлежащий лечению, является человеком, композицию можно вводить любым способом, известным из уровня техники, в том числе без ограничения подкожным, внутривенным, пероральным, внутрибрюшинным или парентеральным путями, включая внутричерепное (например, желудочковое, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутримышечное, трансдермальное введение, введение через дыхательные пути (в виде аэрозоля), назальное, ректальное и местное (включая трансбуккальное и сублингвальное) введение. В определенных вариантах осуществления композиции вводят путем подкожной или внутривенной инфузии или инъекции. В одном варианте осуществления композиции вводят путем подкожной инъекции.

[0154] В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют путем инъекции депо-препарата. При инъекции депо-препарата средство для RNAi может высвобождаться последовательным образом в течение длительного периода времени. Таким образом, инъекция депо-препарата может приводить к снижению частоты введения доз, необходимой для достижения требуемого эффекта, например, требуемого подавления HSD17B13 или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо-препарата может также обеспечивать более постоянные концентрации в сыворотке крови.

Инъекции депо-препарата могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо-препарата представляет собой подкожную инъекцию.

[0155] В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством помпы. Помпа может представлять собой внешнюю помпу или хирургически имплантированную помпу. В определенных вариантах осуществления помпа представляет собой подкожно имплантированную осмотическую помпу. В других вариантах осуществления помпа представляет собой инфузионную помпу. Инфузионную помпу можно использовать для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионная помпа представляет собой подкожную инфузионную помпу. В других вариантах осуществления помпа представляет собой хирургически имплантированную помпу, которая осуществляет доставку конструкции для RNAi субъекту.

[0156] Способ введения может быть выбран в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и в зависимости от области, подлежащей обработке. Путь и участок введения могут быть выбраны для усиления целенаправленного воздействия.

[0157] В одном аспекте настоящего изобретения также представлены способы подавления экспрессии гена HSD17B13 у млекопитающего, например, у человека. В настоящем изобретении также представлена композиция, содержащая конструкцию для RNAi, например, dsRNA, которая целенаправленно воздействует на ген HSD17B13 в клетке млекопитающего, для применения при подавлении экспрессии гена HSD17B13 у млекопитающего. В другом аспекте настоящего изобретения представлено применение средства для RNAi, например, dsRNA, которое целенаправленно воздействует на ген HSD17B13 в клетке млекопитающего, при изготовлении лекарственного препарата для подавления экспрессии гена HSD17B13 у млекопитающего.

[0158] Способы и пути применения включают введение млекопитающему, например, человеку, композиции, содержащей средство для RNAi, например, dsRNA, которое целенаправленно воздействует на ген HSD17B13 в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для достижения разрушения мРНК-транскрипта гена HSD17B13, за счет чего обеспечивается подавление экспрессии гена HSD17B13 у млекопитающего.

[0159] Снижение экспрессии гена можно оценивать в образце периферической крови субъекта, которому вводили средство для RNAi, с помощью любых методик, известных из уровня техники, например, qRT-PCR, описанной в данном документе. Снижение продуцирования белка можно оценивать с помощью любых методик, известных из уровня техники, и с помощью методик, например, ELISA или вестерн-блоттинга, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления образец ткани служит в качестве тканевого материала для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка HSD17B13. В другом варианте осуществления образец крови служит в качестве тканевого материала для мониторинга снижения экспрессии гена и/или белка

HSD17B13.

[0160] В одном варианте осуществления проверку и подтверждение RISC-опосредованного расщепления мишени *in vivo* после введения конструкции для RNAi осуществляют путем выполнения 5'-RACE или модификаций протокола, известных из уровня техники (Lasham A et al., (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-el9) (Zimmermann et al. (2006) *Nature* 441: 111-4).

[0161] Понятно, что все последовательности рибонуклеиновой кислоты, раскрытые в данном документе, могут быть преобразованы в последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты путем замены урацилового основания в последовательности тиминovým основанием. Аналогичным образом все последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты, раскрытые в данном документе, могут быть преобразованы в последовательности рибонуклеиновой кислоты путем замены тиминового основания в последовательности урациловым основанием. В настоящее изобретение включены последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты, последовательности рибонуклеиновой кислоты и последовательности, содержащие смеси дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов из всех последовательностей, раскрытых в данном документе.

[0162] Кроме того, любые последовательности нуклеиновых кислот, раскрытые в данном документе, могут быть модифицированы с помощью любой комбинации химических модификаций. Специалист в данной области легко поймет, что такое обозначение, как "РНК" или "ДНК", для описания модифицированных полинуклеотидов в некоторых случаях является произвольным. Например, полинуклеотид, содержащий нуклеотид, имеющий заместитель 2'-ОН в рибозном сахаре и тиминовое основание, можно описать как молекулу ДНК, имеющую модифицированный сахар (2'-ОН вместо природного 2'-Н ДНК), или как молекулу РНК, имеющую модифицированное основание (тимин (метилованный урацил) вместо природного урацила РНК).

[0163] Соответственно, последовательности нуклеиновых кислот, представленные в данном документе, включающие без ограничения те, которые указаны в перечне последовательностей, предполагаются как охватывающие нуклеиновые кислоты, содержащие любую комбинацию природных или модифицированных РНК и/или ДНК, в том числе без ограничения такие нуклеиновые кислоты, имеющие модифицированные нуклеиновые основания. В качестве дополнительного примера и без ограничения, полинуклеотид, имеющий последовательность "ATCGATCG", охватывает любые полинуклеотиды, имеющие такую последовательность, будь то модифицированные или немодифицированные, в том числе без ограничения такие соединения, содержащие основания РНК, такие как соединения, имеющие последовательность "AUCGAUCG", и те соединения, которые имеют некоторые основания ДНК и некоторые основания РНК, такие как "AUCGATCG", а также полинуклеотиды, имеющие другие модифицированные основания, такие как "ATmeCGAUCG," где meC обозначает цитозиновое основание, содержащее метильную группу в 5-положении.

[0164] Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, представлены только для иллюстративных целей и не должны истолковываться как ограничивающие объем прилагаемой формулы изобретения.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0165] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки. Однако цитирование литературного источника в данном документе не должно истолковываться как подтверждение того, что такой литературный источник является предшествующим уровнем техники для настоящего изобретения. В том случае, если любое из определений или терминов, представленных в литературных источниках, включенных посредством ссылки, отличается от терминов и обсуждения, представленных в данном документе, преимущественную силу имеют термины и определения из настоящего описания.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0166] Вышеизложенное письменное описание считается достаточным для того, чтобы позволить специалисту в данной области реализовать настоящее изобретение на практике. В вышеизложенном описании и примерах подробно описаны некоторые предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения и описан наилучший способ, предусматриваемый авторами настоящего изобретения. Однако следует иметь в виду, что независимо от того, насколько подробно вышеизложенное может появиться в тексте, настоящее изобретение может быть реализовано на практике многими способами, поэтому настоящее изобретение следует истолковывать в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

[0167] Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и достигнутые результаты, представлены только для иллюстративных целей и не должны истолковываться как ограничивающие настоящее изобретение.

[0168] Все описанные в данном документе эксперименты на животных были одобрены Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) компании Amgen и были проведены в соответствии с Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Edition (National Research Council (U.S.), Committee for the Update Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Institute for Laboratory Animal Research (U.S.) и National Academies Press (U.S.) (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. 8th Ed., National Academies Press, Washington, D.C. Мышей содержали индивидуально в комнате с кондиционированным воздухом при $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ и циклом чередования двенадцати часов света и двенадцати часов темноты (06:00-18:00 часов). Животные имели свободный доступ к стандартному рациону питания (Envigo, 2920X или рациону, указанному иным образом) и к воде (очищенной с помощью системы обратного осмоса) через автоматическую поилку, если не указано иное. По окончании исследования кровь собирали посредством пункции сердца под глубокой анестезией, а затем, следуя

рекомендациям Ассоциации по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных (AAALAC), животных подвергали эвтаназии вторичным физическим методом.

ПРИМЕР 1. Отбор, конструирование и синтез модифицированных молекул siRNA для HSD17B13

[0169] Идентификацию и отбор оптимальных последовательностей терапевтических молекул siRNA, целенаправленно воздействующих на 17 β -гидроксистероиддегидрогеназу 13 типа (HSD17B13), проводили с помощью биоинформатического анализа транскрипта HSD17B13 человека (NM_178135.4 или NM_001136230.2). В таблице 1 показаны последовательности, идентифицированные как имеющие терапевтические свойства. Во всех этих различных последовательностях {INVAB} означает инвертированный остаток с удаленным азотистым основанием, {INVDA} означает инвертированный дезокситимидин, GNA означает гликолевую нуклеиновую кислоту, dT означает дезокситимидин, и dC означает дезоксицитозин.

Таблица 1. Последовательности siRNA, направленные на HSD17B13

№ ДУПЛ ЕКСА	СМЫСЛОВАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (5'-3')	SEQ ID NO: (СМЫСЛ ОВАЯ)	АНТИСМЫСЛОВАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (5'-3')	SEQ ID NO: (АНТИСМЫ СЛОВАЯ)
D-1000	UUCUGCUUCUGAUC CCAUC{INVAB}	1	UGAUGGUGAUCAGA AGCAGAAUU	2
D-1001	UCUGCUUCUGAUCAC CAUCA{INVAB}	3	AUGAUGGUGAUCAG AAGCAGAUU	4
D-1002	CUUCUGAUCACCAUC AUCUA{INVAB}	5	AUAGAUGAUGGUGA UCAGAAGUU	6
D-1003	UCUCAUACUGGAGC UGGGC{INVAB}	7	UGCCCAGCUCCAGU AAUGAGAUU	8
D-1004	GUGAAUAAUGCUGGG ACAGU{INVAB}	9	UACUGUCCCAGCAU UAUUCACUU	10
D-1005	UAAUGCUGGGACAGU AUAUC{INVAB}	11	AGAUAUACUGUCCC AGCAUUAUU	12
D-1006	AAUGCUGGGACAGUA UAUCC{INVAB}	13	UGGAUUAUACUGUCC CAGCAUUUU	14
D-1007	GGGACAGUAUAUCCA GCCGA{INVAB}	15	AUCGGCUGGAUAUA CUGUCCCUU	16
D-1008	GGACAGUAUAUCCAG CCGAU{INVAB}	17	AAUCGGCUGGAUAU ACUGUCCUU	18

D-1009	GACAGUAUAUCCAGC CGAUC{INVAB}	19	AGAUCGGCUGGAUA UACUGUCUU	20
D-1010	ACAGUAUAUCCAGCC GAUCU{INVAB}	21	AAGAUCGGCUGGAU AUACUGUUU	22
D-1011	CAGUAUAUCCAGCCG AUCUU{INVAB}	23	AAAGAUCGGCUGGA UAUACUGUU	24
D-1012	GACAUUUGAGGUCAA CAUCC{INVAB}	25	AGGAUGUUGACCUC AAAUGUCUU	26
D-1013	UGAGGUCAACAUCU AGGAC{INVAB}	27	UGUCCUAGGAUGUU GACCUCAUU	28
D-1014	AGGUCAACAUCUAG GACAU{INVAB}	29	AAUGUCCUAGGAUG UUGACCUUU	30
D-1015	GGUCAACAUCUAGG ACAUU{INVAB}	31	AAAUGUCCUAGGAU GUUGACCUU	32
D-1016	GUCAACAUCUAGGA CAUUU{INVAB}	33	AAAAUGUCCUAGGA UGUUGACUU	34
D-1017	UCAACAUCUAGGAC AUUUU{INVAB}	35	AAAAAUGUCCUAGG AUGUUGAUU	36
D-1018	CAACAUCUAGGACA UUUUU{INVAB}	37	AAAAAAUGUCCUAG GAUGUUGUU	38
D-1019	CAAAAGCACUUCUUC CAUCG{INVAB}	39	UCGAUGGAAGAAGU GCUUUUGUU	40
D-1020	AAAAGCACUUCUUC AUCGA{INVAB}	41	AUCGAUGGAAGAAG UGCUIUUUUU	42
D-1021	AAAGCACUUCUCCA UCGAU{INVAB}	43	AAUCGAUGGAAGAA GUGCUUUUUU	44
D-1022	AAGCACUUCUCCA CGAUG{INVAB}	45	UCAUCGAUGGAAGA AGUGCUUUU	46
D-1023	AGCACUUCUCCAUC GAUGA{INVAB}	47	AUCAUCGAUGGAAG AAGUGCUUU	48
D-1024	UUCUUAACCUCAUCC CAUAU{INVAB}	49	AAUAUGGGAUGAGG UAAGGAAUU	50
D-1025	CCUUAACCUCAUCCA UAUUG{INVAB}	51	ACAAUAUGGGAUGA GGUAAGGUU	52

D-1026	ACCUCAUCCCAUAUU GUUCC{INVAB}	53	UGGAACAAUAUGGG AUGAGGUUU	54
D-1027	CCUCAUCCCAUAUUG UUCCA{INVAB}	55	AUGGAACAAUAUGG GAUGAGGUU	56
D-1028	UCCCAUAUUGUUGCA GCAAA{INVAB}	57	AUUUGCUGGAACAA UAUGGGAUU	58
D-1029	GGCUUUCACAGAGGU CUGAC{INVAB}	59	UGUCAGACCUCUGU GAAAGCCUU	60
D-1030	UUUGUGAAUACUGGG UUCAC{INVAB}	61	AGUGAACCCAGUAU UCACAAAUU	62
D-1031	UUGUGAAUACUGGGU UCACC{INVAB}	63	UGGUGAACCCAGUA UUCACAAUU	64
D-1032	GAAUACUGGGUUCAC CAAAA{INVAB}	65	UUUUUGGUGAACCC AGUAUUCUU	66
D-1033	AUACUGGGUUCACCA AAAAU{INVAB}	67	AAUUUUUGGUGAAC CCAGUAUUU	68
D-1034	UACUGGGUUCACCAA AAAUC{INVAB}	69	AGAUUUUUGGUGAA CCCAGUAUU	70
D-1035	UUUUAAAUCGUAUGC AGAAU{INVAB}	71	UAUUCUGCAUACGA UUUAAAAUU	72
D-1036	UUUAAAUCGUAUGCA GAAUA{INVAB}	73	AUAUUCUGCAUACG AUUUAAAAU	74
D-1037	UAAAUCGUAUGCAGA AUAUU{INVAB}	75	AAAUAUUCUGCAUA CGAUUUAAU	76
D-1038	AAAUCGUAUGCAGAA UAUUC{INVAB}	77	UGAAUAUUCUGCAU ACGAUUUUU	78
D-1039	AAUCGUAUGCAGAAU AUUCA{INVAB}	79	UUGAAUAUUCUGCA UACGAUUUU	80
D-1040	UCGUAUGCAGAAUAU UCAAU{INVAB}	81	AAUUGAAUAUUCUG CAUACGAUU	82
D-1041	CGUAUGCAGAAUAUU CAAUU{INVAB}	83	AAAUUGAAUAUUCU GCAUACGUU	84
D-1042	UAUGCAGAAUAUUCA AUUUG{INVAB}	85	UCAAUAUGAAUAUU CUGCAUAUU	86

