

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037110**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.02.08**

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

**(21)** Номер заявки  
**201591075**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.12.05**

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ С ИРНК К PCSK9 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 61/733,518; 61/793,530; 61/886,916;  
61/892,188

**(56)** WO-A2-2010148013  
WO-A2-2012058693

**(32)** 2012.12.05; 2013.03.15; 2013.10.04;  
2013.10.17

**(33)** US

**(43)** 2015.11.30

**(86)** PCT/US2013/073349

**(87)** WO 2014/089313 2014.06.12

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

**(72)** Изобретатель:  
**Бородовский Анна, Каллантхоттатхил  
Раджив Г., Фитцджеральд Кевин,  
Франк-Каменетски Мария, Куэрбс  
Уильям, Майер Мартин, Хариссе  
Клаус, Кучиманчи Сатиянараяна,  
Манохаран Мутхиах, Милстейн  
Стьюарт (US)**

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

---

**(57)** Изобретение относится к средствам для RNAi, например двухцепочечным средствам для RNAi, нацеленным на ген PCSK9, и способам применения таких средств для RNAi для ингибирования экспрессии PCSK9 и способам лечения субъектов с нарушением липидного обмена, таким как гиперлипидемия.

---

**B1**

**037110**

**037110**

**B1**

### Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 61/733518, поданной 5 декабря 2012 г.; предварительной заявки на патент США № 61/793530, поданной 15 марта 2013 г.; предварительной заявки на патент США № 61/886916, поданной 4 октября 2013 г.; и предварительной заявки на патент США № 61/892188, поданной 17 октября 2013 г. Данная заявка также является родственной предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г. Полное содержание каждой из вышеупомянутых предварительных заявок на патенты, таким образом, включено в данный документ посредством ссылки.

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате с кодировкой ASCII и, таким образом, включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия файла с кодировкой ASCII, созданная 29 октября 2013 г., имеет название 121301-00420\_SL.txt, и ее размер составляет 433512 байт.

### Уровень техники

Пропротейн конвертаза субтилизин/кексин 9 (PCSK9) является представителем семейства субтилизиновых сериновых протеаз. Другие восемь субтилизиновых протеаз млекопитающих, PCSK1-PCSK8 (также называемых PC 1/3, PC2, фурин, PC4, PC 5/6, PACE4, PC7 и S1P/SKI-1), являются пропротейн конвертазами, которые обрабатывают широкий спектр белков секреторного пути и играют роль в различных биологических процессах (Bergeron F. (2000) *J. Mol. Endocrinol.* 24, 1-22, Gensberg K., (1998) *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 11-17, Seidah N.G. (1999) *Brain Res.* 848, 45-62, Taylor N.A. (2003) *FASEB J.* 17, 1215-1227 и Zhou A. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20745-20748).

Выдвигалось предположение, что PCSK9 играет роль в метаболизме холестерина. Экспрессия мРНК PCSK9 подавлялась у мышей при помощи диетического в отношении холестерина питания (Maxwell K.N. (2003) *J. Lipid Res.* 44, 2109-2119), активировалась статинами в клетках HepG2 (Dubuc G. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1454-1459) и активировалась у трансгенных в отношении белка, связывающего стерол-регулирующие элементы, (SREBP) мышей (Horton J.D. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12027-12032), как и в случае с ферментами, участвующими в биосинтезе холестерина, и рецептором липопротеинов низкой плотности (LDLR). Кроме того, как было обнаружено, миссенс-мутации в PCSK9 ассоциированы с формой аутосомно-доминантной гиперхолестеринемии (Hchola3) (Abifadel M. et al. (2003) *Nat. Genet.* 34, 154-156, Timms K.M., (2004) *Hum. Genet.* 114, 349-353, Leren T.P. (2004) *Clin. Genet.* 65, 419-422). PCSK9 может также играть роль в определении уровня холестерина LDL в общей популяции, поскольку виды однонуклеотидного полиморфизма (SNP) были ассоциированы с уровнями холестерина у населения Японии (Shioji K. (2004) *J. Hum. Genet.* 49, 109-114).

Типы аутосомно-доминантной гиперхолестеринемии (ADH) являются моногенными заболеваниями, при которых у пациентов проявляются повышенные уровни общего холестерина и холестерина LDL, ксантомы сухожилий и преждевременный атеросклероз (Rader D.J. (2003) *J. Clin. Invest.* 111, 1795-1803). Патогенез типов ADH и рецессивной формы, аутосомно-рецессивной гиперхолестеринемии (ARH) (Cohen J.C. (2003) *Surg. Opin. Lipidol.* 14, 121-127), объясняется нарушениями поглощения LDL печенью. ADH может быть вызвана мутациями LDLR, которые препятствуют поглощению LDL, или мутациями в белке на LDL, аполипопротеине В, который связывается с LDLR. ARH вызвана мутациями в белке ARH, который необходим для эндоцитоза комплекса LDLR-LDL посредством его взаимодействия с клатрином. Таким образом, если мутации PCSK9 являются каузативными в семействах Hchola3, то, по-видимому, PCSK9 играет роль в опосредованном рецептором поглощении LDL.

Исследования сверхэкспрессии указывают на роль PCSK9 в регулировании уровней LDLR и, таким образом, поглощении LDL печенью (Maxwell K.N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105, Benjannet S. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875, Park S.W. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638). Опосредованная аденовирусом сверхэкспрессия PCSK9 мыши или человека в течение 3 или 4 дней у мышей приводила к повышенным уровням общего холестерина и холестерина LDL; данное воздействие не прослеживается у нокаутных по LDLR животных (Maxwell K.N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105, Benjannet S. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875, Park S.W. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638). Кроме того, сверхэкспрессия PCSK9 приводила к резкому сокращению количества белка печеночного LDLR без влияния на уровни мРНК LDLR, уровни белка SREBP или отношение ядерного белка SREBP к цитоплазматическому.

Несмотря на то что гиперхолестеринемия сама по себе является бессимптомной, длительное повышение сывороточного холестерина может приводить к атеросклерозу. Постоянно повышенный в течение десятилетий сывороточный холестерин способствует образованию атеросклеротических бляшек в артериях, что может привести к прогрессирующему стенозу или даже к полному закупориванию затронутых артерий. Кроме того, меньшие бляшки могут отрываться, и вызывать образование тромба, и перекрывать ток крови, приводя, например, к инфаркту миокарда и/или инсульту. Если образование стеноза или закупоривание постепенные, то кровоснабжение тканей и органов медленно сокращается до тех пор, пока не нарушаются функции органа.

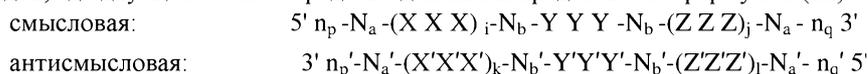
Соответственно, в данной области существует потребность в эффективных средствах лечения ассо-

цированных с PCSK9 заболеваний, таких как гиперлипидемия, например гиперхолестеринемия.

### Краткое описание изобретения

Как описано более подробно ниже, в данном документе раскрыты композиции, содержащие средства для RNAi, например, средства, представляющие собой двухцепочечную иРНК, нацеленные на PCSK9. Также раскрыты способы применения композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии PCSK9 и для лечения патологий, связанных с экспрессией PCSK9, например гиперхолестеринемии.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III)



(III),

где каждая из  $i$ ,  $j$ ,  $k$  и  $l$  независимо равняется 0 или 1;

каждая из  $p$ ,  $p'$ ,  $q$  и  $q'$  независимо равняется 0-6;

каждая  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждая  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

каждая  $n_p$ ,  $n_p'$ ,  $n_q$  и  $n_q'$ , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

каждая из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации  $Y$ , а модификации  $N_b'$  отличаются от модификации  $Y'$ ; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном варианте осуществления  $i$  равняется 0;  $j$  равняется 0;  $i$  равняется 1;  $j$  равняется 1; как  $i$ , так и  $j$  равняются 0 или как  $i$ , так и  $j$  равняются 1. В другом варианте осуществления  $k$  равняется 0;  $l$  равняется 0;  $k$  равняется 1;  $l$  равняется 1; как  $k$ , так и  $l$  равняется 0; или как  $k$ , так и  $l$  равняется 1.

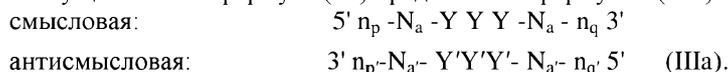
В одном варианте осуществления XXX комплементарен X'X'X', YYY комплементарен Y'Y'Y', и ZZZ комплементарен Z'Z'Z'.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним.

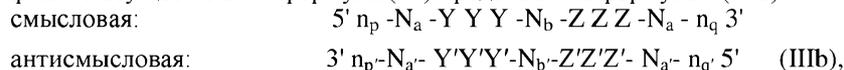
В одном варианте осуществления мотив Y'Y'Y' находится в 11, 12 и 13 положениях антисмысловой нити от 5'-конца.

В одном варианте осуществления  $Y'$  представляет собой 2'-О-метил.

В одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIa)

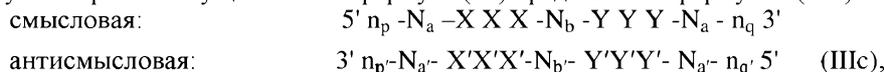


В другом варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIb)



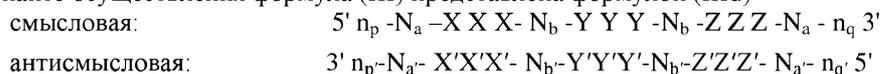
где каждая  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

В еще другом варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIc):



где каждая  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIId)



(IIIId),

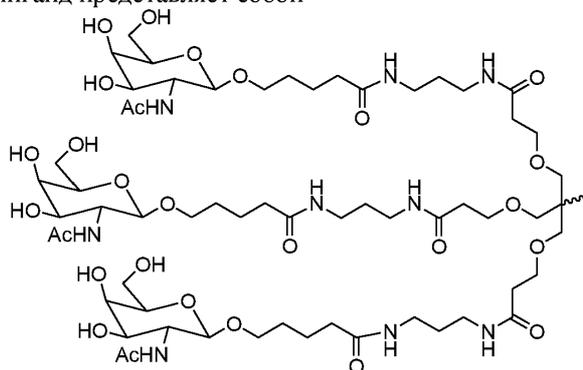
где каждая  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, со-

держущую 1-5 модифицированных нуклеотидов, и каждая  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 15-30 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 17-23 пары нуклеотидов. В еще одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 17-25 пар нуклеотидов. В одном варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 23-27 пар нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 19-21 пару нуклеотидов. В другом варианте осуществления двухцепочечный участок составляет в длину 21-23 пары нуклеотидов. В одном варианте осуществления каждая нить содержит 15-30 нуклеотидов.

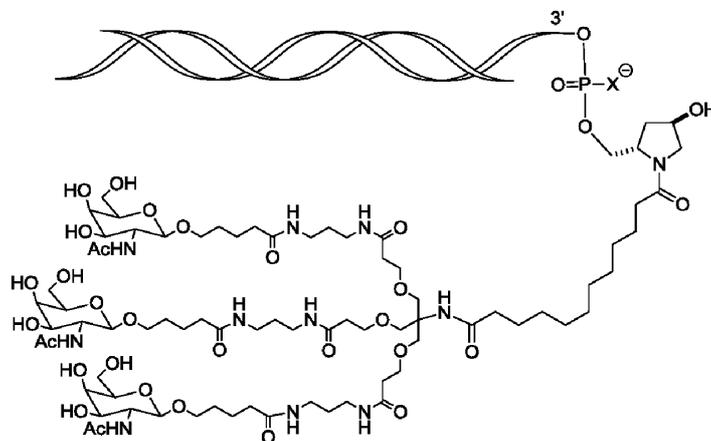
В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезоксид, 2'-гидроксила и их комбинаций. В другом варианте осуществления модификациями нуклеотидов являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации.

В одном варианте осуществления лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. В другом варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления лиганд прикреплен к 3'-концу смысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S. В конкретном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной нити. В одном варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной нити. В одном варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления нить представляет собой смысловую нить.

В одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной нити. В одном варианте осуществления нить представляет собой антисмысловую нить.

В одном варианте осуществления пара оснований в 1 положении 5'-конца антисмысловой нити дуплекса является парой оснований AU.

В одном варианте осуществления нуклеотиды Y имеют 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления нуклеотиды Y' имеют 2'-О-метил-модификацию.

В одном варианте осуществления  $p' > 0$ . В другом варианте осуществления  $p' = 2$ .

В одном варианте осуществления  $q' = 0$ ,  $p = 0$ ,  $q = 0$ , и выступающие нуклеотиды p' комплементарны целевой мРНК. В другом варианте осуществления  $q' = 0$ ,  $p = 0$ ,  $q = 0$ , и выступающие нуклеотиды p' не комплементарны целевой мРНК.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит в общей сложности 21 нуклеотид, а антисмысловая нить содержит в общей сложности 23 нуклеотида.

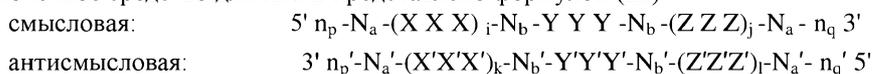
В одном варианте осуществления по меньшей мере один  $n_p'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи.

В одном варианте осуществления все  $n_p'$  связаны с соседними нуклеотидами посредством фосфотиоатных связей.

В одном варианте осуществления средство для RNAi выбрано из группы средств для RNAi, перечисленных в табл. 1, 2, 9, 10, 12 и на фиг. 12.

В одном варианте осуществления средство для RNAi выбрано из группы, состоящей из AD-53815, AD-56663, AD-56658, AD-56676, AD-56666, AD-57928 и AD-60212.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III)



(III),

где каждая из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1;

каждая из p, p', q и q' независимо равняется 0-6;

каждая  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждая  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

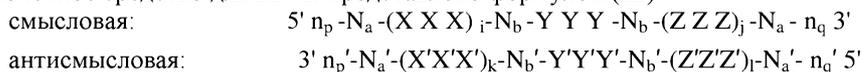
каждая  $n_p$ ,  $n_p'$ ,  $n_q$  и  $n_q'$ , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

каждая из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации Y, а модификации  $N_b'$  отличаются от модификации Y'; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В еще другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III)



(III),

где каждая из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1;

каждая  $n_p$ ,  $n_q$  и  $n_q'$ , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждая из p, q и q' независимо равняется 0-6;

$n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждая  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

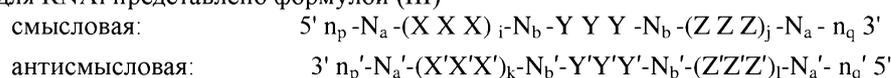
каждая  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

каждая из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из

трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации  $Y$ , а модификации  $N_b'$  отличаются от модификации  $Y'$ ; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом. В дополнительном аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III)



(III),

где каждая из  $i, j, k$  и  $l$  независимо равняется 0 или 1;

каждая  $n_p, n_q$  и  $n_q'$ , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

каждая из  $p, q$  и  $q'$  независимо равняется 0-6;

$n_p > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждая  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

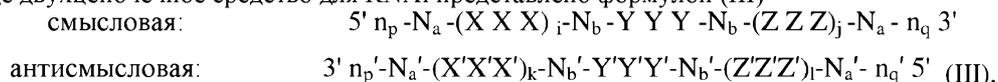
каждая  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

каждая из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации  $Y$ , а модификации  $N_b'$  отличаются от модификации  $Y'$ ; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III)



где каждая из  $i, j, k$  и  $l$  независимо равняется 0 или 1; каждая  $n_p, n_q$  и  $n_q'$ , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждая из  $p, q$  и  $q'$  независимо равняется 0-6;

$n_p > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждая  $N_a$  и  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждая  $N_b$  и  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

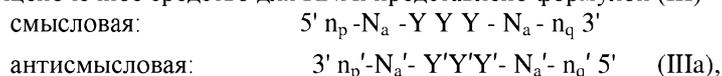
каждая из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

модификации  $N_b$  отличаются от модификации  $Y$ , а модификации  $N_b'$  отличаются от модификации  $Y'$ ;

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В еще другом аспекте настоящее изобретение предусматривает средства для RNAi, например, двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию пропротеин конвертазы суб-

тилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, где двухцепочечное средство для RNAi содержит смысловую нить, комплементарную антисмысловой нити, где антисмысловая нить содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9, где каждая нить составляет в длину от примерно 14 до примерно 30 нуклеотидов, где двухцепочечное средство для RNAi представлено формулой (III)



где каждая  $n_p$ ,  $n_q$  и  $n'_q$ , каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

каждая из  $p$ ,  $q$  и  $q'$  независимо равняется 0-6;

$n_p > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p$  связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждая  $N_a$  и  $N'_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждая из  $YYY$  и  $Y'Y'Y'$  независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

где смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь; и

где смысловая нить конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом, где лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

Настоящее изобретение также предусматривает клетки, векторы, клетки-хозяева и фармацевтические композиции, содержащие двухцепочечные средства для RNAi согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает средство для RNAi, выбранное из группы, состоящей из средств для RNAi, перечисленных в табл. 1, 2, 9, 10, 12 и на фиг. 12.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят при помощи фармацевтической композиции.

В предпочтительных вариантах осуществления средство для RNAi вводят в растворе. В некоторых таких вариантах осуществления siRNA вводят в небуферном растворе. В одном варианте осуществления siRNA вводят в воде. В других вариантах осуществления siRNA вводят при помощи буферного раствора, такого как ацетатный буфер, цитратный буфер, буфер с проламином, карбонатный буфер или фосфатный буфер или любая их комбинация. В некоторых вариантах осуществления буферным раствором является забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции дополнительно содержат липидный состав. В одном варианте осуществления липидный состав включает LNP или XTC. В другом варианте осуществления липидный состав включает MC3.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке. Способы включают приведение в контакт клетки со средством для RNAi, например двухцепочечным средством для RNAi, или вектором согласно настоящему изобретению и поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для обеспечения расщепления мРНК-транскрипта гена PCSK9, ингибируя, таким образом, экспрессию гена PCSK9 в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления экспрессию PCSK9 ингибируют по меньшей мере примерно на 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95%.

В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта с нарушением, опосредованным экспрессией PCSK9. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например двухцепочечного средства для RNAi, или вектора согласно настоящему изобретению, таким образом, осуществляя лечение субъекта.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления у человека имеется гиперхолестеринемия.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, например двухцепочечное средство для RNAi, вводят в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 0,5 мг/кг до примерно 50 мг/кг, от примерно 10 мг/кг до примерно 30 мг/кг, от примерно 10 мг/кг до примерно 20 мг/кг, от примерно 15 мг/кг до примерно 20 мг/кг, от примерно 15 мг/кг до примерно 25 мг/кг, от примерно 15 мг/кг до примерно 30 мг/кг или от примерно 20 мг/кг до примерно 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, например двухцепочечное средство для RNAi, вводят подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят в режиме дозирования, который включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения включает введение дозы 2, 1 или 0,5 мг/кг пять раз в неделю и где фаза поддержания включает введение дозы 2, 1 или 0,5 мг/кг

один раз, два раза или три раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза примерно каждые 12 ч, одного раза примерно каждые 24 ч, одного раза примерно каждые 48 ч, одного раза примерно каждые 72 ч и одного раза примерно каждые 96 ч.

В еще другом аспекте настоящее изобретение предусматривает способы лечения гиперхолестеринемии у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства для RNAi, например двухцепочечного средства для RNAi, или вектора согласно настоящему изобретению, таким образом, осуществляя лечение субъекта.

В одном варианте осуществления субъектом является примат или грызун. В другом варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, например двухцепочечное средство для RNAi, вводят в дозе от примерно 0,01 мг/кг до примерно 10 мг/кг или от примерно 0,5 мг/кг до примерно 50 мг/кг. В другом варианте осуществления двухцепочечное средство для RNAi вводят в дозе от примерно 10 мг/кг до примерно 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство для RNAi, например двухцепочечное средство для RNAi, вводят подкожно или внутривенно.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят в режиме дозирования, который включает фазу насыщения с последующей фазой поддержания, где фаза насыщения включает введение дозы 2, 1 или 0,5 мг/кг пять раз в неделю, и где фаза поддержания включает введение дозы 2, 1 или 0,5 мг/кг один раз, два раза или три раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят с интервалами, выбранными из группы, состоящей из одного раза примерно каждые 12 ч, одного раза примерно каждые 24 ч, одного раза примерно каждые 48 ч, одного раза примерно каждые 72 ч и одного раза примерно каждые 96 ч.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают определение LDLR-генотипа или -фенотипа субъекта.

В одном варианте осуществления введение приводит к снижению уровня сывороточного холестерина у субъекта.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают определение у субъекта уровня сывороточного холестерина.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующим подробным описанием и графическими материалами.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 представляет собой график, показывающий, что при всех трех протестированных дозах наблюдается дозозависимый эффект при введении AD-48400, конъюгированного с GalNAc. AD-48399, конъюгированный с GalNAc, служит в качестве контроля;

фиг. 2A и 2B - графики, показывающие эффективность и длительность ответа *in vivo* для указанных siRNA;

на фиг. 3 представлена таблица, показывающая последовательности смысловой (SEQ ID NO: 1633-1642, соответственно, в порядке встречаемости) и антисмысловой (SEQ ID NO: 1643-1652, соответственно, в порядке встречаемости) нитей дуплексов, анализируемых в отношении эффективности *in vivo* и для оптимизации прототипа;

фиг. 4 представляет собой график, показывающий результаты анализов эффективности *in vivo* для оптимизации прототипа;

фиг. 5 - график, показывающий результаты анализов эффекта дозы *in vivo*, выполненных на трансгенных по PCSK9 мышах. Уровни белка PCSK9 определяли при помощи ELISA через семьдесят два часа после введения разовой дозы 10, 3, 1 и 0,3 мг/кг AD-57928;

фиг. 6 - график, показывающий уровни белка PCSK9 в сыворотке трансгенных по PCSK9 мышей после введения AD-57928 в дозах 5×2 мг/кг во время "фазы насыщения" и в дозах 1×2 или 2×2 мг/кг во время "фазы поддержания";

фиг. 7 - график, показывающий уровни белка PCSK9 в сыворотке трансгенных по PCSK9 мышей после введения AD-57928 в дозах 5×1 мг/кг во время "фазы насыщения" и в дозах 1×1 или 2×1 мг/кг во время "фазы поддержания";

фиг. 8 - график, показывающий уровни белка PCSK9 в сыворотке трансгенных по PCSK9 мышей после введения AD-57928 в дозах 5×0,5 мг/кг во время "фазы насыщения" и в дозах 1×0,5 мг/кг или 2×0,5 мг/кг во время "фазы поддержания";

фиг. 9 - график, показывающий результаты анализов эффекта дозы *in vivo*, выполненных на трансгенных по PCSK9 мышах. Уровни белка PCSK9 определяли при помощи ELISA через семьдесят два часа после введения разовой дозы 0,3 мг/кг siRNA;

фиг. 10 - график, показывающий количество AD-57928 и AD-58895 на нанограмм печени мышей C57B6 дикого типа после введения разовой дозы 1 мг/кг AD-57928 или AD-58895;

фиг. 11 - график, показывающий количество AD-57928 и AD-58895, выраженное как % теоретического количества в печени мышей C57B6 дикого типа после введения разовой дозы 1 мг/кг AD-57928 или AD-58895;

на фиг. 12A представлена таблица, показывающая средства, представляющие собой иРНК, согласно настоящему изобретению, содержащие оптимизированные последовательности по сравнению с последовательностями AD-57928. На фиг. 12A раскрыты "смысловые" последовательности как SEQ ID NO: 1653-1658, соответственно, в порядке встречаемости и "антисмысловые" последовательности как SEQ ID NO: 1659-1664, соответственно, в порядке встречаемости;

фиг. 12B - график, показывающий значения  $IC_{50}$  указанных средств, представляющих собой иРНК;

фиг. 13 - график, показывающий уровень указанных средств, представляющих собой иРНК, в печени мышей дикого типа после введения разовой дозы 1 мг/кг указанного средства, представляющего собой иРНК;

фиг. 14A - график, показывающий количество белка PCSK9 в сыворотке низших приматов, выраженное как процент оставшегося PCSK9 по отношению к уровням PCSK9 в предварительно отобранной крови, после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при qdx5 + qwx3;

фиг. 14B представляет собой график, показывающий абсолютное количество белка PCSK9 в сыворотке низших приматов после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при qdx5 + qwx3;

фиг. 15 - график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент оставшихся LDL по отношению к уровням LDL в предварительно отобранной крови, после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при qdx5 + qwx3;

фиг. 16A - график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент среднего количества уровней LDL в предварительно отобранной крови, после введения AD-57928 в дозе 2 мг/кг при q1w и в дозе 1 мг/кг при 2xw;

фиг. 16B - график, показывающий количество белка PCSK9 в сыворотке по сравнению с количеством в предварительно отобранной крови низших приматов после введения AD-57928 в дозе 2 мг/кг при q1w и в дозе 1 мг/кг при 2xw;

фиг. 17A - график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент среднего количества уровней LDL в предварительно отобранной крови, после введения AD-57928 в дозе 2 мг/кг при 2xw и разовой дозы 25 мг/кг. Последнюю дозу для группы 2 мг/кг при 2xw вводили на 36 день;

фиг. 17B - график, показывающий количество белка PCSK9 в сыворотке по сравнению с количеством в предварительно отобранной крови низших приматов после введения AD-57928 в дозе 2 мг/кг при 2xw и разовой дозы 25 мг/кг;

фиг. 18 - график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент оставшихся LDL по отношению к уровням LDL в предварительно отобранной крови, после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при qdx5 + qwx3;

фиг. 19 - график, показывающий количество холестерина липопротеинов низкой плотности (LDL или LDLc) в сыворотке низших приматов, выраженное как процент оставшихся LDL по отношению к уровням LDL в предварительно отобранной крови, после введения указанных средств, представляющих собой иРНК, при qdx5 + qwx3.

#### Подробное описание изобретения

Изобретение предусматривает композиции, содержащие средства для RNAi, например средства, представляющие собой двухцепочечную иРНК, нацеленные на PCSK9. Также раскрыты способы применения композиций согласно настоящему изобретению для ингибирования экспрессии PCSK9 и для лечения патологий, связанных с экспрессией PCSK9, например, гиперхолестеринемии.

##### I. Определения.

Для того чтобы настоящее изобретение можно было более легко понять, вначале даны определения соответствующим терминам. Кроме того, следует отметить, что в случаях, когда в данном документе перечисляются значение или диапазон значений переменной, подразумевают, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Форму единственного числа используют в данном документе для обозначения одного или нескольких (т.е. по меньшей мере одного) грамматических объектов статьи. В качестве примера, "элемент" озна-

чает один элемент или несколько элементов, например множество элементов.

Выражение "включающий" используют в данном документе для обозначения фразы "включающий без ограничения" и используют взаимозаменяемо с ней.

Выражение "или" используют в данном документе для обозначения выражения "и/или" и используют взаимозаменяемо с ним, если контекст явно не указывает иное.

Используемый в данном документе "PCSK9" относится к гену пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 или белку пропротеин конвертазе субтилизин/кексин 9. PCSK9 также известен как FH3, HCHOLA3, NARC-1 или NARC1. Выражение PCSK9 включает PCSK9 человека, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GI: 299523249; PCSK9 мыши, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GI: 163644257; PCSK9 крысы, аминокислотная или нуклеотидная последовательность которого может быть найдена, например, в GenBank под номером доступа GI: 77020249. Дополнительные примеры последовательностей мРНК PCSK9 легко доступны с помощью, например, GenBank.

Используемая в данном документе "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции гена PCSK9, в том числе к мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции.

Используемое в данном документе выражение "нить, содержащая последовательность" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая характеризуется последовательностью, обозначаемой с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов.

Каждое из "G", "C", "A" и "U", как правило, означает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин и урацил в качестве основания соответственно. "T" и "dT" используют в данном документе взаимозаменяемо, и они относятся к дезоксирибонуклеотиду, где нуклеиновым основанием является тимин, например дезоксириботимину, 2'-дезокситимидину или тимидину. Однако будет понятно, что выражение "рибонуклеотид", или "нуклеотид", или "дезоксирибонуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, который подробнее описан ниже, или имитирующий нуклеотид заменяющий фрагмент. Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими фрагментами без изменения в значительной степени свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть замещены в нуклеотидных последовательностях согласно настоящему изобретению нуклеотидами, содержащими, например, инозин. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, являются вариантами осуществления согласно настоящему изобретению.

Выражения "иРНК", "средство для RNAi", "средство, представляющее собой иРНК", "средство для РНК-интерференции", используемые в данном документе взаимозаменяемо, означают средство, которое содержит РНК в том значении, в котором это выражение описано в данном документе, и которое опосредует нацеленное расщепление РНК-транскрипта через путь РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). иРНК направляет специфичное в отношении последовательности разрушение мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (RNAi). иРНК модулирует, например, ингибирует, экспрессию PCSK9 в клетке, например клетке субъекта, как, например, субъекта-млекопитающего.