D-1043	AAUAUUCAAUUUGAA GCAGU{INVAB}	87	AACUGCUUCAAAUU GAAUAUUUU	88
D-1044	AAAUGAAAUGAAUAA AUAAG{INVAB}	89	ACUUAUUUAUUCAU UUCAUUUUU	90
D-1045	AAUCA AUGCUGCAAA GCUUU{INVAB}	91	UAAAGCUUUGCAGC AUUGAUUUU	92
D-1046	UGCUGCAAAGCUUUA UUUCA{INVAB}	93	AUGAAAUAAGCUU UGCAGCAUU	94
D-1047	GCUGCAAAGCUUUUAU UUCAC{INVAB}	95	UGUGAAAUAAGCU UUGCAGCUU	96
D-1048	UUAAAAACAUUGGUU UGGCA{INVAB}	97	AUGCCAAACCAAUG UUUUUAAUU	98
D-1049	AAAAACAUUGGUUUG GCACU{INVAB}	99	UAGUGCCAAACCAA UGUUUUUUU	100
D-1050	AACAAGAUUAAUUAC CUGUC{INVAB}	101	AGACAGGUAAUUAA UCUUGUUUU	102
D-1051	CAAGAUUAAUUACCU GUCUU{INVAB}	103	AAAGACAGGUAAUU AAUCUUGUU	104
D-1052	UAAUUACCUGUCUUC CUGUU{INVAB}	105	AAACAGGAAGACAG GUAAUUAUU	106
D-1053	CCUGUCU UCCUGUUU CUCAA{INVAB}	107	AUUGAGAAACAGGA AGACAGGUU	108
D-1054	UUUCCUUUCAUGCCU CUUAA{INVAB}	109	UUUAAGAGGCAUGA AAGGAAAUU	110
D-1055	UUCCUUUCAUGCCUC UUAAA{INVAB}	111	UUUUAAGAGGCAUG AAAGGAAUU	112
D-1056	UUUCCA UUUAAAGG UGGAC{INVAB}	113	UGUCCACCUUUAAA UGGAAAAUU	114
D-1057	UUUCCA UUUAAAGGU GGACA{INVAB}	115	UUGUCCACCUUUA AUGGAAAUU	116
D-1058	UUCCA UUUAAAGGUG GACAA{INVAB}	117	UUUGUCCACCUUUA AAUGGAAUU	118
D-1059	UCCA UUUAAAGGUGG ACAAA{INVAB}	119	UUUGUCCACCUUU AAAUGGAUU	120

D-1060	GAACUUAUUUACACA GGGAA{INVAB}	121	AUUCCCUGUGUAAA UAAGUUCUU	122
D-1061	CUUAUUUACACAGGG AAGGU{INVAB}	123	AACCUUCCCUGUGU AAAUAAAGUU	124
D-1062	AUUUACACAGGGAAG GUUUA{INVAB}	125	UUAACCUUCCCUG UGUAAAUUU	126
D-1063	UUUACACAGGGAAGG UUUAA{INVAB}	127	AUUAACCUUCCCU GUGUAAAUU	128
D-1064	CAGGGAAGGUUUAAG ACUGU{INVAB}	129	AACAGUCUUAACCC UCCCUGUU	130
D-1065	GGAAGGUUUAAGACU GUUCA{INVAB}	131	UUGAACAGUCUUA ACCUUCCUU	132
D-1066	AGGUUUAAGACUGUU CAAGU{INVAB}	133	UACUUGAACAGUCU UAAACCUUU	134
D-1067	GGUUUAAGACUGUUC AAGUA{INVAB}	135	AUACUUGAACAGUC UUAACCUU	136
D-1068	AGACUGUUCAAGUAG CAUUC{INVAB}	137	AGAAUGCUACUUGA ACAGUCUUU	138
D-1069	GACUGUUCAAGUAGC AUUCC{INVAB}	139	UGGAAUGCUACUUG AACAGUCUU	140
D-1070	ACUGUUCAAGUAGCA UUCCA{INVAB}	141	UUGGAAUGCUACUU GAACAGUUU	142
D-1071	CUGUUCAAGUAGCAU UCCAA{INVAB}	143	AUUGGAAUGCUACU UGAACAGUU	144
D-1072	UGUUCAAGUAGCAUU CCAAU{INVAB}	145	AAUUGGAAUGCUAC UUGAACAUU	146
D-1073	CAAGAACACAGAAUG AGUGC{INVAB}	147	UGCACUCAUUCUGU GUUCUUGUU	148
D-1074	ACAGAAUGAGUGCAC AGCUA{INVAB}	149	UUAGCUGUGCACUC AUUCUGUUU	150
D-1075	AGGCAGCUUUAUCUC AACCU{INVAB}	151	AAGGUUGAGAUAAA GCUGCCUUU	152
D-1076	UUUUAAGAUCAGCA UUUGA{INVAB}	153	UUCAAAUGCUGAAU CUUAAAAUU	154

D-1077	AGAUUCAGCAUUUGA AAGAU{INVAB}	155	AAUCUUUCAAAUGC UGAAUCUUU	156
D-1078	AUUUGAAAGAUUCC CUAGC{INVAB}	157	AGCUAGGGAAAUCU UUCAAAUUU	158
D-1079	UCCCCUAGCCUCUUC CUUUU{INVAB}	159	AAAAAGGAAGAGGC UAGGGAAUU	160
D-1080	CUAUUCUGGACUUUA UUACU{INVAB}	161	AAGUAAUAAAGUCC AGAAUAGUU	162
D-1081	AGUCCACCAAAAGUG GACCC{INVAB}	163	AGGGUCCACUUUUG GUGGACUUU	164
D-1082	CACCAAAAGUGGACC CUCUA{INVAB}	165	AUAGAGGGUCCACU UUUGGUGUU	166
D-1083	ACCAAAAGUGGACCC UCUAU{INVAB}	167	UAUAGAGGGUCCAC UUUUGGUUU	168
D-1084	CAAAAGUGGACCCUC UAUAU{INVAB}	169	AAUAUAGAGGGUCC ACUUUUGUU	170
D-1085	AAAAGUGGACCCUCU AUUUU{INVAB}	171	AAUAUAGAGGGUC CACUUUUUU	172
D-1086	AAAGUGGACCCUCUA UAUUU{INVAB}	173	AAAAUAUAGAGGGU CCACUUUUU	174
D-1087	AAGUGGACCCUCUAU AUUUC{INVAB}	175	AGAAAUAUAGAGGG UCCACUUUU	176
D-1088	UUCAUAUAUCCUUGG UCCCA{INVAB}	177	AUGGGACCAAGGAU AUAUGAAUU	178
D-1089	GAUGUUUAGACAAUU UUAGG{INVAB}	179	ACCUAAAAUUGUCU AAACAUCUU	180
D-1090	AUGUUUAGACAAUUU UAGGC{INVAB}	181	AGCCUAAAAUUGUC UAAACAUUU	182
D-1091	UGUUUAGACAAUUUU AGGCU{INVAB}	183	AAGCCUAAAAUUGU CUAAACAUU	184
D-1092	GUUUAGACAAUUUUA GGCUC{INVAB}	185	UGAGCCUAAAAUUG UCUAAACUU	186
D-1093	UUUAGACAAUUUUAG GCUCA{INVAB}	187	UUGAGCCUAAAAUU GUCUAAAUU	188

D-1094	UUAGACAAUUUUAGG CUCAA{INVAB}	189	UUUGAGCCUAAAAU UGUCUAAUU	190
D-1095	AGACAAUUUUAGGCU CAAAA{INVAB}	191	UUUUUGAGCCUAAA AUUGUCUUU	192
D-1096	AUUUUAGGCUCAAAA AUUAA{INVAB}	193	UUUAAUUUUUUGAGC CUAAAAUUU	194
D-1097	UUUAGGCUCAAAAAU UAAAG{INVAB}	195	ACUUUAAUUUUUGA GCCUAAAUU	196
D-1098	UUAGGCUCAAAAAUU AAAGC{INVAB}	197	AGCUUAAUUUUUUG AGCCUAAUU	198
D-1099	AAAAAUUAAAGCUAA CACAG{INVAB}	199	ACUGUGUUAGCUUU AAUUUUUUU	200
D-1100	AAAAUUAAGCUAAC ACAGG{INVAB}	201	UCCUGUGUUAGCUU UAAUUUUUU	202
D-1101	AAAGCUAACACAGGA AAAGG{INVAB}	203	UCCUUUCCUGUGU UAGCUUUUU	204
D-1102	AAGCUAACACAGGAA AAGGA{INVAB}	205	UCCUUUCCUGUG UUAGCUUUU	206
D-1103	GGAAAAGGAACUGUA CUGGC{INVAB}	207	AGCCAGUACAGUUC CUUUUCCUU	208
D-1104	AGGAACUGUACUGGC UAUUA{INVAB}	209	AUAAUAGCCAGUAC AGUCCUUU	210
D-1105	CCGACUCCACUACA UCAAG{INVAB}	211	UCUUGAUGUAGUGG GAGUCGGUU	212
D-1106	GACUCCACUACAUC AAGAC{INVAB}	213	AGUCUUGAUGUAGU GGGAGUCUU	214
D-1107	UCCACUACAUCAAG ACUAA{INVAB}	215	AUUAGUCUUGAUGU AGUGGGAUU	216
D-1108	CCCACUACAUCAAGA CUAAU{INVAB}	217	AAUUAGUCUUGAUG UAGUGGGUU	218
D-1109	CACUACAUCAAGACU AAUCU{INVAB}	219	AAGAUUAGUCUUGA UGUAGUGUU	220
D-1110	ACUACAUCAAGACUA AUCUU{INVAB}	221	AAAGAUUAGUCUUG AUGUAGUUU	222

D-1111	CUACAUCAAGACUAA UCUUG{INVAB}	223	ACAAGAUUAGUCUU GAUGUAGUU	224
D-1112	GUUUUUCACAUGUAU UAUAG{INVAB}	225	UCUAUAAUACAUGU GAAAAACUU	226
D-1113	UCACAUGUAUUUAUAG AAUGC{INVAB}	227	AGCAUUCUAUAAUA CAUGUGAUU	228
D-1114	ACAUGUAUUUAUAGAA UGC UU{INVAB}	229	AAAGCAUUCUAUAA UACAUGUUU	230
D-1115	UGUAUUUAUAGAAUGC UUUUG{INVAB}	231	ACAAAAGCAUUCUA UAAUACA UU	232
D-1116	GAAUGCUUUUGCAUG GACUA{INVAB}	233	AUAGUCCAUGCAAA AGCAUUCUU	234
D-1117	AAUGCUUUUGCAUGG ACUAU{INVAB}	235	AAUAGUCCAUGCAA AAGCAUUUU	236
D-1118	GCUUUUGCAUGGACU AUCCU{INVAB}	237	AAGGAUAGUCCAUG CAAAAGCUU	238
D-1119	UUUGCAUGGACUAUC CUCUU{INVAB}	239	AAAGAGGAUAGUCC AUGCAAAUU	240
D-1120	UUGCAUGGACUAUCC UCUUG{INVAB}	241	ACAAGAGGAUAGUC CAUGCAAUU	242
D-1121	UGCAUGGACUAUCCU CUUGU{INVAB}	243	AACAAGAGGAUAGU CCAUGCAUU	244
D-1122	GCAUGGACUAUCCUC UUGUU{INVAB}	245	AAACAAGAGGAUAG UCCAUGCUU	246
D-1123	AUGGACUAUCCUCUU GUUUU{INVAB}	247	AAAAACAAGAGGAU AGUCCAUUU	248
D-1124	GGACUAUCCUCUUGU UUUUA{INVAB}	249	AUAAAAACAAGAGG AUAGUCCUU	250
D-1125	AAUAACCUCUUGUAG UUAUA{INVAB}	251	UUAUAACUACAAGA GGUUAUUUU	252
D-1126	AUAACCUCUUGUAGU UAUAA{INVAB}	253	UUUAUAACUACAAG AGGUUAUUU	254
D-1127	ACCUCUUGUAGUUAU AAAAU{INVAB}	255	UAUUUUUAUAACUAC AAGAGGUUU	256

D-1128	GGUCAACAUCCUAGG ACAUU{INVAB}	257	AAAUGUCCUAGGAU GUUGACCUU	258
D-1129	GUCAACAUCCUAGGA CAUUU{INVAB}	259	AAAUGUCCUAGGA UGUUGACUU	260
D-1130	UCAACAUCCUAGGAC AUUUU{INVAB}	261	AAAUGUCCUAGGAU GUUGAUU	262
D-1131	CAACAUCCUAGGACA UUUUU{INVAB}	263	AAAUGUCCUAGGA UGUUGUU	264
D-1132	GGUCAACAUCCUAGG ACAUU{INVAB}	265	AAAUGUCCUAGGAU GUUGACCUU	266
D-1133	GUCAACAUCCUAGGA CAUUU{INVAB}	267	AAAUGUCCUAGGA UGUUGACUU	268
D-1134	GGUCAACAUCCUAGG ACAUU{INVAB}	269	AAAUGUCCUAGGAU GUUGACC	270
D-1135	GUCAACAUCCUAGGA CAUUU{INVAB}	271	AAAUGUCCUAGGA UGUUGAC	272
D-1136	GGUCAACAUCCUAGG ACAUU{INVAB}	273	AAAUGUCCUAGGAU GUUGACC	274
D-1137	GUCAACAUCCUAGGA CAUUU{INVAB}	275	AAAUGUCCUAGGA UGUUGAC	276
D-1138	GUCAACAUCCUAGGA CAUUU{INVAB}	277	AAAUGUCCUAGGA UGUUGAC	278
D-1139	GGUCAACAUCCUAGG ACAUU{INVAB}	279	AAAUGUCCUAGGAU GUUGACC	280
D-1140	[INVAB]UCAACAUCCU AGGACAUUU	281	AAAUGUCCUAGGAU GUUGAUU	282
D-1141	[INVAB]CAACAUCCUA GGACAUUUU	283	AAAUGUCCUAGGA UGUUGUU	284
D-1142	UCAACAUCCUAGGAC AUU{INVAB}	285	AAAUGUCCUAGGAU GUUGAUU	286
D-1143	CAACAUCCUAGGACA UUU{INVAB}	287	AAAUGUCCUAGGA UGUUGUU	288
D-1144	GGUCAACAUCGAUGG UCAUU{INVAB}	289	AAAUGACCAUCGAU GUUGACCUU	290

D-1145	GUCAACAUCCAUCGA GAUUU{INVAB}	291	AAAUCUCGAUGGA UGUUGACUU	292
D-1146	GUCAACAUCCUAGGA CAUUU{INVAB}	293	AAUGUCCUAGGAUG UUGACUU	294
D-1147	CUCCCACUACAUCAA GACUU{INVAB}	295	AGUCUUGAUGUAGU GGGAGUU	296
D-1148	CCACUACAUCAAGAC UAAUU{INVAB}	297	AUUAGUCUUGAUGU AGUGGUU	298
D-1149	UUCCUUAUCUCAUCC CUU{INVAB}	299	UAAGGGAUGAGAU AGGAAUU	300
D-1150	UUCCUUAUGAGAUCC CUU{INVAB}	301	UAAGGGAUCUCAU AGGAAUU	302
D-1151	UCAACAUCGAUGGUC AUU{INVAB}	303	AAAUGACCAUCGAU GUUGAUU	304
D-1152	UACAUCAAGACUAAU CUUGUU	305	AACAAG[GNA- A]UUAGUCUUGAUG UAGU	306
D-1153	AUGCUUUUGCAUGGA CUAUC{INVAB}	307	AGAUAG[GNA- T]CCAUGCAAAGCA UUC	308
D-1154	CGUAUGCAGAAUAUU CAAUUU	309	AAAUUG[GNA- A]AUAUUCUGCAUA CGAU	310
D-1155	CGUAUGCAGAAUAUU CAAUUU	311	AAAUUG[GNA- A]AUAUUCUGCAUA CGAU	312
D-1156	CUACAUCAAGACUAA UCUUGU	313	ACAAGA[GNA- T]UAGUCUUGAUGU AGUG	314
D-1157	AAGCCAUGAACAUCA UCCUA{INVAB}	315	AUAGGAUGAUGUUC AUGGCUUUU	316
D-1158	AGCCAUGAACAUCAU CCUAG{INVAB}	317	UCUAGGAUGAUGUU CAUGGCUUU	318
D-1159	CCAUGAACAUCAUCC	319	UUUCUAGGAUGAUG	320

	UAGAA{INVAB}		UUCAUGGUU	
D-1160	UGAACAUCAUCCUAG AAAUC{INVAB}	321	AGAUUUCUAGGAUG AUGUUCAUU	322
D-1161	GAAGUUUUUCAUUCC UCAGA{INVAB}	323	AUCUGAGGAAUGAA AAACUUCUU	324
D-1162	GGAGAAAAUCUGUGG CUGGG{INVAB}	325	ACCCAGCCACAGAU UUUCUCCUU	326
D-1163	GUGGCUGGGGAGAUU GUUCU{INVAB}	327	AAGAACAAUCUCCC CAGCCACUU	328
D-1164	GGAAUAGGCAGGCAG ACUAC{INVAB}	329	AGUAGUCUGCCUGC CUAUUCCUU	330
D-1165	GAAUAGGCAGGCAGA CUACU{INVAB}	331	AAGUAGUCUGCCUG CCUAUUCUU	332
D-1166	UUUGCAAAACGACAG AGCAU{INVAB}	333	UAUGCUCUGUCGUU UUGCAAAUU	334
D-1167	GCAAAACGACAGAGC AUAUU{INVAB}	335	AAAU AUGCUCUGUC GUUUUGCUU	336
D-1168	ACGACAGAGCAUAUU GGUUC{INVAB}	337	AGAACCAAUAUGCU CUGUCGUUU	338
D-1169	CGACAGAGCAUAUUG GUUCU{INVAB}	339	AAGAACCAAUAUGC UCUGUCGUU	340
D-1170	GACAGAGCAUAUUGG UUCUG{INVAB}	341	ACAGAACCAAUAUG CUCUGUCUU	342
D-1171	ACAGAGCAUAUUGGU UCUGU{INVAB}	343	AACAGAACCAAUAU GCUCUGUUU	344
D-1172	CAGAGCAUAUUGGUU CUGUG{INVAB}	345	ACACAGAACCAAUA UGCUCUGUU	346
D-1173	AGAGCAUAUUGGUUC UGUGG{INVAB}	347	ACCACAGAACCAAU AUGCUCUUU	348
D-1174	GAGCAUAUUGGUUCU GUGGG{INVAB}	349	UCCCACAGAACCAA UAUGCUCUU	350
D-1175	CUGUGGGGAUAUUAU AAGCG{INVAB}	351	ACGCUUAUUAUAU CCCACAGUU	352
D-1176	UUAUAAGCGCGGUG	353	ACUCCACACCGCGC	354

	UGGAG{INVAB}		UUAUUAAUU	
D-1177	UAAUAAGCGCGGUGU GGAGG{INVAB}	355	UCCUCCACACCGCG CUUAUUAAUU	356
D-1178	AUAAGCGCGGUGUGG AGGAA{INVAB}	357	UUUCCUCCACACCG CGCUUAUUU	358
D-1179	UAAGCGCGGUGUGGA GGAAA{INVAB}	359	AUUUCCUCCACACC GCGCUUAUU	360
D-1180	GGCGUCACUGCGCAU GCGUA{INVAB}	361	AUACGCAUGCGCAG UGACGCCUU	362
D-1181	GCGUCACUGCGCAUG CGUAU{INVAB}	363	AAUACGCAUGCGCA GUGACGCUU	364
D-1182	CGUCACUGCGCAUGC GUAUG{INVAB}	365	ACAUACGCAUGCGC AGUGACGUU	366
D-1183	AGCAACAGAGAAGAG AUCUA{INVAB}	367	AUAGAUCUCUUCUC UGUUGCUUU	368
D-1184	CAACAGAGAAGAGAU CUAUC{INVAB}	369	AGAUAGAUCUCUUC UCUGUUGUU	370
D-1185	AACAGAGAAGAGAU UAUCG{INVAB}	371	ACGAUAGAUCUCUU CUCUGUUUU	372
D-1186	CAGAGAAGAGAU UCGCU{INVAB}	373	AAGCGAUAGAUCUC UUCUCUGUU	374
D-1187	AGAGAAGAGAU CGCUC{INVAB}	375	AGAGCGAUAGAUCU CUUCUCUUU	376
D-1188	GAGAAGAGAU GCUCU{INVAB}	377	AAGAGCGAUAGAUC UCUUCUCUU	378
D-1189	AAGAGAU CUCUA{INVAB}	379	UUAGAGAGCGAUAG AUCUCUUUU	380
D-1190	GAGAU CUAAA{INVAB}	381	AUUUAGAGAGCGAU AGAUCUCUU	382
D-1191	GAUCUAUCGCUCUCU AAAUC{INVAB}	383	UGAUUUAGAGAGCG AUAGAUCUU	384
D-1192	AUCUAUCGCUCUCUA AAUCA{INVAB}	385	AUGAUUUAGAGAGC GAUAGAUUU	386
D-1193	CGCUCUCUAAAU CAG	387	AUUCACCUGAUUUA	388

	GUGAA{INVAB}		GAGAGCGUU	
D-1194	CUCUCUAAAUCAGGU GAAGA{INVAB}	389	UUCUUCACCUGAUU UAGAGAGUU	390
D-1195	AAAGAAGUGGGUGAU GUAAC{INVAB}	391	UGUUACAUCACCCA CUUCUUUUU	392
D-1196	AAGAAGUGGGUGAUG UAACA{INVAB}	393	UUGUUACAUCACCC ACUUCUUUU	394
D-1197	AGAAGUGGGUGAUGU AACAA{INVAB}	395	AUUGUUACAUCACC CACUUCUUU	396
D-1198	GAAGUGGGUGAUGUA ACAAU{INVAB}	397	AAUUGUUACAUCAC CCACUUCUU	398
D-1199	GAUGUAACAAUCGUG GUGAA{INVAB}	399	AUUCACCACGAUUG UUACAUCUU	400
D-1200	AUGUAACAAUCGUGG UGAAU{INVAB}	401	UAUUCACCACGAUU GUUACAUUU	402
D-1201	UGUAACAAUCGUGGU GAAUA{INVAB}	403	UUAUUCACCACGAU UGUUACAUU	404
D-1202	GUAACAAUCGUGGUG AAUAA{INVAB}	405	AUUAUUCACCACGA UUGUUACUU	406
D-1203	UAACAAUCGUGGUGA AUAAU{INVAB}	407	AAUUAUUCACCACG AUUGUUAUU	408
D-1204	GGUGAAUAAUGCUGG GACAG{INVAB}	409	ACUGUCCCAGCAUU AUUCACCUU	410
D-1205	GUGAAUAAUGCUGGG ACAGU{INVAB}	411	UACUGUCCCAGCAU UAUUCACUU	412
D-1206	UAAUGCUGGGACAGU AUAUC{INVAB}	413	AGAUUAUACUGUCCC AGCAUUAUU	414
D-1207	AAUGCUGGGACAGUA UAUCC{INVAB}	415	UGGAUUAUACUGUCC CAGCAUUUU	416
D-1208	AAGAGAUUACCAAGA CAUUU{INVAB}	417	AAA AUGUCUUGGUA AUCUCUUUU	418
D-1209	AGAGAUUACCAAGAC AUUUG{INVAB}	419	UCAA AUGUCUUGGU AAUCUCUUU	420
D-1210	GAGAUUACCAAGACA	421	AUCAA AUGUCUUGG	422

	UUUGA{INVAB}		UAAUCUCUU	
D-1211	UGAGGUCAACAUCU AGGAC{INVAB}	423	UGUCCUAGGAUGUU GACCUCAUU	424
D-1212	AGGUCAACAUCUAG GACAU{INVAB}	425	AAUGUCCUAGGAUG UUGACCUUU	426
D-1213	GGUCAACAUCUAGG ACAUU{INVAB}	427	AAAUGUCCUAGGAU GUUGACCUU	428
D-1214	GUCAACAUCUAGGA CAUUU{INVAB}	429	AAAAUGUCCUAGGA UGUUGACUU	430
D-1215	UCAACAUCUAGGAC AUUUU{INVAB}	431	AAAAAUGUCCUAGG AUGUUGAUU	432
D-1216	CAACAUCUAGGACA UUUUU{INVAB}	433	AAAAAAUGUCCUAG GAUGUUGUU	434
D-1217	CAAAAGCACUUCUUC CAUCG{INVAB}	435	UCGAUGGAAGAAGU GCUUUUGUU	436
D-1218	AAAAGCACUUCUUC AUCGA{INVAB}	437	AUCGAUGGAAGAAG UGCUIUUUU	438
D-1219	AAAGCACUUCUCCA UCGAU{INVAB}	439	AAUCGAUGGAAGAA GUGCUUUUU	440
D-1220	AAGCACUUCUCCA CGAUG{INVAB}	441	UCAUCGAUGGAAGA AGUGCUUUU	442
D-1221	AGCACUUCUCCAUC GAUGA{INVAB}	443	AUCAUCGAUGGAAG AAGUGCUUU	444
D-1222	CACUUCUCCAUCGA UGAUG{INVAB}	445	ACAUCAUCGAUGGA AGAAGUGUU	446
D-1223	ACUUCUCCAUCGAU GAUGG{INVAB}	447	UCCAUCAUCGAUGG AAGAAGUUU	448
D-1224	UCCAUCGAUGAUGG AGAGA{INVAB}	449	UUCUCUCCAUCAUC GAUGGAAUU	450
D-1225	CCAUCGAUGAUGGAG AGAAA{INVAB}	451	AUUUCUCUCCAUCA UCGAUGGUU	452
D-1226	GAUGGAGAGAAUCA UGGCC{INVAB}	453	UGGCCAUGAUUUCU CUCCAUCUU	454
D-1227	GUGGCUUCAGUGUGC	455	AUGGCCGCACACUG	456

	GGCCA{INVAB}		AAGCCACUU	
D-1228	UGGCUUCAGUGUGCG GCCAC{INVAB}	457	AGUGGCCCGCACACU GAAGCCAUU	458
D-1229	GCUUCAGUGUGCGGC CACGA{INVAB}	459	UUCGUGGCCGCGACA CUGAAGCUU	460
D-1230	UUCAGUGUGCGGCCA CGAAG{INVAB}	461	ACUUCGUGGCCGCA CACUGAAUU	462
D-1231	UUGUGAAUACUGGGU UCACC{INVAB}	463	UGGUGAACCCAGUA UUCACAAUU	464
D-1232	GAAUACUGGGUUCAC CAAAA{INVAB}	465	UUUUUGGUGAACCC AGUAUUCUU	466
D-1233	AUACUGGGUUCACCA AAAAU{INVAB}	467	AAUUUUUGGUGAAC CCAGUAUUU	468
D-1234	AGCACAAGAUUAUGG CCUGU{INVAB}	469	UACAGGCCAUAAUC UUGUGCUUU	470
D-1235	CACAAGAUUAUGGCC UGUAU{INVAB}	471	AAUACAGGCCAUAA UCUUGUGUU	472
D-1236	ACAAGAUUAUGGCCU GUAUU{INVAB}	473	AAAUACAGGCCAUA AUCUUGUUU	474
D-1237	CAAGAUUAUGGCCUG UAUUG{INVAB}	475	ACAAUACAGGCCAU AAUCUUGUU	476
D-1238	AGAUUAUGGCCUGUA UUGGA{INVAB}	477	AUCCAAUACAGGCC AUAUUCUUU	478
D-1239	GAUUAUGGCCUGUAU UGGAG{INVAB}	479	UCUCCAAUACAGGC CAUAAUCUU	480
D-1240	GAAGUCUGAUAGAUG GAAUA{INVAB}	481	AUAUCCAUCUAUC AGACUUCUU	482
D-1241	AAGUCUGAUAGAUGG AAUAC{INVAB}	483	AGUAUCCAUCUAU CAGACUUUU	484
D-1242	AGUCUGAUAGAUGGA AUACU{INVAB}	485	AAGUAUCCAUCUA UCAGACUUU	486
D-1243	GUCUGAUAGAUGGAA UACUU{INVAB}	487	UAAGUAUCCAUCU AUCAGACUU	488
D-1244	UCUGAUAGAUGGAAU	489	AUAAGUAUCCAUC	490

	ACUUA{INVAB}		UAUCAGAUU	
D-1245	AUAGAUGGAAUACUU ACCAA{INVAB}	491	AUUGGUAAGUAUUC CAUCUAUUU	492
D-1246	UAGAUGGAAUACUUA CCAAU{INVAB}	493	UAUUGGUAAGUAUU CCAUCUAUU	494
D-1247	AGAUGGAAUACUUAC CAAUA{INVAB}	495	UUAUUGGUAAGUAU UCCAUCUUU	496
D-1248	GAUGGAAUACUUACC AAUAA{INVAB}	497	AUUAUUGGUAAGUA UCCAUCUU	498
D-1249	AUGGAAUACUUACCA AUAAG{INVAB}	499	UCUUAUUGGUAAGU AUCCAUUU	500
D-1250	UGGAAUACUUACCAA UAAGA{INVAB}	501	UUCUUAUUGGUAAG UAUCCAUU	502
D-1251	AUAUCAUAUCUUUC UGAGA{INVAB}	503	AUCUCAGAAAGUA UUGAUUUU	504
D-1252	CUUUCUGAGACUACA GAAGU{INVAB}	505	AACUUCUGUAGUCU CAGAAAGUU	506
D-1253	UUUCUGAGACUACAG AAGUU{INVAB}	507	AAACUUCUGUAGUC UCAGAAAUU	508
D-1254	UUCUGAGACUACAGA AGUUU{INVAB}	509	AAAACUUCUGUAGU CUCAGAAUU	510
D-1255	UCUGAGACUACAGAA GUUUC{INVAB}	511	AGAAACUUCUGUAG UCUCAGAUU	512
D-1256	UGGUUGGCCACAAAA UCAAA{INVAB}	513	UUUUGAUUUUGUGG CCAACCAUU	514
D-1257	AAAUGAAAUGAAUAA AUAAG{INVAB}	515	ACUUAUUUAUUCAU UUCAUUUUU	516
D-1258	UUCACAUUUUUUCAG UCCUG{INVAB}	517	UCAGGACUGAAAAA AUGUGAAUU	518
D-1259	GUUUGGCACUAGCAG CAGUC{INVAB}	519	UGACUGCUGCUAGU GCCAAACUU	520
D-1260	UUUGGCACUAGCAGC AGUCA{INVAB}	521	UUGACUGCUGCUAG UGCCAAAUU	522
D-1261	UUGGCACUAGCAGCA	523	UUUGACUGCUGCUA	524

	GUCAA{INVAB}		GUGCCAAUU	
D-1262	UGGCACUAGCAGCAG UCAA{INVAB}	525	AUUUGACUGCUGCU AGUGCCAAU	526
D-1263	GGCACUAGCAGCAGU CAAAC{INVAB}	527	AGUUUGACUGCUGC UAGUGCCUU	528
D-1264	AUUUACGUAGUUUUU CAUAG{INVAB}	529	ACUAUGAAAAACUA CGUAAAUUU	530
D-1265	UUACGUAGUUUUUCA UAGGU{INVAB}	531	AACCUAUGAAAAAC UACGUAAUU	532
D-1266	UACGUAGUUUUUCAU AGGUC{INVAB}	533	AGACCUAUGAAAAA CUACGUAAU	534
D-1267	UUACAUAACAUAUCU UAAAA{INVAB}	535	AUUUUAAGUAUGUU UAUGUAAUU	536
D-1268	UAAAAGGUGGACAAA AGCUA{INVAB}	537	AUAGCUUUUGUCCA CCUUUAAUU	538
D-1269	UAAAGGUGGACAAA GCUAC{INVAB}	539	AGUAGCUUUUGUCC ACCUUUAUU	540
D-1270	AAGGUGGACAAAAGC UACCU{INVAB}	541	AAGGUAGCUUUUGU CCACCUUUU	542
D-1271	GGUGGACAAAAGCUA CCUCC{INVAB}	543	AGGAGGUAGCUUUU GUCCACCUU	544
D-1272	ACAGCUAAGAGAUCA AGUUU{INVAB}	545	AAAACUUGAUCUCU UAGCUGUUU	546
D-1273	CAGCUAAGAGAUCAA GUUUC{INVAB}	547	UGAAACUUGAUCUC UUAGCUGUU	548
D-1274	AGCUAAGAGAUCAAG UUUCA{INVAB}	549	AUGAAACUUGAUCU CUUAGCUUU	550
D-1275	CCUGGACAUUUUUUA AGAUU{INVAB}	551	AAAUCUUAAAAUAU GUCCAGGUU	552
D-1276	CUGGACAUUUUUUAA GAUUC{INVAB}	553	UGAAUCUUAAAAUA UGUCCAGUU	554
D-1277	CUUCCUUUUUCAUUA GCCCA{INVAB}	555	UUGGGCUAAUGAAA AAGGAAGUU	556
D-1278	UUCCUUUUUCAUUAG	557	UUUGGGCUAAUGAA	558