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК PCSK9, с направлением расщепления целевой РНК. Не желая привязываться к теории, считают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Дайсер, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, участвует в процессинге dsRNA на короткие интерферирующие РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными выступами на 3'-конце в два основания (Bernstein et al. (2001) Nature 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, позволяя комплементарной антисмысловой нити направлять распознавание мишени (Nykanen et al. (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одноцепочечной РНК (siRNA), образованной внутри клетки, и которая способствует образованию RISC-комплекса с осуществлением сайленсинга целевого гена, т.е. гена PCSK9. Соответственно, выражение "siRNA" также используют в данном документе для объяснения RNAi, которая описана выше.

В другом варианте осуществления средство для RNAi может быть одноцепочечной siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одноцепочечные средства для RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью, из RISC, который затем расщепляет целевую мРНК. Одноцепочечные siRNA, как правило, составляют 15-30 нуклеотидов и химически

модифицированы. Строение и испытание одноцепочечных siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima et al. (2012) Cell 150: 883-894, полное содержание каждого из которых, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки. Любые антисмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно использовать в качестве одноцепочечной siRNA, которая описана в данном документе или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima et al. (2012) Cell 150: 883-894.

В другом варианте осуществления "иРНК" для применения в композициях, применениях и способах согласно настоящему изобретению является двухцепочечной РНК, и в данном документе ее называют "двухцепочечным средством для RNAi", "молекулой двухцепочечной РНК (dsRNA)", "средством, представляющим собой dsRNA" или "dsRNA". Выражение "dsRNA" означает комплекс молекул рибонуклеиновых кислот с дуплексной структурой, содержащий две встречно-параллельные и, по сути, комплементарные нити нуклеиновых кислот, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентацию по отношению к целевой РНК, т.е. гену PCSK9. В некоторых вариантах осуществления согласно настоящему изобретению двухцепочечная РНК (dsRNA) запускает расщепление целевой РНК, например мРНК, через пост-транскрипционный механизм сайленсинга генов, называемый в данном документе РНК-интерференцией или RNAi.

В общем, большинство нуклеотидов каждой нити молекулы dsRNA являются рибонуклеотидами, но, как описано подробно в данном документе, каждая или обе нити могут также включать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, как используется в данном описании, "средство для RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство для RNAi может включать значительные модификации множества нуклеотидов. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в области техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле типа siRNA, охвачены выражением "средство для RNAi" в контексте данного описания и формулы изобретения.

Две нити, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной большей молекулы РНК или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, когда две нити являются частью одной большей молекулы и, следовательно, соединены непрерываемой цепью нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, соединяющую цепь РНК называют петлей "шпилькой". В тех случаях, когда две нити соединены ковалентно способом, отличным от непрерываемой цепи нуклеотидов от 3'-конца одной нити до 5'-конца соответствующей другой нити, образующих дуплексную структуру, то соединяющую структуру называют "линкером". Нити РНК могут иметь одинаковое или различное число нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований является количеством нуклеотидов в самой короткой нити dsRNA минус любые выступы, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры средство для RNAi может содержать один или несколько нуклеотидных выступов.

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК PCSK9, направляя расщепление целевой РНК. Не желая привязываться к теории, длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) Genes Dev. 15:485). Дайсер, фермент, подобный рибонуклеазе III типа, участвует в процессинге dsRNA на короткие интерферирующие РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными выступами на 3'-конце в два основания (Bernstein et al. (2001) Nature 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, позволяя комплементарной антисмысловой нити направлять распознавание мишени (Nykanen et al. (2001) Cell 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir et al. (2001) Genes Dev. 15:188). Используемый в данном документе "нуклеотидный выступ" означает неспаренный нуклеотид или нуклеотиды, которые выпячиваются из дуплексной структуры средства для RNAi, когда 3'-конец одной нити средства для RNAi выходит за пределы 5'-конца другой нити или наоборот. "Затупленный конец" или "тупой конец" означают, что на конце двухцепочечного средства для RNAi нет неспаренных нуклеотидов, т.е. нет нуклеотидного выступа. Средство для RNAi "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухцепочечной по всей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступа на любом конце молекулы. Средства для RNAi согласно настоящему изобретению включают средства для RNAi с нуклеотидными выступами на одном конце (т.е. средства с одним выступом и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступами на обоих концах.

Выражение "антисмысловая нить" означает нить двухцепочечного средства для RNAi, которая включает участок, который, по сути, комплементарен целевой последовательности (например, мРНК PCSK9 человека). Используемое в данном документе выражение "участок, комплементарный части мРНК, кодирующей транстиретин" означает участок антисмысловой нити, который, по сути, комплементарен части последовательности мРНК PCSK9. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, тогда несовпадения наиболее допустимы в конце-

вых участках и, если присутствуют, как правило, встречаются в концевом участке или участках, например, в пределах 6, 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'-конца и/или 3'-конца.

Выражение "смысловая нить", используемое в данном документе, означает нить dsRNA, которая включает участок, который, по сути, комплементарен участку антисмысловой нити.

Используемое в данном документе выражение "участок расщепления" относится к участку, который расположен вплотную к сайту расщепления. Сайт расщепления является сайтом мишени, по которому происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит три основания на любом конце сайта расщепления и расположенных вплотную к нему. В некоторых вариантах осуществления участок расщепления содержит два основания на любом конце сайта расщепления и расположенных вплотную к нему. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления главным образом находится в сайте, граничащем с нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой нити, и участок расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

Как используется в данном документе, и если не указано иное, выражение "комплементарный" при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут быть жесткими условиями, где жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50 или 70°C в течение 12-16 ч с последующим отмыванием. Можно применять другие условия, такие как физиологически соответствующие условия, которые могут встречаться в организме. Например, комплементарная последовательность является удовлетворительной для обеспечения выполнения соответствующей функции нуклеиновой кислоты, например, RNAi. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для анализа комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Последовательности могут быть "полностью комплементарными" по отношению к любой, когда присутствует спаривание оснований нуклеотидов первой нуклеотидной последовательности с нуклеотидами второй нуклеотидной последовательности по всей длине первой и второй нуклеотидных последовательностей. Однако, когда первую последовательность в данном документе характеризуют как "по сути, комплементарную" по отношению ко второй последовательности, тогда две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или несколько, но, как правило, не более 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований при гибридизации, в то же время сохраняя способность гибридизоваться при условиях, наиболее соответствующих их конечному применению. Однако, когда два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько одноцепочечных выступов, то такие выступы не будут считаться несовпадениями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид с длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид с длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в данном документе.

"Комплементарные" последовательности, используемые в данном документе, могут также включать или могут быть образованы полностью из пар оснований, составленных не по модели Уотсона-Крика, и/или пар оснований, образованных из неестественных и модифицированных нуклеотидов, в такой степени, при которой выполняются вышеуказанные требования по отношению к их способности гибридизоваться. Такие пары оснований, составленные не по модели Уотсона-Крика, включают, без ограничения, неоднозначное или Хугстиновское спаривание оснований G:U.

Выражения "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по сути, комплементарный" в данном документе можно использовать по отношению к совпадению оснований между смысловой нитью и антисмысловой нитью dsRNA или между антисмысловой нитью dsRNA и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их использования.

Используемый в данном документе полинуклеотид, который "по сути, комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК), означает полинуклеотид, который, по сути, комплементарен непрерывной части мРНК, представляющей интерес (например, мРНК, кодирующей PCSK9), в том числе 5'-UTR, открытой рамке считывания (ORF) или 3'-UTR. Например, полинуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК PCSK9, если последовательность, по сути, комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей PCSK9.

Выражение "ингибирование", используемое в данном документе, используют взаимозаменяемо с "сокращением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией", "подавлением" и другими подобными выражениями, и оно включает любой уровень ингибирования.

Фраза "ингибирование экспрессии PCSK9", используемая в данном документе, включает ингибирование экспрессии любого гена PCSK9 (такого как, например, ген PCSK9 мыши, ген PCSK9 крысы, ген PCSK9 обезьяны или ген PCSK9 человека), а также вариантов (например, встречающихся в природе вариантов) или мутантов гена PCSK9. Таким образом, ген PCSK9 может быть геном PCSK9 дикого типа,

мутантным геном PCSK9 или трансгенным геном PCSK9 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена PCSK9" включает любой уровень ингибирования гена PCSK9, например, по меньшей мере, частичное подавление экспрессии гена PCSK9, как, например, ингибирование по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 35%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 45%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 55%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 65%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 75%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99%.

Экспрессию гена PCSK9 можно оценивать, исходя из уровня любой переменной, ассоциированной с экспрессией гена PCSK9, например уровня мРНК PCSK9, уровня белка PCSK9 или уровней липидов сыворотки крови. Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

Фраза "приведение клетки в контакт с двухпочечным средством для RNAi", используемая в данном документе, включает приведение клетки в контакт любым возможным способом. Приведение клетки в контакт с двухпочечным средством для RNAi включает приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vitro* или приведение клетки в контакт со средством для RNAi *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, средство для RNAi можно приводить в физический контакт с клеткой путем отдельного осуществления способа или, в качестве альтернативы, средство для RNAi можно поместить в обстановку, которая позволит средству прийти в контакт с клеткой или послужит причиной этому.

Приведение клетки в контакт *in vitro* можно выполнять, например, путем инкубирования клетки со средством для RNAi. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно выполнять, например, путем введения инъекцией средства для RNAi в ткань, в которой находится клетка, или рядом с ней или путем введения инъекцией средства для RNAi в другую область, кровоток или подкожное пространство так, что средство будет впоследствии достигать ткани, в которой находится клетка, которую необходимо привести в контакт со средством. Например, средство для RNAi может содержать лиганд и/или может быть связано с ним, например, лигандом, представляющим собой GalNAc3, который направляет средство для RNAi к месту, представляющему интерес, например, к печени. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. По отношению к способам согласно изобретению клетку также можно приводить в контакт со средством для RNAi *in vitro* и в дальнейшем пересаживать субъекту.

Выражения "пациент" или "субъект", используемые в данном документе, подразумевают как включающие либо человека, либо животного, отличного от человека, предпочтительно млекопитающего, например обезьяну. Наиболее предпочтительно, субъектом или пациентом является человек.

"Ассоциированное с PCSK9 заболевание", используемое в данном документе, подразумевают как включающее любое заболевание, ассоциированное с геном или белком PCSK9. Такие заболевания могут быть вызваны, например, избыточным продуцированием белка PCSK9, мутациями гена PCSK9, аномальным расщеплением белка PCSK9, аномальными взаимодействиями между PCSK9 и другими белками или другими эндогенными или экзогенными веществами. Типичные ассоциированные с PCSK9 заболевания включают типы липидемии, например типы гиперлипидемии и другие формы нарушения баланса липидов, такие как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, и патологические состояния, ассоциированные с этими нарушениями, такие как болезни сердца и болезни, протекающие с расстройством кровообращения.

"Терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают как включающее количество средства для RNAi, которого при введении пациенту для лечения ассоциированного с PCSK9 заболевания достаточно для эффективного лечения заболевания (например, путем уменьшения, ослабления или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, заболевания и его тяжести и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, стадии патологических процессов, опосредованных экспрессией PCSK9, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество", используемое в данном документе, подразумевают

как включающее количество средства для RNAi, которого при введении субъекту, который еще не испытал симптомов ассоциированного с PCSK9 заболевания, или они еще у него не проявились, но у которого может иметься предрасположенность к заболеванию, достаточно для предупреждения или ослабления заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Ослабление заболевания включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позже. "Профилактически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства для RNAi, пути введения средства, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения при наличии такового и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включают количество средства для RNAi, которое вызывает некоторый желательный локальный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства для RNAi, применяемые в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для получения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

Выражение "образец", используемое в данном документе, включает отбор похожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекте. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, внутриглазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т.п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы могут быть получены из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток печени, таких как, например, гепатоциты). В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму, полученные от субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает ткань печени (или ее составляющих), полученную от субъекта.

II. иРНК согласно настоящему изобретению.

В данном документе описаны улучшенные двухцепочечные средства для RNAi, которые ингибируют экспрессию гена PCSK9 в клетке, такой как клетка субъекта, например млекопитающего, как, например, человек с нарушением липидного обмена, например гиперхолестеринемией, и применения таких двухцепочечных средств для RNAi.

Двухцепочечные средства для RNAi согласно настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, которые раскрыты, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 г., полное содержание которой включено в данный документ при помощи ссылки.

Как показано в данном документе и в предварительной заявке № 61/561710, превосходные результаты могут быть получены путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить средства для RNAi, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства для RNAi могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство для RNAi, к примеру смысловая нить, может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNAc. Полученные в результате средства для RNAi характеризуются превосходной активностью в отношении сайленсинга генов.

Более конкретно, неожиданно было обнаружено, что в тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить двухцепочечного средства для RNAi полностью модифицированы так, что имеют один или несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления по меньшей мере одной нити средства для RNAi или рядом с ним, тогда активность средства для RNAi в отношении сайленсинга генов была наилучшим образом повышена.

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает двухцепочечные средства для RNAi, способные ингибировать экспрессию целевого гена (т.е. гена пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9)) *in vivo*. Средство для RNAi содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Каждая нить средства для RNAi в длину может варьироваться от 12 до 30 нуклеотидов. Например, каждая нить может составлять от 14 до 30 нуклеотидов в длину, от 17 до 30 нуклеотидов в длину, от 25 до 30 нуклеотидов в длину, от 27 до 30 нуклеотидов в длину, от 17 до 23 нуклеотидов в длину, от 17 до 21 нуклеотида в длину, от 17 до 19 нуклеотидов в длину, от 19 до 25 нуклеотидов в длину, от 19 до 23 нуклеотидов в длину, от 19 до 21 нуклеотида в длину, от 21 до 25 нуклеотидов в длину или от 21 до 23 нуклеотидов в длину.

Смысловая нить и антисмысловая нить, как правило, образуют двухцепочечный РНК-дуплекс ("dsRNA"), также называемый в данном документе как "средство для RNAi." Дуплексный участок средства для RNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов в длину. Например, дуплексный участок может составлять 14-30 пар нуклеотидов в длину, 17-30 пар нуклеотидов в длину, 27-30 пар нуклеотидов в длину, 17-23 пары нуклеотидов в длину, 17-21 пара нуклеотидов в длину, 17-19 пар нуклеотидов в длину, 19-

25 пар нуклеотидов в длину, 19-23 пары нуклеотидов в длину, 19-21 пара нуклеотидов в длину, 21-25 пар нуклеотидов в длину или 21-23 пары нуклеотидов в длину. В другом примере дуплексный участок выбран из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления средство для RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или блокирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Выступ может составлять 1-6 нуклеотидов в длину, например 2-6 нуклеотидов в длину, 1-5 нуклеотидов в длину, 2-5 нуклеотидов в длину, 1-4 нуклеотида в длину, 2-4 нуклеотида в длину, 1-3 нуклеотида в длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. Выступы могут быть результатом того, что одна нить длиннее другой, или того, что две нити одинаковой длины расположены в шахматном порядке. Выступ может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным геномным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность. Первая и вторая нити также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других линкеров, не являющихся основаниями.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающем участке средства для RNAi независимо может быть модифицированным или немодифицированным нуклеотидом, в том числе, без ограничения, с сахаром с 2'-модификацией, такой как 2-F, 2'-O-метил, тимидин (Т), 2'-O-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2-O-метоксиэтиладенозин (Аео), 2-O-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации. Например, ТТ может быть выступающей последовательностью для любого конца на любой нити. Выступ может образовывать несовпадение с целевой мРНК, или он может быть комплементарным геномным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность.

5'- или 3'-выступы смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей средства для RNAi могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающий(ие) участок(и) содержит(содержат) два нуклеотида с фосфотиоатом между двумя нуклеотидами, при этом два нуклеотида могут быть одинаковыми или различными. В одном варианте осуществления выступ присутствует на 3'-конце смысловой нити, антисмысловой нити или обеих нитей. В одном варианте осуществления этот 3'-выступ присутствует у антисмысловой нити. В одном варианте осуществления этот 3'-выступ присутствует у смысловой нити.

Средство для RNAi может содержать только один выступ, который может усиливать интерферирующую активность RNAi без воздействия на его общую стабильность. Например, одноцепочечный выступ может быть расположен на 3'-конце смысловой нити или, в качестве альтернативы, на 3'-конце антисмысловой нити. RNAi также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой нити (или 3'-конце смысловой нити) или *vice versa*. Как правило, антисмысловая нить RNAi имеет нуклеотидный выступ на 3'-конце, а 5'-конец является тупым. Не желая быть связанными теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой нити и выступ с 3'-конца антисмысловой нити способствуют включению направляющей нити в RISC-процесс.

В одном варианте осуществления средство для RNAi представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, составляющий 19 нуклеотидов в длину, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 7, 8, 9 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В другом варианте осуществления средство для RNAi представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, составляющий 20 нуклеотидов в длину, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 8, 9, 10 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В еще одном варианте осуществления средство для RNAi представляет собой олигомер с обоими тупыми концами, составляющий 21 нуклеотид в длину, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца. Антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую нить из 21 нуклеотида и антисмысловую нить из 23 нуклеотидов, где смысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая нить содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства для RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити. В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, между концевыми тремя нуклеотидами могут быть две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. В одном вари-

анте осуществления средство для RNAi дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 3'-фтором, например при чередующемся мотиве. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAcs).

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую и антисмысловую нити, где средство для RNAi содержит первую нить с длиной, которая составляет по меньшей мере 25 и самое большее 29 нуклеотидов, и вторую нить с длиной, которая составляет самое большее 30 нуклеотидов, по меньшей мере с одним мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положении 11, 12, 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой нити и 5'-конец второй нити образуют тупой конец, а вторая нить на 1-4 нуклеотида длиннее на 3'-конце, чем первая нить, где дуплексный участок составляет по меньшей мере 25 нуклеотидов в длину, а вторая нить в достаточной степени комплементарна целевой мРНК на протяжении по меньшей мере 19 нуклеотидов длины второй нити, для снижения экспрессии целевого гена, где средство для RNAi вводят в клетки млекопитающего, и где расщепление средства для RNAi при помощи дайсера предпочтительно дает в результате siRNA, содержащую 3'-конец второй нити, снижая, таким образом, экспрессию целевого гена у млекопитающего. Необязательно, средство для RNAi дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi содержит по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить средства для RNAi может также содержать по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой нити или рядом с ним.

Для средства для RNAi с дуплексным участком, составляющим 17-23 нуклеотида в длину, сайт расщепления антисмысловой нити находится обычно около 10, 11 и 12 положений от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех одинаковых модификаций могут находиться в 9, 10, 11 положениях; 10, 11, 12 положениях; 11, 12, 13 положениях; 12, 13, 14 положениях или 13, 14, 15 положениях антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца антисмысловой нити или отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити. Сайт расщепления в антисмысловой нити может также изменяться в соответствии с длиной дуплексного участка RNAi от 5'-конца.