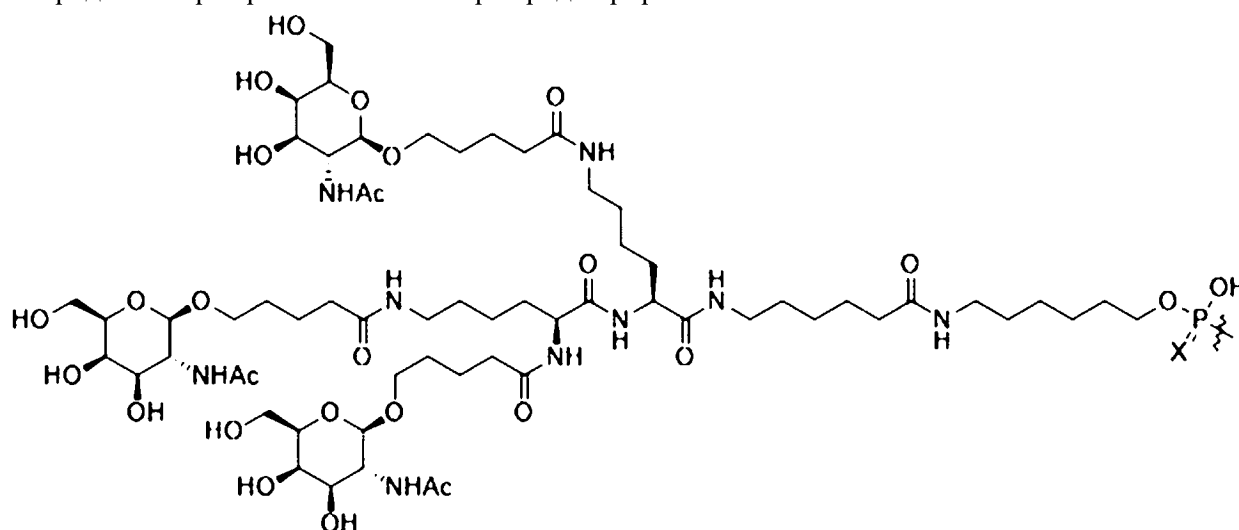
	CCCAA{INVAB}		AAAGGAAUU	
D-1279	CCCUCUAUAUUUCCU CCCUU{INVAB}	559	AAAGGGAGGAAAUA UAGAGGGUU	560
D-1280	UAUUUCCUCCCUUUU UAUAG{INVAB}	561	ACUAUAAAAAGGGA GGAAAUAUU	562
D-1281	UCCUCCCUUUUUUAU AGUCU{INVAB}	563	AAGACUAUAAAAAG GGAGGAAUU	564
D-1282	UCCUCCCUUUUUUAU GUCUU{INVAB}	565	UAAGACUAUAAAAA GGGAGGAUU	566
D-1283	CCUUUUUAUAGUCUU AUAAG{INVAB}	567	UCUUAUAAGACUAU AAAAAGGUU	568
D-1284	CUUUUUUAUAGUCUUA UAAGA{INVAB}	569	AUCUUAUAAGACUA UAAAAAGUU	570
D-1285	UUUUUAUAGUCUUAU AAGAU{INVAB}	571	UAUCUUAUAAGACU AUAAAAAUU	572
D-1286	UUUUUAUAGUCUUAUA AGAU{INVAB}	573	AUAUCUUAUAAGAC UAUAAAAAUU	574
D-1287	UUUAUAGUCUUAUAA GAUAC{INVAB}	575	UGUAUCUUAUAAGA CUAUAAAUAU	576
D-1288	UUAUAGUCUUAUAAG AUACA{INVAB}	577	AUGUAUCUUAUAAG ACUAUAAAUU	578
D-1289	UAUAGUCUUAUAAGA UACAU{INVAB}	579	AAUGUAUCUUAUAA GACUAUAUU	580
D-1290	UCUUAUAAGAUACAU UAUGA{INVAB}	581	UUCAUAAUGUAUCU UAUAAGAUU	582
D-1291	UUUUAAGUUCUAGCC CCAUG{INVAB}	583	UCAUGGGGCUAGAA CUUAAAAAUU	584
D-1292	UUUAAGUUCUAGCCC CAUGA{INVAB}	585	AUCAUGGGGCUAGA ACUUAUAAAUU	586
D-1293	UAAGUUCUAGCCCCA UGAUA{INVAB}	587	UUAUCAUGGGGCUA GAACUUAUU	588
D-1294	AAGUUCUAGCCCCAU GAUAA{INVAB}	589	AUUAUCAUGGGGCU AGAACUUUU	590
D-1295	AGUUCUAGCCCCAUG	591	AGUUAUCAUGGGGC	592

	AUAAC{INVAB}		UAGAACUUU	
D-1296	GUUCUAGCCCCAUGA UAACC{INVAB}	593	AGGUUAUCAUGGGG CUAGAACUU	594
D-1297	CUAGCCCCAUGAUAA CCUUU{INVAB}	595	AAAAGGUUAUCAUG GGGCUAGUU	596
D-1298	AGCCCCAUGAUAAACC UUUUU{INVAB}	597	AAAAAAGGUUAUCA UGGGGCUUU	598
D-1299	GCCCCAUGAUAAACCU UUUUC{INVAB}	599	AGAAAAAGGUUAUC AUGGGGCUU	600
D-1300	CCCAUGAUAAACCUUU UUCUU{INVAB}	601	AAAGAAAAAGGUUA UCAUGGGUU	602
D-1301	CCAUGAUAAACCUUUU UCUUU{INVAB}	603	AAAAGAAAAAGGUU AUCAUGGUU	604
D-1302	CAUGAUAAACCUUUUU CUUUG{INVAB}	605	ACAAAGAAAAAGGU UAUCAUGUU	606
D-1303	AUAACCUUUUUCUUU GUAAU{INVAB}	607	AAUUACAAAGAAAA AGGUUAUUU	608
D-1304	UUUUUCUUUGUAAUU UAUGC{INVAB}	609	AGCAUAAAUUACAA AGAAAAAUU	610
D-1305	UUUUCUUUGUAAUUU AUGCU{INVAB}	611	AAGCAUAAAUUACA AAGAAAAUU	612
D-1306	GGCUAUUACAUAGA AACAA{INVAB}	613	AUUGUUUCUUAUGU AAUAGCCUU	614
D-1307	CUAUUACAUAGAAA CAAUG{INVAB}	615	ACAUUGUUUCUUAU GUAAUAGUU	616
D-1308	UUACAUAGAAACAA UGGAC{INVAB}	617	AGUCCAUGUUUCU UAUGUAAUU	618
D-1309	UACAUAGAAACAAU GGACC{INVAB}	619	AGGUCCAUGUUUC UUAUGUAUU	620
D-1310	ACAUAGAAACAAUG GACCC{INVAB}	621	UGGGUCCAUGUUU CUUAUGUUU	622
D-1311	AAGAAACAAUGGACC CAAGA{INVAB}	623	AUCUUGGGUCCA GUUUCUUUU	624
D-1312	AGAAACAAUGGACCC	625	UCUCUUGGGUCCA	626

	AAGAG{INVAB}		UGUUUCUUU	
D-1313	GAAACAAUGGACCCA AGAGA{INVAB}	627	UUCUCUUGGGUCCA UUGUUUCUU	628
D-1314	AAUAGAAAAAAUAAU CCGAC{INVAB}	629	AGUCGGAUUAUUUU UUCUAUUUU	630
D-1315	AUAGAAAAAAUAAUC CGACU{INVAB}	631	AAGUCGGAUUAUUU UUUCUAUUU	632
D-1316	AAAACAAUUCACUAA AAUA{INVAB}	633	UUAUUUUUAGUGAA UUGUUUUUU	634
D-1317	UGUAGUUAUAAAAUA AAACG{INVAB}	635	ACGUUUUAUUUUUAU AACUACAUAU	636
D-1318	AAUAAAACGUUUGAC UUCUA{INVAB}	637	UUAGAAGUCAACG UUUUAUUUU	638
D-1319	AUAAAACGUUUGACU UCUAA{INVAB}	639	UUUAGAAGUCAAAC GUUUUAUUU	640
D-1320	UAAAACGUUUGACUU CUAAA{INVAB}	641	AUUUAGAAGUCAAA CGUUUUUAUU	642
D-1321	AAAACGUUUGACUUC UAAAC{INVAB}	643	AGUUUAGAAGUCA ACGUUUUUU	644
D-1322	AAACGUUUGACUUCU AAACU{INVAB}	645	AAGUUUAGAAGUCA AACGUUUUU	646

[0170] Для улучшения активности и стабильности *in vivo* последовательностей siRNA для HSD17B13 в молекулы siRNA для HSD17B13 встраивали химические модификации. В частности, встраивали 2'-О-метил- и 2'-фтор-модификации рибозного сахара в определенные положения в siRNA для HSD17B13. Также встраивали фосфотиоатные межнуклеотидные связи на концы антисмысловых и/или смысловых последовательностей. В нижеприведенной таблице 2 изображены модификации в смысловой и антисмысловой последовательностях каждой из модифицированных siRNA для HSD17B13. Нуклеотидные последовательности в таблице 2 и других частях настоящей заявки представлены в соответствии со следующими обозначениями: A, U, G и C=соответствующий рибонуклеотид; dT=дезокситимидин; dA=дезоксиаденозин; dC=дезоксицитидин; dG=дезоксигуанозин; invdT=инвертированный дезокситимидин; invdA=инвертированный дезоксиаденозин; invdC=инвертированный дезоксицитидин; invdG=инвертированный дезоксигуанозин; a, u, g и c=соответствующий 2'-О-метил-модифицированный рибонуклеотид; Af, Uf, Gf и Cf=соответствующий 2'-дезокси-2'-фтор- ("2'-фтор-") модифицированный рибонуклеотид; Ab=нуклеотид с удаленным азотистым

основанием; MeO-I=2'-метоксиинозин; GNA=гликолевая нуклеиновая кислота; sGNA=гликолевая нуклеиновая кислота с 3'-фосфотиоатом; LNA=запертая нуклеиновая кислота. Вставка "s" в последовательность указывает на то, что два смежных нуклеотида соединены фосфотиодиэфирной группой (например, фосфотиоатной межнауклеотидной связью). Если не указано иное, все другие нуклеотиды соединены 3'-5'-фосфодиэфирными группами. Каждое из соединений siRNA в таблице 2 содержит дуплексный участок из 21 пары оснований, содержащий "липкий" конец из 2 нуклеотидов на 3'-конце обеих нитей либо "тупой" конец на одном или на обоих концах. 5'-конец смысловой нити в каждом из соединений siRNA был связан со структурой GalNAc формулы I, показанной ниже, посредством фосфотиоатной или фосфодиэфирной связи:



, где X=O или S.

Таблица 2. Последовательности siRNA, направленные на HSD17B13, с модификациями

№ дуплекса	Смысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (смысловая)	Антисмысловая последовательность (5'-3')	SEQ ID NO: (антисмысловая)
D-2000	{sGalNAc3K2AhxC6}uu cugcuuCfuGfAfUfCfacc aucs{invAb}	647	usGfsauggUfgaucAfgA fagcagaasusu	648
D-2001	{sGalNAc3K2AhxC6}uc ugcuucUfgAfUfCfAfcca ucas{invAb}	649	asUfsgaugGfugauCfaGf aagcagasusu	650
D-2002	{sGalNAc3K2AhxC6}cu ucugauCfaCfCfAfUfcauc uas{invAb}	651	asUfsagauGfauggUfgA fucagaagsusu	652

D-2003	{sGalNAc3K2AhxC6}uc ucauuaCfuGfGfAfGfcug ggcs{invAb}	653	usGfscccaGfcuccAfgUf aaugagasusu	654
D-2004	{sGalNAc3K2AhxC6}gu gaauaaUfgCfUfGfGfgac agus{invAb}	655	usAfscuguCfccagCfaUf uauucacsusu	656
D-2005	{sGalNAc3K2AhxC6}ua augcugGfgAfCfAfGfuau aucs{invAb}	657	asGfsauauAfcuguCfcCf agcauuasusu	658
D-2006	{sGalNAc3K2AhxC6}aa ugcuggGfaCfAfGfUfaua uccs{invAb}	659	usGfsgauaUfacugUfcCf cagcauususu	660
D-2007	{sGalNAc3K2AhxC6}gg gacaguAfuAfUfCfCfagc cgas{invAb}	661	asUfscggcUfggauAfuA fcuguccsusu	662
D-2008	{sGalNAc3K2AhxC6}gg acaguaUfaUfCfCfAfgccg aus{invAb}	663	asAfsucggCfuggaUfaUf acuguccsusu	664
D-2009	{sGalNAc3K2AhxC6}ga caguauAfuCfCfAfGfccg aucs{invAb}	665	asGfsaucgGfcuggAfuA fuacugucsusu	666
D-2010	{sGalNAc3K2AhxC6}ac aguauaUfcCfAfGfCfcga ucus{invAb}	667	asAfsgaucGfgcugGfaUf auacugususu	668
D-2011	{sGalNAc3K2AhxC6}ca guauauCfcAfGfCfCfgau cuus{invAb}	669	asAfsagauCfggcuGfgAf uauacugsusu	670
D-2012	{sGalNAc3K2AhxC6}ga cauuugAfgGfUfCfAfaca uccs{invAb}	671	asGfsgaugUfugacCfuCf aaaugucsusu	672
D-2013	{sGalNAc3K2AhxC6}ug aggucaAfcAfUfCfCfuag gacs{invAb}	673	usGfsuccuAfggauGfuU fgaccucasusu	674
D-2014	{sGalNAc3K2AhxC6}ag	675	asAfsugucCfuaggAfuG	676

	gucaacAfuCfCfUfAfgga caus{invAb}		fuugaccususu	
D-2015	{sGalNAc3K2AhxC6}gg ucaacaUfcCfUfAfGfgaca uus{invAb}	677	asAfsauguCfcuagGfaUf guugaccsusu	678
D-2016	{sGalNAc3K2AhxC6}gu caacauCfcUfAfGfGfacau uus{invAb}	679	asAfsaaugUfccuaGfgAf uguugacsusu	680
D-2017	{sGalNAc3K2AhxC6}uc aacaucCfuAfGfGfAfcau uuus{invAb}	681	asAfsaaaUGfuccuAfgGf auguugasusu	682
D-2018	{sGalNAc3K2AhxC6}ca acauccUfaGfGfAfCfauu uuus{invAb}	683	asAfsaaaaUfguccUfaGf gauguugsusu	684
D-2019	{sGalNAc3K2AhxC6}ca aaagcaCfuUfCfUfUfccau cgs{invAb}	685	usCfsgaugGfaagaAfgUf gcuuuugsusu	686
D-2020	{sGalNAc3K2AhxC6}aa aagcacUfuCfUfUfCfcauc gas{invAb}	687	asUfscgauGfgaagAfaGf ugcuuuususu	688
D-2021	{sGalNAc3K2AhxC6}aa agcacuUfcUfUfCfCfaucg aus{invAb}	689	asAfsucgaUfggaaGfaAf gugcuuususu	690
D-2022	{sGalNAc3K2AhxC6}aa gcacuuCfuUfCfCfAfucg aug{invAb}	691	usCfsaucgAfuggaAfgA fagugcuususu	692
D-2023	{sGalNAc3K2AhxC6}ag cacuucUfuCfCfAfUfcga ugas{invAb}	693	asUfscaucGfauggAfaGf aagugcsusu	694
D-2024	{sGalNAc3K2AhxC6}uu ccuuacCfuCfAfUfCfccau aus{invAb}	695	asAfsuaugGfgaugAfgG fuaaggaasusu	696
D-2025	{sGalNAc3K2AhxC6}cc uuaccuCfaUfCfCfCfauau	697	asCfsaaauUfgggaUfgAf gguaaggsusu	698

	ugs{invAb}			
D-2026	{sGalNAc3K2AhxC6}ac cucaucCfcAfUfAfUfugu uccs{invAb}	699	usGfsgaacAfauauGfgGf augaggususu	700
D-2027	{sGalNAc3K2AhxC6}cc ucauccCfaUfAfUfUfguu ccas{invAb}	701	asUfsggaaCfaauaUfgGf gaugaggsusu	702
D-2028	{sGalNAc3K2AhxC6}uc ccauauUfgUfUfCfCfagca aas{invAb}	703	asUfsuugcUfggaaCfaAf uaugggasusu	704
D-2029	{sGalNAc3K2AhxC6}gg cuuucCfaGfAfGfGfucu gacs{invAb}	705	usGfsucagAfccucUfgUf gaaagccsusu	706
D-2030	{sGalNAc3K2AhxC6}uu ugugaaUfaCfUfGfGfguu cacs{invAb}	707	asGfsugaaCfccagUfaUf ucacaaasusu	708
D-2031	{sGalNAc3K2AhxC6}uu gugaauAfcUfGfGfGfuuc accs{invAb}	709	usGfsgugaAfcccaGfuAf uucacaasusu	710
D-2032	{sGalNAc3K2AhxC6}ga auacugGfgUfUfCfAfcca aaas{invAb}	711	usUfsuuugGfugaaCfcCf aguauucsusu	712
D-2033	{sGalNAc3K2AhxC6}au acugggUfuCfAfCfCfaaaa aus{invAb}	713	asAfsuuuuUfggugAfaC fccaguaususu	714
D-2034	{sGalNAc3K2AhxC6}ua cuggguUfcAfCfCfAfaaa aucs{invAb}	715	asGfsauuuUfugguGfaA fccaguasusu	716
D-2035	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uuaaaUcfcUfAfUfGfcag aaus{invAb}	717	usAfsuucuGfcauaCfcAf uuuuuuaasusu	718
D-2036	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uaaaucGfuAfUfGfCfaga auas{invAb}	719	asUfsauucUfgcauAfcGf auuuuuaasusu	720

D-2037	{sGalNAc3K2AhxC6}ua aaucguAfuGfCfAfGfaau auus{invAb}	721	asAfsauauUfcugcAfuAf cgauuuasusu	722
D-2038	{sGalNAc3K2AhxC6}aa aucguaUfgCfAfGfAfaua uucs{invAb}	723	usGfsaauaUfucugCfaUf acgauuususu	724
D-2039	{sGalNAc3K2AhxC6}aa ucguauGfcAfGfAfAfuau ucas{invAb}	725	usUfsgaauAfuucuGfcA fuacgauususu	726
D-2040	{sGalNAc3K2AhxC6}uc guaugcAfgAfAfUfAfuuc aaus{invAb}	727	asAfsuugaAfuauuCfuG fcgauacgasusu	728
D-2041	{sGalNAc3K2AhxC6}cg uaugcaGfaAfUfAfUfuca auus{invAb}	729	asAfsauugAfauauUfcUf gcgauacgsusu	730
D-2042	{sGalNAc3K2AhxC6}ua ugcagaAfuAfUfUfCfaau uugs{invAb}	731	usCfsaaauUfgaauAfuUf cugcauasusu	732
D-2043	{sGalNAc3K2AhxC6}aa uauucaAfuUfUfGfAfagc agus{invAb}	733	asAfscugcUfucaaAfuUf gaauauususu	734
D-2044	{sGalNAc3K2AhxC6}aa augaaaUfgAfAfUfAfaau aags{invAb}	735	asCfsuuauUfuauuCfaUf uucuuususu	736
D-2045	{sGalNAc3K2AhxC6}aa ucaaugCfuGfCfAfAfagc uuus{invAb}	737	usAfsaagcUfuugcAfgCf auugauususu	738
D-2046	{sGalNAc3K2AhxC6}ug cugcaaAfgCfUfUfUfauu ucas{invAb}	739	asUfsgaaaUfaaagCfuUf ugcagcasusu	740
D-2047	{sGalNAc3K2AhxC6}gc ugcaaaGfcUfUfUfAfuuu cacs{invAb}	741	usGfsugaaAfuaaaGfcUf uugcagcsusu	742
D-2048	{sGalNAc3K2AhxC6}uu	743	asUfsgccaAfaccaAfuGf	744

	aaaaacAfuUfGfGfUfuug gcas{invAb}		uuuuuaasusu	
D-2049	{sGalNAc3K2AhxC6}aa aaacauUfgGfUfUfUfggc acus{invAb}	745	usAfsugucCfaaacCfaAf uguuuuususu	746
D-2050	{sGalNAc3K2AhxC6}aa caagauUfaAfUfUfAfccu gucs{invAb}	747	asGfsacagGfuaauUfaAf ucuuguususu	748
D-2051	{sGalNAc3K2AhxC6}ca agauuaAfuUfAfCfCfugu cuus{invAb}	749	asAfsagacAfgguaAfuUf aaucuugsusu	750
D-2052	{sGalNAc3K2AhxC6}ua auuaccUfgUfCfUfUfccu guus{invAb}	751	asAfsacagGfaagaCfaGf guaauuasusu	752
D-2053	{sGalNAc3K2AhxC6}cc ugucuuCfcUfGfUfUfucu caas{invAb}	753	asUfsugagAfaacaGfgAf agacaggsusu	754
D-2054	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uccuuuCfaUfGfCfCfucu uaas{invAb}	755	usUfsuaagAfggcaUfgA faaggaaasusu	756
D-2055	{sGalNAc3K2AhxC6}uu ccuuucAfuGfCfCfUfcuu aaas{invAb}	757	usUfsuuaaGfaggcAfuG faaaggaasusu	758
D-2056	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uuccauUfuAfAfAfGfgug gacs{invAb}	759	usGfsuccaCfcuuuAfaAf uggaaaasusu	760
D-2057	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uccauuUfaAfAfGfGfugg acas{invAb}	761	usUfsguccAfccuuUfaAf auggaaasusu	762
D-2058	{sGalNAc3K2AhxC6}uu ccauuuAfaAfGfGfUfgga caas{invAb}	763	usUfsugucCfaccuUfuAf aauggaasusu	764
D-2059	{sGalNAc3K2AhxC6}uc cauuuaAfaGfGfUfGfgac	765	usUfsuuguCfcaccUfuUf aaauggasusu	766

	aaas{invAb}			
D-2060	{sGalNAc3K2AhxC6}ga acuuauUfuAfCfAfCfagg gaas{invAb}	767	asUfsuccUfguguAfaAf uaaguucsusu	768
D-2061	{sGalNAc3K2AhxC6}cu uauuuuCfaCfAfGfGfgaa ggus{invAb}	769	asAfscuuCfccugUfgUf aaauaagsusu	770
D-2062	{sGalNAc3K2AhxC6}au uuacacAfgGfGfAfAfggg uuas{invAb}	771	usUfsaaacCfuuccCfuGf uguaaaususu	772
D-2063	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uacacaGfgGfAfAfGfguu uaas{invAb}	773	asUfsuaaaCfcuucCfcUf guguaaasusu	774
D-2064	{sGalNAc3K2AhxC6}ca gggaagGfuUfUfAfAfgac ugus{invAb}	775	asAfscaguCfuuaaAfcCf uucccugsusu	776
D-2065	{sGalNAc3K2AhxC6}gg aagguuUfaAfGfAfCfugu ucas{invAb}	777	usUfsgaacAfgucuUfaAf accuuccsusu	778
D-2066	{sGalNAc3K2AhxC6}ag guuuuaGfaCfUfGfUfuca agus{invAb}	779	usAfscuugAfacagUfcUf uaaaccususu	780
D-2067	{sGalNAc3K2AhxC6}gg uuuaagAfcUfGfUfUfcaa guas{invAb}	781	asUfsacuuGfaacaGfuCf uuaaaccsusu	782
D-2068	{sGalNAc3K2AhxC6}ag acuguuCfaAfGfUfAfgca uucs{invAb}	783	asGfsaaugCfuacuUfgAf acagucususu	784
D-2069	{sGalNAc3K2AhxC6}ga cuguucAfaGfUfAfGfcu uucs{invAb}	785	usGfsgaauGfcuacUfuGf aacagucsusu	786
D-2070	{sGalNAc3K2AhxC6}ac uguucaAfgUfAfGfCfauu ccas{invAb}	787	usUfsggaaUfgcuacfuUf gaacagususu	788

D-2071	{sGalNAc3K2AhxC6}cu guucaaGfuAfGfCfAfuuc caas{invAb}	789	asUfsuggaAfugcuAfcU fugaacagsusu	790
D-2072	{sGalNAc3K2AhxC6}ug uucaagUfaGfCfAfUfucc aaus{invAb}	791	asAfsuuggAfaugcUfaCf uugaacasusu	792
D-2073	{sGalNAc3K2AhxC6}ca agaacaCfaGfAfAfUfgag ugcs{invAb}	793	usGfscacuCfauucUfgUf guucuugsusu	794
D-2074	{sGalNAc3K2AhxC6}ac agaaugAfgUfGfCfAfcag cuas{invAb}	795	usUfsagcuGfugcaCfuCf auucugususu	796
D-2075	{sGalNAc3K2AhxC6}ag gcagcuUfuAfUfCfUfcaa ccus{invAb}	797	asAfsgguuGfagauAfaA fgcugccususu	798
D-2076	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uuaagaUfuCfAfGfCfauu ugas{invAb}	799	usUfscaaaUfgcugAfaUf cuuaaaasusu	800
D-2077	{sGalNAc3K2AhxC6}ag auucagCfaUfUfUfGfaaa gaus{invAb}	801	asAfsucuuUfcaaaUfgCf ugaaucususu	802
D-2078	{sGalNAc3K2AhxC6}au uugaaaGfaUfUfUfCfceu agcs{invAb}	803	asGfscuagGfgaaaUfcUf uucaaaasusu	804
D-2079	{sGalNAc3K2AhxC6}uu cccuagCfcUfCfUfUfccuu uus{invAb}	805	asAfsaaagGfaagaGfgCf uaggaasusu	806
D-2080	{sGalNAc3K2AhxC6}cu auucugGfaCfUfUfUfauu acus{invAb}	807	asAfsguaaUfaaagUfcCf agaauagsusu	808
D-2081	{sGalNAc3K2AhxC6}ag uccaccAfaAfAfGfUfgga cccs{invAb}	809	asGfsggucCfacuuUfuGf guggacususu	810
D-2082	{sGalNAc3K2AhxC6}ca	811	asUfsagagGfguccAfcUf	812

	ccaaaaGfuGfGfAfCfccuc uas{invAb}		uuuggugsusu	
D-2083	{sGalNAc3K2AhxC6}ac caaaagUfgGfAfCfCfcucu aus{invAb}	813	usAfsuagaGfggucCfaCf uuuuggususu	814
D-2084	{sGalNAc3K2AhxC6}ca aaagugGfaCfCfCfUfcuau aus{invAb}	815	asAfsuauaGfagggUfcCf acuuuugsusu	816
D-2085	{sGalNAc3K2AhxC6}aa aaguggAfcCfCfUfCfuau auus{invAb}	817	asAfsauauAfgaggGfuCf cacuuuususu	818
D-2086	{sGalNAc3K2AhxC6}aa aguggaCfcCfUfCfUfaua uuus{invAb}	819	asAfsaauaUfagagGfgUf ccacuuususu	820
D-2087	{sGalNAc3K2AhxC6}aa guggacCfcUfCfUfAfuau uucs{invAb}	821	asGfsaaauAfuagaGfgGf uccacuususu	822
D-2088	{sGalNAc3K2AhxC6}uu cauauaUfcCfUfUfGfguc ccas{invAb}	823	asUfsgggaCfcaagGfaUf auaugaasusu	824
D-2089	{sGalNAc3K2AhxC6}ga uguuuaGfaCfAfAfUfuuu aggs{invAb}	825	asCfscuaaAfaaugUfcUf aaacaucsusu	826
D-2090	{sGalNAc3K2AhxC6}au guuuagAfcAfAfUfUfuua ggcs{invAb}	827	asGfscuaaAfaauuGfuCf uaaacausususu	828
D-2091	{sGalNAc3K2AhxC6}ug uuuagaCfaAfUfUfUfuag gcus{invAb}	829	asAfsgccuAfaaaUfgUf cuaaacasusu	830
D-2092	{sGalNAc3K2AhxC6}gu uuagacAfaUfUfUfUfagg cucs{invAb}	831	usGfsagccUfaaaaUfuGf ucuaaacsusu	832
D-2093	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uagacaAfuUfUfUfAfggc	833	usUfsgagcCfuaaaAfuUf gucuaaasusu	834

	ucas{invAb}			
D-2094	{sGalNAc3K2AhxC6}uu agacaaUfuUfUfAfGfgcu caas{invAb}	835	usUfsugagCfcuaaAfaUf ugucuaasusu	836
D-2095	{sGalNAc3K2AhxC6}ag acaaUfuUfUfAfGfGfCfuca aaas{invAb}	837	usUfsuuugAfgccuAfaA fauugucususu	838
D-2096	{sGalNAc3K2AhxC6}au uuuaggCfuCfAfAfAfaau uaas{invAb}	839	usUfsuaauUfuuugAfgC fcuaaaasusu	840
D-2097	{sGalNAc3K2AhxC6}uu uaggcuCfaAfAfAfAfuaa aags{invAb}	841	asCfsuuuaAfuuuuUfgA fgccuaasusu	842
D-2098	{sGalNAc3K2AhxC6}uu aggcucAfaAfAfAfUfuua agcs{invAb}	843	asGfscuuuAfauuuUfuG fagccuaasusu	844
D-2099	{sGalNAc3K2AhxC6}aa aaauuaAfaGfCfUfAfacac ags{invAb}	845	asCfsugugUfuagcUfuU faauuuuususu	846
D-2100	{sGalNAc3K2AhxC6}aa aauuuaAfgCfUfAfAfcaca ggs{invAb}	847	usCfscuguGfuuagCfuU fuaauuuuususu	848
D-2101	{sGalNAc3K2AhxC6}aa agcuuaCfaCfAfGfGfaaaa ggs{invAb}	849	usCfscuuuUfccugUfgU fuagcuuususu	850
D-2102	{sGalNAc3K2AhxC6}aa gcuaacAfcAfGfGfAfaaa ggas{invAb}	851	usUfscuuUfuccuGfuG fuuagcuususu	852
D-2103	{sGalNAc3K2AhxC6}gg aaaaggAfaCfUfGfUfacu ggcs{invAb}	853	asGfscagUfacagUfuCf cuuuuuccusu	854
D-2104	{sGalNAc3K2AhxC6}ag gaacugUfaCfUfGfGfcua uuas{invAb}	855	asUfsaauaGfccagUfaCf aguuccusu	856