Смысловая нить средства для RNAi может содержать по меньшей мере один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити; а антисмысловая нить может характеризоваться по меньшей мере одним мотивом из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления нити или рядом с ним. В тех случаях, когда смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплекс dsRNA, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выравнены так, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой нити и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой нити имеют перекрытие по меньшей мере в один нуклеотид, т.е. по меньшей мере один из трех нуклеотидов мотива в смысловой нити образует пару оснований по меньшей мере с одним из трех нуклеотидов мотива в антисмысловой нити. В качестве альтернативы, по меньшей мере два нуклеотида могут перекрываться, или все три нуклеотида могут перекрываться.

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления нити или рядом с ним, а другие мотивы могут быть фланкирующей модификацией. Выражение "фланкирующая модификация" в данном документе означает мотив, встречающийся в другой части нити, который отделен от мотива в сайте расщепления той же нити или рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу, тогда химическая структура мотивов отличается друг от друга, а когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, тогда химические структуры могут быть одинаковыми или отличными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, когда присутствует две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может находиться на одном конце по отношению к первому мотиву, который находится в сайте расщепления или рядом с ним или с обеих сторон ведущего мотива.

Подобно смысловой нити, антисмысловая нить средства для RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, при этом по меньшей мере один из мотивов находится в сайте расщепления нити или рядом с ним. Данная антисмысловая нить может также содержать одну или несколько фланкирующих модификаций при выравнивании подобных фланкирующим модификациям, которые могут присутствовать в смысловой нити.

В одном варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысло-

вой нити средства для RNAi обычно не включает первый один или первые два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В другом варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой нити или антисмысловой нити средства для RNAi обычно не включает первый один или первые два спаренных нуклеотида в дуплексном участке на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах нити.

В тех случаях, когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере одну фланкирующую модификацию, фланкирующие модификации могут попадать на один и тот же конец дуплексного участка и иметь перекрытие в один, два или три нуклеотида.

В тех случаях, когда каждая из смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi содержит по меньшей мере две фланкирующие модификации, смысловая нить и антисмысловая нить могут быть выравнены так, что две модификации, каждая от одной нити, попадает на один конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации, каждая от одной нити, попадает на другой конец дуплексного участка с перекрытием в один, два или три нуклеотида; две модификации одной нити попадают по обе стороны от ведущего мотива с перекрытием в один, два или три нуклеотида в дуплексном участке.

В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой нити и антисмысловой нити средства для RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, могут быть модифицированы. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одинаковой или различной модификацией, которая может включать одно или несколько изменений одного или обоих несвязанных атомов кислорода фосфата и/или одного или нескольких связанных атомов кислорода фосфата; изменение компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила в рибозном сахаре; полное замещение фосфатного фрагмента на "дефосфоризованные" линкеры; модификацию или замещение встречающегося в природе основания и замещение или модификацию рибознофосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты являются полимерами из субъединиц, то многие из модификаций встречаются в положении, которое повторяется в нуклеиновой кислоте, например, модификация основания, или фосфатного фрагмента, или несвязанного O фосфатного фрагмента. В некоторых случаях модификация будет встречаться во всех рассматриваемых положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях не будет. В качестве примера, модификация может встречаться только в 3'- или 5'-концевом положении, может встречаться только в концевом участке, например, в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити. Модификация может встречаться в двухцепочечном участке, в одноцепочечном участке или в обоих. Модификация может встречаться только в двухцепочечном участке РНК или может встречаться только в одноцепочечном участке РНК. Например, модификация фосфотиоата в несвязанном положении O может встречаться только на одном или обоих концах, может встречаться только в концевом участке, например в положении концевого нуклеотида или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидах нити, или может встречаться в двухцепочечном и одноцепочечном участках, в частности на конце. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Это может быть возможно, например, для повышения стабильности, для включения конкретных оснований в выступы или для включения модифицированных нуклеотидов или нуклеотидных заместителей в одноцепочечные выступы, например в 5'- или 3'-выступ или в оба. Например, может быть желательно включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые из оснований в 3'- или 5'-выступе могут быть модифицированы, например, при помощи модификаций, описанных в данном документе. Модификации могут включать, например, применение модификаций в 2'-положении рибозного сахара при помощи модификаций, которые известны в данной области, например, применение дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксидефтор-(2'-F) или 2'-O-метилмодифицированных вместо рибозного сахара нуклеинового основания, и модификации фосфатной группы, например модификации фосфотиоата. Выступы могут не быть гомологичными с целевой последовательностью.

В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-O-метилом, 2'-O-аллилом, 2'-C-аллилом, 2'-дезоксидефтором, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Нити могут содержать несколько модификаций. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-O-метилом или 2'-фтором.

По меньшей мере две различные модификации, как правило, присутствуют в смысловой нити и антисмысловой нити. Эти две модификации могут быть 2'-O-метил-или 2'-фтор-модификациями или другими.

В одном варианте осуществления N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> имеет модификации чередующегося паттерна. Выражение "чередующийся мотив", используемое в данном документе, означает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной нити. Выражение "чередующийся нуклеотид" может означать один на каждые два нуклеотида, или один на каждые три нуклеотида, или сходный паттерн. Например, если каждая из A, B и C представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой

“АВАВАВАВАВАВ...”, “ААВВААВВААВВ...”,  
 “ААВААВААВААВ...”, “АААВАААВАААВ...”, “АААВВВАААВВВ...” или  
 “АВСАВСАВСАВС...” и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждая из А, В, С, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловых нити или антисмысловых нити может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как, например, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т.д.

В одном варианте осуществления средство для RNAi согласно настоящему изобретению содержит паттерн модификаций для чередующегося мотива смысловых нитей, сдвинутый относительно паттерна модификаций для чередующегося мотива антисмысловых нитей. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловых нитей соответствует модифицированной другой группой нуклеотидов антисмысловых нитей и vice versa. Например, при спаривании смысловых нитей с антисмысловыми нитями в дуплексе dsRNA чередующийся мотив в смысловых нитях может начинаться с "АВАВАВ" от 5' - к 3'-концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловых нитях может начинаться с "ВАВАВА" от 5' - к 3'-концу нити в дуплексном участке. В качестве другого примера чередующийся мотив в смысловых нитях может начинаться с "ААВВААВВ" от 5' - к 3' -концу нити, а чередующийся мотив в антисмысловых нитях может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'-к 3' -концу нити в дуплексном участке, так что между смысловыми нитями и антисмысловыми нитями присутствует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

В одном варианте осуществления средство для RNAi первоначально содержит паттерн чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловых нитях и первоначально имеет сдвиг в отношении паттерна чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловых нитях, т.е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в парах оснований смысловых нитей с 2'-F-модифицированным нуклеотидом в антисмысловых нитях и vice versa. 1 положение в смысловых нитях может начинаться с 2'-F-модификации, а 1 положение в антисмысловых нитях может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую нить и/или антисмысловую нить нарушает первоначальный паттерн модификаций, присутствующий в смысловых нитях и/или антисмысловых нитях. Такое нарушение паттерна модификаций смысловых и/или антисмысловых нитей путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую и/или антисмысловую нить неожиданно повышает активность относительно сайленсинга генов в отношении целевого гена.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов вводят в любую из нитей, модификация нуклеотида, следующего за мотивом, является модификацией, отличной от модификации мотива. Например, часть последовательности, содержащей мотив, представляет собой "...N<sub>a</sub>YYYN<sub>b</sub>...", где "Y" представляет собой модификацию мотива из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, а "N<sub>a</sub>" и "N<sub>b</sub>" представляют собой модификацию нуклеотида, следующего за мотивом "YYY", который отличается от модификации Y, и где N<sub>a</sub> и N<sub>b</sub> могут быть одинаковыми или различными модификациями. В качестве альтернативы, N<sub>a</sub> и/или N<sub>b</sub> могут присутствовать или отсутствовать, когда присутствует фланкирующая модификация.

Средство для RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловых нитей, или антисмысловых нитей, или обеих нитей в любом положении в нити. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида смысловых нитей и/или антисмысловых нитей; каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в чередующемся паттерне в смысловых нитях и/или антисмысловых нитях, или смысловая нить или антисмысловая нить могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловых нитей может быть одинаковым или отличным от антисмысловых нитей, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловых нитей может характеризоваться сдвигом относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи антисмысловых нитей.

В одном варианте осуществления RNAi имеет модификацию фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами.

Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексном участке. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфо-

тиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за выступающим нуклеотидом. Например, может быть по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Эти концевые три нуклеотида могут быть на 3'-конце антисмысловой нити, 3'-конце смысловой нити, 5'-конце антисмысловой нити и/или 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой нити, и между концевыми тремя нуклеотидами присутствуют две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Необязательно, средство для RNAi может дополнительно иметь две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой нити, так и на 5'-конце антисмысловой нити.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит несовпадение(несовпадения) с мишенью в дуплексе или их комбинации. Несовпадение может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать исходя из их склонности содействовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации определенного спаривания, наиболее простым подходом является изучение пар по отдельным парам оснований, хотя можно также выполнить анализ следующей соседней пары или подобный). В плане содействия диссоциации: A:U более предпочтительна, чем G:C; G:U более предпочтительна, чем G:C; а I:C более предпочтительна, чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например неканонические или отличные от канонических типы спаривания (которые описаны в других частях данного документа), более предпочтительны, чем канонические типы спаривания (A:T, A:U, G:C); и типы спаривания, которые включают универсальные основания, более предпочтительны, чем канонические типы спаривания.

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит по меньшей мере одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных участках от 5'-конца антисмысловой нити, независимо выбранную из группы, состоящей из A:U, G:U, I:C и несовпадающих пар, например неканонических или отличных от канонических типов спаривания или типов спаривания, которые включает универсальные основания, для содействия диссоциации антисмысловой нити на 5'-конце дуплекса.