D-2105	{sGalNAc3K2AhxC6}cc gacuccCfaCfUfAfCfauc ags{invAb}	857	usCfsuugaUfguagUfgG fgagucggsusu	858
D-2106	{sGalNAc3K2AhxC6}ga cucccaCfuAfCfAfUfcaag acs{invAb}	859	asGfsucuuGfauguAfgU fgggagucsusu	860
D-2107	{sGalNAc3K2AhxC6}uc ccacuaCfaUfCfAfAfgacu aas{invAb}	861	asUfsuaguCfuugaUfgU fagugggasusu	862
D-2108	{sGalNAc3K2AhxC6}cc cacuacAfuCfAfAfGfacua aus{invAb}	863	asAfsuuagUfcuugAfuG fuagugggsusu	864
D-2109	{sGalNAc3K2AhxC6}ca cuacauCfaAfGfAfCfuaau cus{invAb}	865	asAfsgauuAfgucuUfgA fuguagugsusu	866
D-2110	{sGalNAc3K2AhxC6}ac uacaucAfaGfAfCfUfaauc uus{invAb}	867	asAfsagauUfagucUfuGf auguagususu	868
D-2111	{sGalNAc3K2AhxC6}cu acaucaAfgAfCfUfAfauc uugs{invAb}	869	asCfsaagaUfuaguCfuUf gauguagsusu	870
D-2112	{sGalNAc3K2AhxC6}gu uuuuaCfaUfGfUfAfuua uags{invAb}	871	usCfsuauaAfuacaUfgUf gaaaaacsusu	872
D-2113	{sGalNAc3K2AhxC6}uc acauguAfuUfAfUfAfgaa ugcs{invAb}	873	asGfscauuCfuauaAfuAf caugugasusu	874
D-2114	{sGalNAc3K2AhxC6}ac auguauUfaUfAfGfAfaug cuus{invAb}	875	asAfsagcaUfucuaUfaAf uacaugususu	876
D-2115	{sGalNAc3K2AhxC6}ug uauuauAfgAfAfUfGfcuu uugs{invAb}	877	asCfsaaaaGfcauuCfuAf uauuacasusu	878
D-2116	{sGalNAc3K2AhxC6}ga	879	asUfsagucCfaugcAfaAf	880

	augcuuUfuGfCfAfUfgga cuas{invAb}		agcauucsusu	
D-2117	{sGalNAc3K2AhxC6}aa ugcuuuUfgCfAfUfGfgac uauas{invAb}	881	asAfsuaguCfcaugCfaAf aagcauususu	882
D-2118	{sGalNAc3K2AhxC6}gc uuuugcAfuGfGfAfCfuau ccus{invAb}	883	asAfsggauAfguccAfuG fcaaaagcsusu	884
D-2119	{sGalNAc3K2AhxC6}uu ugcaugGfaCfUfAfUfccu cuus{invAb}	885	asAfsagagGfauagUfcCf augcaaasusu	886
D-2120	{sGalNAc3K2AhxC6}uu gcauggAfcUfAfUfCfcuc uugs{invAb}	887	asCfsaagaGfgauaGfuCf caugcaasusu	888
D-2121	{sGalNAc3K2AhxC6}ug cauggaCfuAfUfCfCfucu ugus{invAb}	889	asAfscaagAfggauAfgUf ccaugcasusu	890
D-2122	{sGalNAc3K2AhxC6}gc auggacUfaUfCfCfUfcuu guus{invAb}	891	asAfsacaaGfaggaUfaGf uccaugcsusu	892
D-2123	{sGalNAc3K2AhxC6}au ggacuaUfcCfUfCfUfugu uuus{invAb}	893	asAfsaaacAfagagGfaUf aguccaasusu	894
D-2124	{sGalNAc3K2AhxC6}gg acuaucCfuCfUfUfGfuuu uuas{invAb}	895	asUfsaaaaAfcaagAfgGf auaguccsusu	896
D-2125	{sGalNAc3K2AhxC6}aa uaaccuCfuUfGfUfAfguu auas{invAb}	897	usUfsauaaCfuacaAfgAf gguuauususu	898
D-2126	{sGalNAc3K2AhxC6}au aaccucUfuGfUfAfGfuua uaas{invAb}	899	usUfsuauaAfcuacAfaGf agguuauususu	900
D-2127	{sGalNAc3K2AhxC6}ac cucuugUfaGfUfUfAfuaa	901	usAfsuuuuAfuaacUfaCf aagaggususu	902

	aaus{invAb}			
D-2128	{sGalNAc3K2AhxC6}gg ucaaCfaUfcCfuaggacauu s{invAb}	903	asAfsauguccuagGfaUfg Ufugaccsusu	904
D-2129	{sGalNAc3K2AhxC6}gu caacAfuCfcUfaggacauuu s{invAb}	905	asAfsaauguccuaGfgAfu Gfuugacsusu	906
D-2130	{sGalNAc3K2AhxC6}uc aacaUfcCfUfAfGfgacauu uus{invAb}	907	asAfsauguCfcuagGfaUf guugasusu	908
D-2131	{sGalNAc3K2AhxC6}ca acauCfcUfAfGfGfacauu uuus{invAb}	909	asAfsaaugUfccuaGfgAf uguugsusu	910
D-2132	{sGalNAc3K2AhxC6}gg ucaaCfaUfcCfUfaggaca uus{invAb}	911	asAfsaUfgUfccuaggaUf gUfugaccsusu	912
D-2133	{sGalNAc3K2AhxC6}gu caacAfuCfcUfAfggacau uus{invAb}	913	asAfsaAfuGfuccuaggAf uGfuugacsusu	914
D-2134	{sGalNAc3K2AhxC6}gg ucaacaUfcCfUfAfGfgaca uus{invAb}	915	asAfsauguCfcuagGfaUf guugasasc	916
D-2135	{sGalNAc3K2AhxC6}gu caacauCfcUfAfGfGfacau uus{invAb}	917	asAfsaaugUfccuaGfgAf uguugsasc	918
D-2136	{sGalNAc3K2AhxC6}gg ucaacaUfcCfUfaggacau us{invAb}	919	asAfsauguCfcuagGfaUf guugasasc	920
D-2137	{sGalNAc3K2AhxC6}gu caacauCfcUfAfggacauu us{invAb}	921	asAfsaaugUfccuaGfgAf uguugsasc	922
D-2138	{sGalNAc3K2AhxC6}gu caacauccUfAfGfGfacauu us{invAb}	923	asAfsaAfuGfuccuaGfg AfuGfuugsasc	924

D-2139	{sGalNAc3K2AhxC6}gg ucaacaucCfUfAfGfgacau us{invAb}	925	asAfsaUfgUfccuagGfa UfgUfugascsc	926
D-2140	{sGalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]ucaacaUfCfCfUfa ggacaususu	927	asAfsauguCfcuaggaUfg Ufugasusu	928
D-2141	{sGalNAc3K2AhxC6}[i nvAb]caacauCfCfUfAfg gacauususu	929	asAfsaaugUfccuaggAfu Gfuugsusu	930
D-2142	{sGalNAc3K2AhxC6}uc aacaUfcCfUfAfGfgacauu s{invAb}	931	asAfsauguCfcuagGfaUf guugasusu	932
D-2143	{sGalNAc3K2AhxC6}ca acauCfCfUfAfGfGfacauu us{invAb}	933	asAfsaaugUfccuaGfgAf uguugsusu	934
D-2144	{sGalNAc3K2AhxC6}gg ucaacaUfcGfAfUfGfguc auus{invAb}	935	asAfsaugaCfcaucGfaUf guugaccsusu	936
D-2145	{sGalNAc3K2AhxC6}gu caacauCfcAfUfCfGfagau uus{invAb}	937	asAfsaaucUfcgauGfgAf uguugacsusu	938
D-2146	{sGalNAc3K2AhxC6}gu caacAfuCfCfUfAfggacau uus{invAb}	939	asAfsugucCfuaggAfuG fuugacsusu	940
D-2147	{sGalNAc3K2AhxC6}cu cccaCfuAfCfAfUfcaagac uus{invAb}	941	asGfsucuuGfauguAfgU fgggagsusu	942
D-2148	{sGalNAc3K2AhxC6}cc acuaCfaUfCfAfAfgacuaa uus{invAb}	943	asUfsuaguCfuugaUfgU faguggsusu	944
D-2149	{sGalNAc3K2AhxC6}uu ccuuAfuCfUfCfAfucccus us{invAb}	945	usAfsagggAfugagAfuA faggaasusu	946
D-2150	{sGalNAc3K2AhxC6}uu	947	usAfsagggAfucucAfuA	948

	ccuuAfuGfAfGfAfuccu sus{invAb}		faggaasusu	
D-2151	{sGalNAc3K2AhxC6}uc aacaUfcGfAfUfGfgucau us{invAb}	949	asAfsaugaCfcaucGfaUf guugasusu	950
D-2152	{sGalNAc3K2AhxC6}ua caucAfaGfAfCfuaaucuug susu	951	asAfscaag[GNA- A]juuagucUfuGfauguas gsu	952
D-2153	{sGalNAc3K2AhxC6}au gcuuUfuGfCfAfuggacua uscs{invAb}	953	asGfsauag[GNA- T]ccaugcAfaAfagcausu sc	954
D-2154	{sGalNAc3K2AhxC6}cg uaugCfaGfAfAfuaaucaa ususu	955	asAfsauuGf[GNA- A]auauucUfgCfauacgsa su	956
D-2155	{sGalNAc3K2AhxC6}cg uaugCfaGfAfAfuaaucaa ususu	957	asAfsaUfuGf[GNA- A]auauUfcUfgCfaUfaC fgsasusu	958
D-2156	{sGalNAc3K2AhxC6}cu acauCfaAfGfAfcuaaucuu sgsu	959	asCfsaaga[GNA- T]uaguCfuUfgAfuguag susg	960
D-2157	asasgccaUfgAfAfCfAfuc auccuas{invAb}	961	asUfsaGfgAfugauguuC faUfggcuusususu	962
D-2158	asgsccauGfaAfCfAfUfca uccuags{invAb}	963	usCfsuAfgGfauguU fcAfuggcususu	964
D-2159	cscsaugaAfcAfUfCfAfuc cuagaas{invAb}	965	usUfsuCfuAfggaugauG fuUfcauggsusu	966
D-2160	usgsaacaUfcAfUfCfCfua gaaucs{invAb}	967	asGfsaUfuUfcuaggauGf aUfguucasusu	968
D-2161	gsasaguuUfuUfCfAfUfu ccucagas{invAb}	969	asUfscUfgAfggaugaAf aAfacuucsusu	970
D-2162	gsgsagaaAfaUfCfUfGfug gcugggs{invAb}	971	asCfscCfaGfccacagaUf uUfucuccsusu	972
D-2163	gsusggcuGfgGfGfAfGfa uuguucus{invAb}	973	asAfsgAfaCfaaucuccCf cAfgccacsusu	974

D-2164	gsgsaauaGfgCfAfGfGfca gacuacs{invAb}	975	asGfsuAfgUfcugccugCf cUfauuccsusu	976
D-2165	gsasauagGfcAfGfGfCfag acuacus{invAb}	977	asAfsgUfaGfucugccuGf cCfuaauucsusu	978
D-2166	ususugcaAfaAfCfGfAfca gagcaus{invAb}	979	usAfsuGfcUfcugucguU fuUfgcaaasusu	980
D-2167	gscsaaaaCfGfAfCfAfGfag cauauus{invAb}	981	asAfsaUfaUfgcucuguCf gUfuuugcsusu	982
D-2168	ascsgacaGfaGfCfAfUfau ugguucs{invAb}	983	asGfsaAfcCfaauaugcUf cUfgucgususu	984
D-2169	csgsacagAfgCfAfUfAfu gguucus{invAb}	985	asAfsgAfaCfcaauaugCf uCfugucgsusu	986
D-2170	gsascagaGfcAfUfAfUfug guucugs{invAb}	987	asCfsaGfaAfccaauauGf cUfcugucsusu	988
D-2171	ascagagCfaUfAfUfUfgg uucugus{invAb}	989	asAfscAfgAfaccauaUf gCfucugususu	990
D-2172	csasgagcAfuAfUfUfGfg uucugugs{invAb}	991	asCfsaCfaGfaaccaauAf uGfcucugsusu	992
D-2173	asgsagcaUfaUfUfGfGfu cuguggs{invAb}	993	asCfscAfcAfgaaccuaUf aUfgcucususu	994
D-2174	gsasgcauAfuUfGfGfUfu cugugggs{invAb}	995	usCfscCfaCfagaaccaAf uAfugcucsusu	996
D-2175	csusguggGfaUfAfUfUfa auaagcgs{invAb}	997	asCfsgCfuUfauuaauaUf cCfcacagsusu	998
D-2176	ususaauaAfgCfGfCfGfgu guggags{invAb}	999	asCfsuCfcAfcaccgcgCf uUfauuaasusu	1000
D-2177	usasauaaGfcGfCfGfGfug uggaggs{invAb}	1001	usCfscUfcCfacaccgcGf cUfuauuasusu	1002
D-2178	asusaageGfcGfGfUfGfug gaggaas{invAb}	1003	usUfsuCfcUfccacaccGf cGfcuuaususu	1004
D-2179	usasagegCfGfUfGfUfg gaggaaas{invAb}	1005	asUfsuUfcCfuccacacCf gCfgcuuasusu	1006
D-2180	gsgsegucAfcUfGfCfGfca ugcguas{invAb}	1007	asUfsaCfGfCfaugcgcaGf uGfacgccsusu	1008

D-2181	gscsgucaCfuGfCfGfCfau gcguaus{invAb}	1009	asAfsuAfcGfcaugcgcAf gUfgacgsusu	1010
D-2182	csgsucacUfgCfGfCfAfug cguaugs{invAb}	1011	asCfsaUfaCfcaugcgcCf aGfugacgsusu	1012
D-2183	asgscaacAfgAfGfAfAfga gaucuas{invAb}	1013	asUfsaGfaUfcucuucCf uGfuugcusus	1014
D-2184	csasacagAfgAfAfGfAfga ucuaucs{invAb}	1015	asGfsaUfaGfaucucuCf uCfuguugsusu	1016
D-2185	asascagaGfaAfGfAfGfau cuaucgs{invAb}	1017	asCfsgAfuAfgaucucuUf cUfcuguususu	1018
D-2186	csasgagaAfgAfGfAfUfcu aucgcus{invAb}	1019	asAfsGfCfGfauagauCf uUfcucugsusu	1020
D-2187	asgsagaaGfaGfAfUfCfua ucgcucs{invAb}	1021	asGfsaGfcGfauagauCf cUfucucususu	1022
D-2188	gsasgaagAfgAfUfCfUfau cgcucus{invAb}	1023	asAfsGfCfGfauagauCf uCfuucucususu	1024
D-2189	asasgagaUfcUfAfUfCfgc ucucuas{invAb}	1025	usUfsaGfaGfagcgauaGf aUfcucuususu	1026
D-2190	gsasgaucUfaUfCfGfCfuc ucuaaas{invAb}	1027	asUfsuUfaGfagagcgaUf aGfaucucususu	1028
D-2191	gsasucuaUfcGfCfUfCfuc uaaauucs{invAb}	1029	usGfsaUfuUfagagagcGf aUfagaucususu	1030
D-2192	asuscuaUfcGfCfUfCfUfcu aaauacs{invAb}	1031	asUfsgAfuUfuagagagCf gAfuagausus	1032
D-2193	csgscucuCfuAfAfAfUfca ggugaas{invAb}	1033	asUfsuCfaCfcugauuuAf gAfgagcgsusu	1034
D-2194	csuscucuAfaAfUfCfAfgg ugaagas{invAb}	1035	usUfscUfuCfaccugauUf uAfgagagsusu	1036
D-2195	asasagaaGfuGfGfGfUfga uguaacs{invAb}	1037	usGfsuUfaCfaucacccAf cUfucuuususu	1038
D-2196	asasgaagUfgGfGfUfGfau guaacas{invAb}	1039	usUfsgUfuAfaucaccCf aCfuucucususu	1040
D-2197	asgsaaguGfgGfUfGfAfu guaacaas{invAb}	1041	asUfsuGfuUfaucaucCf cAfcuucususu	1042

D-2198	gsasagugGfgUfGfAfUfg uaacaaus{invAb}	1043	asAfsuUfgUfuacaucaCf cCfacuucsusu	1044
D-2199	gsasuguaAfcAfAfUfCfG uggugaas{invAb}	1045	asUfsuCfaCfcacgauGf uUfacaucsusu	1046
D-2200	asusguaaCfaAfUfCfGfug gugaaus{invAb}	1047	usAfsuUfcAfccacgauUf gUfuacaususu	1048
D-2201	usgsuaacAfaUfCfGfUfgg ugaaus{invAb}	1049	usUfsaUfuCfaccacgaUf uGfuuacasusu	1050
D-2202	gsusaacaAfuCfGfUfGfgu gaauaas{invAb}	1051	asUfsuAfuUfcaccacgAf uUfguuacsusu	1052
D-2203	usasacaaUfcGfUfGfGfug aauaaus{invAb}	1053	asAfsuUfaUfucaccacGf aUfuguuasusu	1054
D-2204	gsgsugaaUfaAfUfGfCfu gggacags{invAb}	1055	asCfsuGfuCfccagcaUf aUfucaccsusu	1056
D-2205	gsusgaauAfaUfGfCfUfg ggacagus{invAb}	1057	usApscUfgUfccagcaUf uAfuucacsusu	1058
D-2206	usasaugcUfgGfGfAfCfag uauaucs{invAb}	1059	asGfsaUfaUfacuguccCf aGfcauuasusu	1060
D-2207	asasugcuGfgGfAfCfAfg uauauccs{invAb}	1061	usGfsgAfuAfuacugucC fcAfgcauususu	1062
D-2208	asasgagaUfuAfCfCfAfag acauuus{invAb}	1063	asAfsaAfuGfucuugguA faUfcucuususu	1064
D-2209	asgsagauUfaCfCfAfAfga cauuugs{invAb}	1065	usCfsaAfaUfgucuuggU faAfucucususu	1066
D-2210	gsasgauuAfcCfAfAfGfac auuugas{invAb}	1067	asUpscAfaAfugucuugG fuAfaucucsusu	1068
D-2211	usgsagguCfaAfCfAfUfcc uaggacs{invAb}	1069	usGfsuCfcUfaggauguU fgAfccucasusu	1070
D-2212	asgsgucaAfcAfUfCfCfua ggacaus{invAb}	1071	asAfsuGfuCfcuaggauGf uUfgaccususu	1072
D-2213	gsgsucaaCfaUfCfCfUfag gacauus{invAb}	1073	asAfsaUfgUfccuaggaUf gUfugaccsusu	1074
D-2214	gsuscaacAfuCfCfUfAfgg acauuus{invAb}	1075	asAfsaAfuGfuccuaggAf uGfuugacsusu	1076

D-2215	uscsaacaUfcCfUfAfGfga cauuuus{invAb}	1077	asAfsaAfaUfguccuagGf aUfguugasusu	1078
D-2216	csasacauCfcUfAfGfGfac auuuuus{invAb}	1079	asAfsaAfaAfuguccuaGf gAfuguugsusu	1080
D-2217	csasaaagCfaCfUfUfCfu ccaucgs{invAb}	1081	usCfsgAfuGfgaagaagUf gCfuuuugsusu	1082
D-2218	asasaagcAfcUfUfCfUfuc caucgas{invAb}	1083	asUfscGfaUfggaagaaGf uGfcuuuususu	1084
D-2219	asasagcaCfuUfCfUfUfcc aucgaus{invAb}	1085	asAfsuCfGfAfuggaagaAf gUfgcuuususu	1086
D-2220	asasgcacUfuCfUfUfCfca ucgaugs{invAb}	1087	usCfsaUfcGfauggaagAf aGfugcuususu	1088
D-2221	asgscacuUfcUfUfCfCfau cgaugas{invAb}	1089	asUfscAfuCfgauggaaGf aAfugucususu	1090
D-2222	csascuucUfuCfCfAfUfcg augaugs{invAb}	1091	asCfsaUfcAfucgauggAf aGfaagugsusu	1092
D-2223	ascsuucuUfcCfAfUfCfga ugauggs{invAb}	1093	usCfscAfuCfaucgaugGf aAfgaagususu	1094
D-2224	ususccauCfGfAfUfGfAfu ggagagas{invAb}	1095	usUfscUfcUfccaucuCf gAfuggaasusu	1096
D-2225	cscsaucgAfuGfAfUfGfga gagaaas{invAb}	1097	asUfsuUfcUfcuccaucAf uCfgauggsusu	1098
D-2226	gsasuggaGfaGfAfAfAfu cauggccs{invAb}	1099	usGfsgCfcAfugauuucU fcUfccaucsusu	1100
D-2227	gsusggcuUfcAfGfUfGfu gcggccas{invAb}	1101	asUfsgGfcCfgcacacuGf aAfgccacsusu	1102
D-2228	usgsgcuuCfaGfUfGfUfg cggccacs{invAb}	1103	asGfsuGfgCfgcacacUf gAfagccasusu	1104
D-2229	gscsuucaGfuGfUfGfCfG gccacgas{invAb}	1105	usUfscGfuGfgccgcacAf cUfgaagsusu	1106
D-2230	ususcaguGfuGfCfGfGfcc acgaags{invAb}	1107	asCfsuUfcGfuggccgcAf cAfcugaasusu	1108
D-2231	ususgugaAfuAfCfUfGfg guucaccs{invAb}	1109	usGfsgUfgAfaccaguAf uUfcacaasusu	1110

D-2232	gsasauacUfgGfGfUfUfca ccaaaas{invAb}	1111	usUfsuUfuGfgugaaccCf aGfuauucsusu	1112
D-2233	asusacugGfgUfUfCfAfcc aaaaaus{invAb}	1113	asAfsuUfuUfuggugaaC fcCfaguaususu	1114
D-2234	asgscacaAfgAfUfUfAfug gccugus{invAb}	1115	usAfscAfgGfccauaaCf uUfgugcususu	1116
D-2235	csascaagAfuUfAfUfGfgc cuguaus{invAb}	1117	asAfsuAfcAfggccauaAf uCfuugugsusu	1118
D-2236	ascaagaUfuAfUfGfGfcc uguauus{invAb}	1119	asAfsaUfaCfaggccauAf aUfcuugususu	1120
D-2237	csasagauUfaUfGfGfCfcu guauugs{invAb}	1121	asCfsaAfuAfcaggccaUf aAfucuugsusu	1122
D-2238	asgsauuaUfgGfCfCfUfgu auuggas{invAb}	1123	asUfscCfaAfuacaggcCf aUfaaucususu	1124
D-2239	gsasuauGfgCfCfUfGfua uuggags{invAb}	1125	usCfsuCfcAfauacaggCf cAfuaaucsusu	1126
D-2240	gsasagucUfgAfUfAfGfa uggaauas{invAb}	1127	asUfsaUfuCfcaucuauCf aGfacuucsusu	1128
D-2241	asasgucuGfaUfAfGfAfu ggauuacs{invAb}	1129	asGfsuAfuUfccaucuaUf cAfgacusususu	1130
D-2242	asgsucugAfuAfGfAfUfg gaauacus{invAb}	1131	asAfsgUfaUfuccaucuAf uCfagacususu	1132
D-2243	gsuscugaUfaGfAfUfGfg aaauacuus{invAb}	1133	usAfsaGfuAfuuccaucUf aUfcagacsusu	1134
D-2244	uscsugauAfgAfUfGfGfa auacuuas{invAb}	1135	asUfsaAfgUfauuccauCf uAfucagasusu	1136
D-2245	asusagauGfgAfAfUfAfc uuaccaas{invAb}	1137	asUfsuGfgUfaaguauuCf cAfucuaususu	1138
D-2246	usasgaugGfaAfUfAfCfu uaccaaus{invAb}	1139	usAfsuUfgGfuaaguauU fcCfaucuasusu	1140
D-2247	asgsauggAfaUfAfCfUfua ccaauas{invAb}	1141	usUfsaUfuGfguaaguaU fuCfcaucususu	1142
D-2248	gsasuggaAfuAfCfUfUfac caauaas{invAb}	1143	asUfsuAfuUfgguaaguA fuUfccaucsusu	1144

D-2249	asusggaaUfaCfUfUfAfcc aauaags{invAb}	1145	usCfsuUfaUfugguaagU faUfuccaususu	1146
D-2250	usgsgaaUfCfUfUfAfcfa aauaags{invAb}	1147	usUfscUfuAfuugguaaG fuAfuuccasusu	1148
D-2251	asusaucaAfuAfUfCfUfu cugagas{invAb}	1149	asUfscUfcAfgaaagauAf uUfgauaususu	1150
D-2252	csusuucuGfaGfAfCfUfac agaagus{invAb}	1151	asAfscUfuCfuguagucUf cAfgaaagsusu	1152
D-2253	ususucugAfgAfCfUfAfc agaaguus{invAb}	1153	asAfsaCfuUfcuguaguCf uCfagaaasusu	1154
D-2254	ususcugaGfaCfUfAfCfag aaguuus{invAb}	1155	asAfsaAfcUfucuguagUf cUfcagaasusu	1156
D-2255	uscsugagAfcUfAfCfAfga aguuucs{invAb}	1157	asGfsaAfaCfuucuguaGf uCfucagasusu	1158
D-2256	usgsguugGfcCfAfCfAfaa aucaaas{invAb}	1159	usUfsuUfgAfuuuugugG fcCfaaccasusu	1160
D-2257	asasaugaAfaUfGfAfAfua aauaags{invAb}	1161	asCfsuUfaUfuauucaUf uUfcauuususu	1162
D-2258	ususcacaUfuUfUfUfUfca guccugs{invAb}	1163	usCfsaGfgAfcugaaaaAf aUfgugaasusu	1164
D-2259	gsusuuggCfaCfUfAfGfca gcagucs{invAb}	1165	usGfsaCfuGfcugcuagUf gCfcaaacsusu	1166
D-2260	ususuggcAfcUfAfGfCfa gcagucas{invAb}	1167	usUfsgAfcUfgcugcuagG fuGfccaaasusu	1168
D-2261	ususggcaCfuAfGfCfAfgc agucaas{invAb}	1169	usUfsuGfaCfugcugcuA fgUfgccaasusu	1170
D-2262	usgsgcacUfaGfCfAfGfca gucaaas{invAb}	1171	asUfsuUfgAfcugcugcU faGfugccasusu	1172
D-2263	gsgscacuAfgCfAfGfCfag ucaaacs{invAb}	1173	asGfsuUfuGfacugcugCf uAfgugccsusu	1174
D-2264	asusuuaGfuAfGfUfUfu uucauags{invAb}	1175	asCfsuAfuGfaaaaaacuAf cGfuaaaaususu	1176
D-2265	ususacguAfgUfUfUfUfu cauaggus{invAb}	1177	asAfscCfuAfugaaaaaCf uAfcguaasusu	1178

D-2266	usascguaGfuUfUfUfUfca uagguacs{invAb}	1179	asGfsaCfcUfaugaaaaAf cUfacguasusu	1180
D-2267	ususacauAfaAfCfAfUfac uuaaaas{invAb}	1181	asUfsuUfuAfaguauguU fuAfuguaasusu	1182
D-2268	ususaagGfuGfGfAfCfaa aagcuas{invAb}	1183	asUfsaGfcUfuuguccAf cCfuuaasusu	1184
D-2269	usasaaggUfgGfAfCfAfaa agcuacs{invAb}	1185	asGfsuAfgCfuuuugucC faCfcuuuasusu	1186
D-2270	asasggugGfaCfAfAfAfag cuaccus{invAb}	1187	asAfsgGfuAfgcuuuugU fcCfaccuususu	1188
D-2271	gsgsuggaCfaAfAfAfGfc uaccuccs{invAb}	1189	asGfsgAfgGfuagcuuuU fgUfccaccsusu	1190
D-2272	ascsgcuAfaGfAfGfAfuc aaguuus{invAb}	1191	asAfsaAfcUfugaucucUf uAfgcugususu	1192
D-2273	csasgcuaAfgAfGfAfUfca aguuuacs{invAb}	1193	usGfsaAfaCfuugaucUf uUfagcugsusu	1194
D-2274	asgscuaaGfaGfAfUfCfaa guuucas{invAb}	1195	asUfsgAfaAfcuugaucUf cUfuagcususu	1196
D-2275	cscsuggaCfaUfAfUfUfu aagauus{invAb}	1197	asAfsaUfcUfuaaaaUf gUfccaggsusu	1198
D-2276	csusggacAfuAfUfUfUfu aagauucs{invAb}	1199	usGfsaAfuCfuuaaaUf uGfuccagsusu	1200
D-2277	csusuccuUfuUfUfCfAfu uagcccas{invAb}	1201	usUfsgGfgCfuuaugaaAf aAfggaagsusu	1202
D-2278	ususccuuUfuUfCfAfUfu agcccaas{invAb}	1203	usUfsuGfgGfcuaaUf faAfaggaasusu	1204
D-2279	cscscucuAfuAfUfUfUfcc ucccuus{invAb}	1205	asAfsaGfgGfaggaaUf uAfgaggggsusu	1206
D-2280	usasuuucCfuCfCfCfUfu uuauags{invAb}	1207	asCfsuAfuAfaaaaggAf gGfaaauasusu	1208
D-2281	ususecucCfcUfUfUfUfua uagucus{invAb}	1209	asAfsgAfcUfaaaaaGf gGfaggaasusu	1210
D-2282	uscscuccCfuUfUfUfUfau agucuus{invAb}	1211	usAfsaGfaCfuauaaaaAf gGfgaggasusu	1212

D-2283	cscsuuuUfaUfAfGfUfc uuauaags{invAb}	1213	usCfsuUfaUfaagacuaUf aAfaaaggsusu	1214
D-2284	csusuuuAfuAfGfUfCfu uauaagas{invAb}	1215	asUfscUfuAfuaagacuAf uAfaaaagsusu	1216
D-2285	ususuuuUfaGfUfCfUfu auaagaas{invAb}	1217	usAfsuCfuUfaaagacUf aUfaaaaasusu	1218
D-2286	ususuuauAfgUfCfUfUfa uaagauas{invAb}	1219	asUfsaUfcUfuauaagaCf uAfuaaaasusu	1220
D-2287	ususuaaGfuCfUfUfAfu aagauacs{invAb}	1221	usGfsuAfuCfuuaaagA fcUfaaaaasusu	1222
D-2288	ususauagUfcUfUfAfUfaa gauacas{invAb}	1223	asUfsgUfaUfcuauaaGf aCfuauaasusu	1224
D-2289	usasuaguCfuUfAfUfAfa gauacaas{invAb}	1225	asAfsuGfuAfucuuauaA fgAfcuauasusu	1226
D-2290	uscsuuauAfaGfAfUfAfca uuauagas{invAb}	1227	usUfscAfuAfauguaucU fuAfuaagasusu	1228
D-2291	ususuuaaGfuUfCfUfAfg cccaugs{invAb}	1229	usCfsaUfgGfggcuagaAf cUfuaaaaasusu	1230
D-2292	ususuaagUfuCfUfAfGfcc ccaugas{invAb}	1231	asUfscAfuGfgggcuagA faCfuuaaasusu	1232
D-2293	usasaguuCfuAfGfCfCfcc augauas{invAb}	1233	usUfsaUfcAfuggggcuA fgAfacuuaasusu	1234
D-2294	asasguucUfaGfCfCfCfca ugauaas{invAb}	1235	asUfsuAfuCfauggggcU faGfaacuususu	1236
D-2295	asgsuucuAfgCfCfCfCfau gauaacs{invAb}	1237	asGfsuUfaUfcauggggCf uAfgaacususu	1238
D-2296	gsusucuaGfcCfCfCfAfug auaaccs{invAb}	1239	asGfsgUfuAfucaugggG fcUfagaacsusu	1240
D-2297	csusagccCfcAfUfGfAfua accuuus{invAb}	1241	asAfsaAfgGfuuaucGf gGfgcuagsusu	1242
D-2298	asgsccccAfuGfAfUfAfac cuuuuus{invAb}	1243	asAfsaAfaAfgguuaucAf uGfgggcususu	1244
D-2299	gscscccaUfgAfUfAfAfcc uuuuucs{invAb}	1245	asGfsaAfaAfagguuauCf aUfggggcsusu	1246