В одном варианте осуществления нуклеотид в 1 положении в дуплексном участке от 5'-конца в антисмысловой нити выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. В качестве альтернативы, по меньшей мере одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити является парой оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексном участке от 5'-конца антисмысловой нити является парой оснований AU.

В одном варианте осуществления последовательность смысловой нити может быть представлена формулой (I)



где каждая из  $i$  и  $j$  независимо равняется 0 или 1;

каждая из  $p$  и  $q$  независимо равняется 0-6;

каждая  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

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

каждая  $n_p$  и  $n_q$  независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

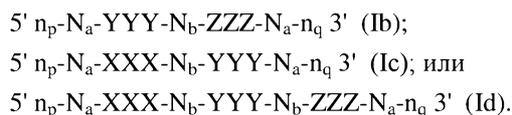
где  $N_b$  и  $Y$  имеют неодинаковую модификацию; и

каждая из XXX, YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Предпочтительно, в YYY все нуклеотиды 2'-F-модифицированы.

В одном варианте осуществления  $N_a$  и/или  $N_b$  имеет модификации чередующегося паттерна.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, составляющий 17-23 нуклеотида в длину, то мотив YYY может находиться в сайте расщепления или вблизи него (например, может находиться в положениях 6, 7, 8, 7, 8, 9, 8, 9, 10, 9, 10, 11, 10, 11, 12 или 11, 12, 13) в смысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1<sup>го</sup> спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца.

В одном варианте осуществления  $i$  равняется 1, а  $j$  равняется 0, или  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 1, или как  $i$ , так и  $j$  равняются 1. Смысловая нить, таким образом, может быть представлена следующими формулами:



В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ib),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ic),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Id), каждая  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно,  $N_b$  равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждая  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждая из X, Y и Z может быть одинаковой или отличной от остальных.

В других вариантах осуществления  $i$  равняется 0, а  $j$  равняется 0, и смысловая нить может быть представлена формулой



В тех случаях, когда смысловая нить представлена формулой (Ia), каждая  $N_a$  независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой нити RNAi может быть представлена формулой (II)



где каждая из  $k$  и  $l$  независимо равняется 0 или 1;

каждая из  $p'$  и  $q'$  независимо равняется 0-6;

каждая  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

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

каждая  $n_p'$  и  $n_q'$  независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где  $N_b'$  и  $Y'$  имеют неодинаковую модификацию; и

каждая из  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$  и  $Z'Z'Z'$  независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

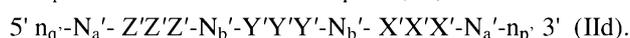
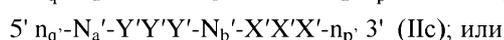
В одном варианте осуществления  $N_a'$  и/или  $N_b'$  имеет модификации чередующегося паттерна.

Мотив  $Y'Y'Y'$  находится в сайте расщепления антисмысловой нити или рядом с ним. Например, если средство для RNAi содержит дуплексный участок, составляющий 17-23 нуклеотида в длину, то мотив  $Y'Y'Y'$  может находиться в положениях 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 или 13, 14, 15 антисмысловой нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца. Предпочтительно, мотив  $Y'Y'Y'$  находится в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления в мотиве  $Y'Y'Y'$  все нуклеотиды 2'-ОМе-модифицированы.

В одном варианте осуществления  $k$  равняется 1, а  $l$  равняется 0, или  $k$  равняется 0, а  $l$  равняется 1, или как  $k$ , так и  $l$  равняется 1.

Антисмысловая нить, таким образом, может быть представлена следующими формулами:



В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена формулой (IIb),  $N_b$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена как формула (IIc),  $N_b'$  представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена как формула (II<sub>d</sub>), каждая N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая N<sub>a</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно, N<sub>b</sub> равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В других вариантах осуществления k равняется 0, а l равняется 0, и антисмысловая нить может быть представлена формулой



В тех случаях, когда антисмысловая нить представлена как формула (II<sub>a</sub>), каждая N<sub>a</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждая из X', Y' и Z' может быть одинаковой или отличной от остальных.

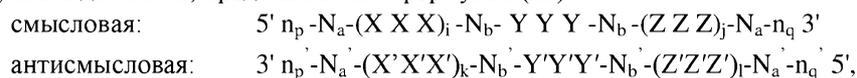
Каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо может быть модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой нити и антисмысловой нити независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.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

В одном варианте осуществления смысловая нить средства для RNAi может содержать мотив YYY, находящийся в 9, 10 и 11 положениях нити, в тех случаях, когда дуплексный участок составляет 21 нуклеотид, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая нить может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из XXX и ZZZ независимо представляет собой 2'-Оме-модификацию или 2'-F-модификацию.

В одном варианте осуществления антисмысловая нить может содержать мотив Y'Y'Y', находящийся в положениях 11, 12, 13 нити, при этом отсчет начинается с 1-го нуклеотида от 5'-конца или, необязательно, отсчет начинается с 1-го спаренного нуклеотида в дуплексном участке от 5'-конца; и Y' представляет собой 2'-О-метил-модификацию. Антисмысловая нить может дополнительно содержать мотив X'X'X' или мотивы Z'Z'Z' в качестве фланкирующих модификаций на противоположном конце дуплексного участка; и каждый из X'X'X' и Z'Z'Z' независимо представляет собой 2'-Оме-модификацию или 2'-F-модификацию.

Смысловая нить, представленная любой из вышеприведенных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой нитью, представленной любой из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (II<sub>d</sub>) соответственно.

Соответственно, средства для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению могут содержать смысловую нить и антисмысловую нить, при этом каждая нить содержит от 14 до 30 нуклеотидов, дуплекс для RNAi, представленный формулой (III)



(III),

где каждая из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1;

каждая из p, p', q и q' независимо равняется 0-6;

каждая N<sub>a</sub> и N<sub>a</sub>' независимо представляют собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

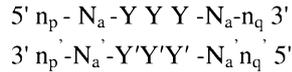
каждая N<sub>b</sub> и N<sub>b</sub>' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

где каждая n<sub>p</sub>', n<sub>p</sub>, n<sub>q</sub>' и n<sub>q</sub>, каждая из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; и

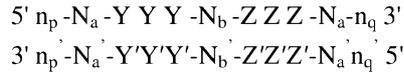
каждая из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления i равняется 0, а j равняется 0; или i равняется 1, а j равняется 0; или i равняется 0, а j равняется 1; или как i, так и j равняются 0; или как i, так и j равняются 1. В другом варианте осуществления k равняется 0, а l равняется 0; или k равняется 1, а l равняется 0; k равняется 0, а l равняется 1; или как k, так и l равняется 0; или как k, так и l равняется 1.

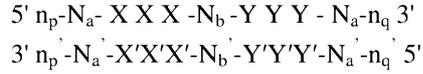
Иллюстративные комбинации смысловой нити и антисмысловой нити, образующих дуплекс для RNAi, включают формулы, приведенные ниже



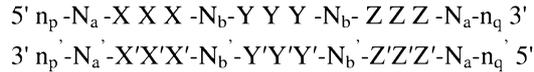
(IIIa),



(IIIb),



(IIIc),



(III d).

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), каждая  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb), каждая  $N_b$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждая  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено как формула (IIIc), каждая  $N_b$ ,  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено в качестве формулы (III d), каждая  $N_b$ ,  $N_b'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая  $N_a$ ,  $N_a'$  независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждая из  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  и  $N_b'$  независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

Каждая из X, Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (III d) может быть одинаковой или отличной от остальных.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (III d), по меньшей мере один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. В качестве альтернативы, по меньшей мере два из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три из нуклеотидов Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIb) или (III d), по меньшей мере один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. В качестве альтернативы, по меньшей мере два из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три из нуклеотидов Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

В тех случаях, когда средство для RNAi представлено в качестве формулы (IIIc) или (III d), по меньшей мере один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. В качестве альтернативы, по меньшей мере два из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три из нуклеотидов X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

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

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III d), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III d), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации, и  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. В еще другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III d), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, а смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера. В другом варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (III d), модифика-

циями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления в тех случаях, когда средство для RNAi представлено формулой (IIIa), модификациями  $N_a$  являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификации,  $n_p' > 0$ , и по меньшей мере один  $n_p'$  соединен с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи, смысловая нить содержит по меньшей мере одну фосфотиоатную связь, и смысловая нить конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим по меньшей мере два дуплекса, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления средство для RNAi является мультимером, содержащим три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), где дуплексы соединены линкером. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Необязательно, мультимер дополнительно содержит лиганд. Каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген или на два различных гена или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В одном варианте осуществления два средства для RNAi, представленные формулой (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIIId), соединены друг с другом на 5'-конце, и один или оба 3'-конца необязательно конъюгированы с лигандом. Каждое из средств может быть нацелено на один и тот же ген или на два различных гена или каждое из средств может быть нацелено на один и тот же ген в двух различных целевых сайтах.

В различных публикациях описаны мультимерные средства для RNAi, которые можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, патент США № 7858769, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, полное содержание которых, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки.

Средство для RNAi, содержащее один или нескольких углеводных фрагментов, конъюгированных со средством для RNAi, может улучшать одно или несколько свойств средства для RNAi. Во многих случаях углеводный фрагмент будет прикреплен к модифицированной субъединице средства для RNAi. Например, рибозный сахар одной или нескольких рибонуклеотидных субъединиц средства, представляющего собой dsRNA, можно замещать другими фрагментами, например, отличным от углевода (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен углеводный лиганд. Рибонуклеотидную субъединицу, в которой рибозный сахар субъединицы был замещен таким образом, называют в данном документе субъединицей с модификацией-замещением рибозы (RRMS). Циклический носитель может быть карбоциклической кольцевой системой, т.е. все атомы в кольце являются атомами углерода, или гетероциклической кольцевой системой, т.е. один или несколько атомов в кольце могут быть гетероатомами, например азотом, кислородом, серой. Циклический носитель может быть моноциклической кольцевой системой или может содержать два или более колец, например конденсированные кольца. Циклический носитель может быть полностью насыщенной кольцевой системой или он может содержать одну или несколько двойных связей.