D-2300	cscscaugAfuAfAfCfCfu uuucuus{invAb}	1247	asAfsaGfaAfaaagguuAf uCfaugggsusu	1248
D-2301	cscsaugaUfaAfCfCfUfu uucuuus{invAb}	1249	asAfsaAfgAfaaaagguUf aUfcaugggsusu	1250
D-2302	csasugauAfaCfCfUfUfu ucuuugs{invAb}	1251	asCfsaAfaGfaaaaaggUf uAfucaugsusu	1252
D-2303	asusaaccUfuUfUfUfCfu uguaaus{invAb}	1253	asAfsuUfaCfaaagaaaAf aGfguuaususu	1254
D-2304	ususuuucUfuUfGfUfAfa uuuaugcs{invAb}	1255	asGfscAfuAfaauuacaAf aGfaaaaasusu	1256
D-2305	ususuuuUfuGfUfAfAfu uuauugcs{invAb}	1257	asAfsGcfaUfaaaauacAf aAfgaaaasusu	1258
D-2306	gsgscuauUfaCfAfUfAfag aaacaas{invAb}	1259	asUfsuGfuUfucuuauG faAfuagccsusu	1260
D-2307	csusauuaCfaUfAfAfGfaa acaugs{invAb}	1261	asCfsaUfuGfuuuuuUf gUfaauagsusu	1262
D-2308	ususacauAfaGfAfAfAfca auggacs{invAb}	1263	asGfsuCfcAfuuguuucU fuAfuguaasusu	1264
D-2309	usascauaAfgAfAfAfCfaa uggaccs{invAb}	1265	asGfsgUfcCfauguuuCf uUfauguasusu	1266
D-2310	ascsauaaGfaAfAfCfAfau ggacccs{invAb}	1267	usGfsgGfuCfcuuuuU fcUfuaugususu	1268
D-2311	asasgaaaCfaAfUfGfGfac ccaagas{invAb}	1269	asUfscUfuGfgguccauUf gUfuucuususu	1270
D-2312	asgsaaacAfaUfGfGfAfcc caagags{invAb}	1271	usCfsuCfuUfggguccaUf uGfuuuucususu	1272
D-2313	gsasaacaAfuGfGfAfCfcc aagagas{invAb}	1273	usUfscUfcUfuggguccA fuUfguuucsusu	1274
D-2314	asasuagaAfaAfAfAfUfaa uccgacs{invAb}	1275	asGfsuCfgGfaauuuuU fuUfcuaususu	1276
D-2315	asusagaaAfaAfAfUfAfau ccgacus{invAb}	1277	asAfsGfGfgauuuuuU fuUfucuaususu	1278
D-2316	asasaacaAfuUfCfAfCfua aaaauas{invAb}	1279	usUfsaUfuUfuagugaA fuUfguuuususu	1280

D-2317	usgsuaguUfaUfAfAfAfa uaaaacgs{invAb}	1281	asCfsgUfuUfuauuuuaU faAfcuacasusu	1282
D-2318	asasuaaaAfcGfUfUfUfga cuucuas{invAb}	1283	usUfsaGfaAfgucaaacGf uUfuauuususu	1284
D-2319	asusaaaaCfGfUfUfGfac uucuaas{invAb}	1285	usUfsuAfgAfagucaaaCf gUfuuuauususu	1286
D-2320	usasaaacGfuUfUfGfAfcu ucuaaas{invAb}	1287	asUfsuUfaGfaagucaaAf cGfuuuuauususu	1288
D-2321	asasaacgUfuUfGfAfCfu cuaaacs{invAb}	1289	asGfsuUfuAfgaagucaAf aCfguuuuususu	1290
D-2322	asasacguUfuGfAfCfUfuc uaaacus{invAb}	1291	asAfsgUfuUfagaagucAf aAfcguuuususu	1292

ПРИМЕР 3. Анализ siRNA для HSD17B13-rs738409 и HSD17B13-rs738409-rs738408 методом цифровой капельной ПЦР

[0171] Следуя протоколу производителя, размороженные первичные клетки гепатоциты человека (Xenotech/Sekisui, донорская партия HC3-38) в среде OptiThaw (Xenotech, № по кат. K8000) центрифугировали и после аспирации среды ресуспендировали в среде для гепатоцитов OptiPlate (Xenotech, № по кат. K8200) и высевали в 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном (Greiner, № по кат. 655950). После 2-4-часового периода инкубирования среду удаляли и заменяли средой для гепатоцитов OptiCulture (Xenotech, № по кат. K8300). Через 2-4 часа после добавления среды OptiCulture в клетки доставляли siRNA, конъюгированные с GalNAc, путем свободного захвата (без реагента для трансфекции) в различных концентрациях вплоть до 3,8 мкМ. Клетки инкубировали в течение 24-72 часов при 37°C и 5% CO₂. Затем клетки лизировали буфером Qiagen RLT (79216) + 1% 2-меркаптоэтанол (Sigma, M-3148), и лизаты хранили при -20°C. РНК очищали с помощью прибора Qiagen QIAcube HT (9001793) и набора Qiagen RNeasy 96 QIAcube HT (74171) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы анализировали с помощью системы QIAxpert (9002340). кДНК синтезировали из образцов РНК с использованием набора для высокопроизводительной обратной транскрипции в кДНК Applied Biosystems (4368813), при этом реакции проводили в соответствии с инструкциями производителя, а концентрация вносимой РНК варьировалась в зависимости от образца. Обратную транскрипцию проводили на термоциклере BioRad Tetrad (модель № PTC-0240G) в следующих условиях: 25°C - 10 минут, 37°C - 120 минут, 85°C - 5 минут с последующим (необязательным) неограниченным по времени выдерживанием при 4°C.

[0172] Цифровую капельную ПЦР (ddPCR) проводили с помощью системы для цифровой капельной ПЦР AutoDG QX200 от BioRad в соответствии с инструкциями производителя. Реакции проводили в прозрачном 96-луночном планшете для ПЦР от

Eppendorf (951020303) с использованием супермикса для ddPCR от BioRad для зондов (1863010) и флуоресцентно меченных реагентов для анализов методом qPCR для HSD17B13 (IDT Hs.PT.58.21464637, соотношение праймеров и зондов 3,6:1) и TBP (IDT Hs.PT.53a.20105486, соотношение праймеров и зондов 3,6:1), а также воды, не содержащей РНКаз (Ambion, AM9937). Конечная концентрация праймеров/зондов составляла 900 нМ/250 нМ соответственно, концентрация вносимой кДНК варьировалась среди разных лунок. Капли формировали с использованием генератора капель Auto DG от BioRad (1864101), настроенного с учетом рекомендуемых производителем расходных материалов (картриджи DG32 1864108 от BioRad, наконечники 1864121 от BioRad, синий 96-луночный планшет для ПЦР 951020362 от Eppendorf, масло для формирования капель для зондов 1864110 от BioRad и панель в сборе для капель от BioRad). Капли подвергали амплификации на термоциклере BioRad C1000 Touch (1851197), используя следующие условия: активация фермента при 95°C в течение 10 минут, денатурация при 94°C в течение 30 секунд с последующим отжигом/удлинением при 60°C в течение одной минуты, 40 циклов при скорости линейного изменения температуры 2°C/секунда, деактивация фермента при 98°C в течение 10 минут с последующим (необязательным) неограниченным по времени выдерживанием при 4°C. Затем образцы прочитывали на устройстве для прочитывания капель QX200 от BioRad, измеряющем сигнал FAM/HEX, который коррелирует с концентрацией HSD17B13 или TBP. Данные анализировали с использованием пакета программного обеспечения QuantaSoft от BioRad. Образцы гейтировали по каналу (флуоресцентной метке) для определения концентрации в каждом образце. Каждый образец затем выражали как соотношение концентрации представляющего интерес гена (HSD17B13) и концентрации гена "домашнего хозяйства" (TBP) для учета различий в загрузке образцов. Затем данные импортировали в Genedata Screener, где каждая тестируемая siRNA нормализуется относительно медианных значений в нейтральных контрольных лунках (содержащих только буфер). Значения IC50 представлены в таблице 3.

Таблица 3. Анализ методом ddPCR на первичных клетках-гепатоцитах

№ дуплекса	IC50 (мкМ)	% нокдауна HSD17B13
D-2107	0,0112	-88,9134
D-2015	0,0112	-91,9705
D-2016	0,0296	-87,2192
D-2014	0,0343	-80,4788

Пример 4. Скрининг химически модифицированных молекул siRNA для HSD17B13 у крыс дикого типа

[0173] Самцов крыс линии Спрег-Дуули в возрасте 9-10 недель и массой тела 350-400 г получали из Charles River Laboratories (Charles River Laboratories, Inc, Массачусетс). После акклиматизации этих животных рандомизировали в зависимости от массы тела. В каждую группу включали 6 крыс, и им подкожно вводили дозу 3 миллиграмма siRNA для

HSD17B13 на килограмм массы тела. Дозируемые соединения разбавляли в фосфатном буферном растворе без кальция и магния (Thermo Fisher Scientific, 14190-136). Через 30 дней после обработки с помощью siRNA животных подвергали эвтаназии, и собирали печени. Свежевыделенную левую долю печени незамедлительно подвергали мгновенной заморозке в жидком азоте. 30-50 мг ткани печени использовали для выделения РНК с помощью прибора QIAcube HT и набора RNeasy 96 QIAcube HT в соответствии с протоколом производителя. 2-4 мкг РНК обрабатывали ДНКазой RQ1, не содержащей РНКаз (Promega, M6101). 10 нг РНК, расщепленной ДНКазой, подвергали qPCR в режиме реального времени с использованием 1-стадийного набора TaqMan RNA-to-CT (Applied Biosystems), проводимой на устройстве для ПЦР в режиме реального времени QuantStudio. Зонды TaqMan для HSD17B13 крысы (Rn_01450039_m1, анализы экспрессии Taqman от Invitrogen) использовали для измерения экспрессии, которую нормализовали относительно экспрессии гена "домашнего хозяйства" HMBS (гидроксиметилбилансинтазы Rn01421873_g1, анализы экспрессии Taqman от Invitrogen). Относительную кратность изменения рассчитывали по сравнению с когортой PBS. Данные представлены в виде процента нокдауна в группе, обработанной siRNA, по сравнению с PBS. Тестировали в общей сложности 23 стимулирующие молекулы. Результаты показаны в таблице 4. Отрицательные значения указывают на повышение уровней HSD17B13.

Таблица 4. День 30 - процент сайленсинга у крыс, обработанных siRNA для HSD17B13

№ дуплекса	Введенная доза	% нокдауна HSD17B13
D-2128	3 мг/кг	30,01
D-2130	3 мг/кг	29,72
D-2132	3 мг/кг	-3,06
D-2134	3 мг/кг	35,70
D-2144	3 мг/кг	-10,08
D-2136	3 мг/кг	44,10
D-2129	3 мг/кг	22,62
D-2131	3 мг/кг	15,73
D-2133	3 мг/кг	13,87
D-2135	3 мг/кг	17,91
D-2145	3 мг/кг	1,38
D-2137	3 мг/кг	36,82
D-2138	3 мг/кг	1,26
D-2139	3 мг/кг	15,34

D-2140	3 мг/кг	45,71
D-2141	3 мг/кг	30,72
D-2142	3 мг/кг	66,39
D-2143	3 мг/кг	31,92
D-2146	3 мг/кг	4,41
D-2147	3 мг/кг	10,70
D-2148	3 мг/кг	15,92
D-2015	3 мг/кг	35,10
D-2016	3 мг/кг	24,79

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конструкция для RNAi, содержащая смысловую нить и антисмысловую нить, где антисмысловая нить содержит участок, имеющий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности, представленной в таблице 1 или 2, и где конструкция для RNAi подавляет экспрессию 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы 13 типа (HSD17B13).

2. Конструкция для RNAi по п. 1, где антисмысловая нить содержит участок, который комплементарен последовательности мРНК HSD17B13.

3. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где смысловая нить содержит участок, имеющий по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от антисмысловой последовательности, представленной в таблице 1 или 2.

4. Конструкция для RNAi по любому из предыдущих пунктов, где смысловая нить содержит последовательность, которая комплементарна последовательности антисмысловой нити в достаточной степени, чтобы образовать дуплексный участок длиной от приблизительно 15 до приблизительно 30 пар оснований.

5. Конструкция для RNAi по п. 4, где длина дуплексного участка составляет от приблизительно 17 до приблизительно 24 пар оснований.

6. Конструкция для RNAi по п. 4, где длина дуплексного участка составляет от приблизительно 19 до приблизительно 21 пары оснований.

7. Конструкция для RNAi по п. 6, где длина дуплексного участка составляет 19 пар оснований.

8. Конструкция для RNAi по п. 6, где длина дуплексного участка составляет 20 пар оснований.

9. Конструкция для RNAi по п. 6, где длина дуплексного участка составляет 21 пару оснований.

10. Конструкция для RNAi по любому из пп. 4-9, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити составляет от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов.

11. Конструкция для RNAi по п. 10, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити составляет от приблизительно 19 до приблизительно 27 нуклеотидов.

12. Конструкция для RNAi по п. 10, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити составляет от приблизительно 21 до приблизительно 25 нуклеотидов.

13. Конструкция для RNAi по п. 10, где длина каждой из смысловой нити и антисмысловой нити составляет от приблизительно 21 до приблизительно 23 нуклеотидов.

14. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-13, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один "тупой" конец.

15. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-13, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один нуклеотидный "липкий" конец из 1-4 неспаренных нуклеотидов.

16. Конструкция для RNAi по п. 15, где нуклеотидный "липкий" конец содержит 2 неспаренных нуклеотида.

17. Конструкция для RNAi по п. 15 или п. 16, где конструкция для RNAi содержит нуклеотидный "липкий" конец на 3'-конце смысловой нити, 3'-конце антисмысловой нити или 3'-конце как смысловой нити, так и антисмысловой нити.

18. Конструкция для RNAi по любому из пп. 15-17, где нуклеотидный "липкий" конец содержит динуклеотид 5'-UU-3' или динуклеотид 5'-dTdT-3'.

19. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-18, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

20. Конструкция для RNAi по п. 19, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-модифицированный нуклеотид.

21. Конструкция для RNAi по п. 19, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, бициклическую нуклеиновую кислоту (BNA), гликолевую нуклеиновую кислоту, инвертированное основание или их комбинации.

22. Конструкция для RNAi по п. 21, где модифицированный нуклеотид представляет собой 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид или их комбинации.

23. Конструкция для RNAi по п. 19, где все нуклеотиды в смысловой и антисмысловой нитях представляют собой модифицированные нуклеотиды.

24. Конструкция для RNAi по п. 23, где модифицированные нуклеотиды представляют собой 2'-О-метил-модифицированные нуклеотиды, 2'-фтор-модифицированные нуклеотиды или их комбинации.

25. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-24, где конструкция для RNAi содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную межнуклеотидную связь.

26. Конструкция для RNAi по п. 25, где конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце антисмысловой нити.

27. Конструкция для RNAi по п. 25, где конструкция для RNAi содержит две последовательные фосфотиоатные межнуклеотидные связи как на 3'-, так и на 5'-конце антисмысловой нити и две последовательные фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце смысловой нити.

28. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-27, где антисмысловая нить содержит последовательность, выбранную из антисмысловых последовательностей, представленных в таблице 1 или таблице 2.

29. Конструкция для RNAi по п. 28, где смысловая нить содержит последовательность, выбранную из смысловых последовательностей, представленных в таблице 1 или таблице 2.

30. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-29, где конструкция для RNAi представляет собой любое из дуплексных соединений, представленных в любой из таблиц 1-2.

31. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-30, где конструкция для RNAi обеспечивает снижение уровня экспрессии HSD17B13 в клетках печени после инкубирования с конструкцией для RNAi по сравнению с уровнем экспрессии HSD17B13 в клетках печени, которые были инкубированы с контрольной конструкцией для RNAi.

32. Конструкция для RNAi по п. 25, где клетки печени представляют собой первичные клетки-гепатоциты.

33. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-32, где конструкция для RNAi подавляет экспрессию HSD17B13 в первичных клетках-гепатоцитах при IC50, составляющей менее чем приблизительно 40 нМ.

34. Конструкция для RNAi по любому из пп. 1-32, где конструкция для RNAi подавляет экспрессию HSD17B13 в первичных клетках-гепатоцитах при IC50, составляющей менее чем приблизительно 30 нМ.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию для RNAi по любому из пп. 1-34 и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

36. Способ снижения экспрессии HSD17B13 у нуждающегося в этом пациента, включающий введение пациенту конструкции для RNAi по любому из пп. 1-35.

37. Способ по п. 36, где уровень экспрессии HSD17B13 в гепатоцитах у пациента снижается после введения конструкции для RNAi по сравнению с уровнем экспрессии HSD17B13 у пациента, не получающего конструкцию для RNAi.

По доверенности