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду через носитель. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". Выражение "точка присоединения к остову", используемое в данном документе, означает функциональную группу, например гидроксильную группу, или, как правило, связь, доступную для введения носителя в остов и которая подходит для этого, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, серосодержащий остов рибонуклеиновой кислоты. Выражение "связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления означает входящий в кольцо атом циклического носителя, например, атом углерода или гетероатом (отличный от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть, например, углеводом, например моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно, выбранный фрагмент соединен промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель будет часто включать функциональную группу, например аминокгруппу, или, как правило, обеспечивать связь, которая подходит для введения или связывания другого химического структурного элемента, например лиганда, с составным кольцом.

Средства для RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; предпочтительно, циклическая группа выбрана из пир-

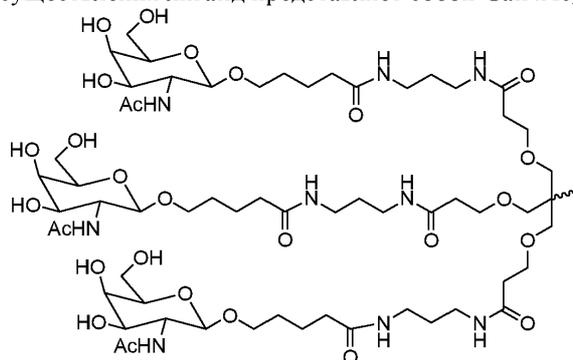
ролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазина, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, триазолидинила, изотриазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно, ациклическая группа выбрана из остова, представляющего собой серинол, или остова, представляющего собой диэтанолламин.

В определенных конкретных вариантах осуществления средством для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению является средство, выбранное из группы, состоящей из средств, перечисленных в табл. 1 и 2.

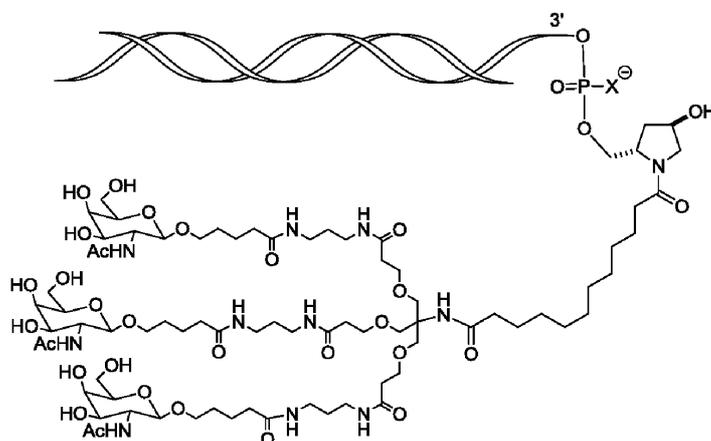
Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

А. Лиганды.

Средства, представляющие собой двухцепочечную РНК (dsRNA), согласно настоящему изобретению необязательно могут быть конъюгированы с одним или несколькими лигандами. Лиганд может быть присоединен к смысловой нити, антисмысловой нити или обеим нитям на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах. К примеру, лиганд может быть конъюгирован со смысловой нитью. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой нити. В одном предпочтительном варианте осуществления лиганд является лигандом, представляющим собой GalNAc. В особенно предпочтительных вариантах осуществления лиганд представляет собой GalNAc<sub>3</sub>



В некоторых вариантах осуществления лиганд, например лиганд, представляющий собой GalNAc, присоединен к 3'-концу средства для RNAi. В одном варианте осуществления средство для RNAi конъюгировано с лигандом, например лигандом, представляющим собой GalNAc, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S. В одном варианте осуществления X представляет собой O.

Широкий спектр структурных элементов может быть соединен со средствами для RNAi согласно настоящему изобретению. Предпочтительными фрагментами являются лиганды, которые соединены, предпочтительно ковалентно, либо непосредственно, либо опосредованно через промежуточный связывающий фрагмент.

В предпочтительных вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования молекулы, в которую он введен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, рецептора, например клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, например, по сравнению с видами, у которых отсутствует такой лиганд. Лиганды, обеспечивающие повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, также называют нацеливающими лигандами.

Некоторые лиганды могут иметь эндосомолитические свойства. Эндосомолитические лиганды способствуют лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно настоящему изобретению или ее

компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Эндосомолитический лиганд может представлять собой полианионный пептид или пептидомиметик, который проявляет рН-зависимую мембранную активность и фузогенность. В одном варианте осуществления эндосомолитический лиганд принимает активную конформацию при эндосомальном рН. "Активная" конформация является такой конформацией, при которой эндосомолитический лиганд способствует лизису эндосомы и/или транспорту композиции согласно настоящему изобретению или ее компонентов из эндосомы в цитоплазму клетки. Иллюстративные эндосомолитические лиганды включают пептид GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), пептид EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586) и их производные (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). В одном варианте осуществления эндосомолитический компонент может содержать химическую группу (например, аминокислоту), которая будет претерпевать изменения в заряде или протонировании в ответ на изменения рН. Эндосомолитический компонент может быть линейным или разветвленным.

Лиганды могут улучшать транспортировку, гибридизацию и свойства специфичности и могут также улучшать устойчивость к нуклеазам полученных естественных или модифицированных олигонуклеотида или полимерной молекулы, содержащих любую комбинацию мономеров, описанных в данном документе, и/или естественных или модифицированных рибонуклеотидов.

Лиганды, как правило, могут включать терапевтические модификаторы, например, для усиления поглощения; диагностические соединения или "репортерные" группы, например для отслеживания распределения; перекрестносшивающие средства и придающие устойчивость к нуклеазам фрагменты. Общие примеры включают липиды, стероиды, витамины, сахара, белки, пептиды, полиамины и миметики пептидов.

Лиганды могут включать вещество, встречающееся в природе, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеин низкой плотности (LDL), липопротеин высокой плотности (HDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота) или липид. Лиганд также может быть рекомбинантной или синтетической молекулой, такой как синтетический полимер, например синтетическая полиаминокислота, олигонуклеотид (например, аптамер). Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту, представляющую собой полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер L-лактида и гликолида, сополимер дивинилового эфира и малеинового ангидрида, N-(2-гидроксипропил)меакриламидный сополимер (НМРА), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), N-изопропилакриламидные полимеры или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленмин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, псевдопептид-полиамин, полиамин-пептидомиметик, полиамин-дендример, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или  $\alpha$ -спиральный пептид.

Лиганды также включают нацеливающие группы, например нацеливающее на клетку или ткань средство, например лектин, гликопротеин, липид или белок, например антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как клетка почки. Нацеливающей группой могут быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный белок А, углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза, поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин B12, биотин, RGD-пептид, миметик RGD-пептида или аптамер.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркалирующие средства (например, акридины), сшивающие средства (например, псорален, митомицин C), порфирины (ТРРС4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы или хелатор (например, EDTA), липофильные молекулы, например холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О-(гексадецил)глицерин, геранилоксигексильную группу, гексадецил-глицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)ли-тохлеву кислоту, О3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин и пептидные конъюгаты (например, пептид antennapedia, Tat-пептид), алкилирующие средства, фосфат, аминок, меркапто, PEG (например, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, полиамино, алкил, замещенный алкил, меченные радиоизотопом маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), помощники транспорта/всасывания (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеотиды (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, имидазольные кластеры, конъюгаты акридин-имидазол, комплекс Eu<sup>3+</sup> тетраазамакроциклы), динитрофенил, HRP или AP.

Лигандами могут быть белки, например гликопротеины, или пептиды, например молекулы со специфической аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды могут также включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать отличные от пептидов виды, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную

глюкозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу, поливалентную фукозу или аптамеры. Лигандом, например, может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

Лигандом может быть вещество, например лекарственное средство, которое может увеличивать поглощение средства, представляющего собой иРНК, клеткой, например путем разрушения цитоскелета клетки, например путем разрушения микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов клетки. Лекарственным средством, например, может быть таксон, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокадазол, яплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинголид А, инданоцин или миосервин.

Лиганд может увеличивать поглощение олигонуклеотида клеткой, например, путем активации воспалительной реакции. Иллюстративные лиганды, которые будут обладать таким действием, включают фактор некроза опухолей α (TNF-α), интерлейкин-1-β или γ-интерферон.

В одном аспекте лиганд является липидом или липидной молекулой. Такие липиды или липидные молекулы предпочтительно связываются с сывороточным белком, например сывороточным альбумином человека (HSA). Связывающийся с HSA лиганд делает возможным распределение конъюгата в целевой ткани, например, отличной от ткани почек целевой ткани организма. Например, целевой тканью может быть печень, в том числе паренхиматозные клетки печени. Также в качестве лигандов можно использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать напроксен или аспирин. Липид или липидный лиганд может (а) увеличивать устойчивость к разрушению конъюгата, (b) увеличивать нацеливание или транспорт в целевую клетку или клеточную мембрану и/или (с) может быть использован для корректировки связывания с сывороточным белком, например HSA.

Липидный лиганд можно применять для модулирования, например регулирования связывания конъюгата с целевой тканью. Например, менее вероятно, что липид или липидный лиганд, который связывается с HSA более сильно, будет нацеливаться на почки и, таким образом, менее вероятно, что он будет выводиться из организма. Липид или липидный лиганд, которые связываются с HSA менее сильно, можно применять для нацеливания конъюгата на почки.

В предпочтительном варианте осуществления липидный лиганд связывается с HSA. Предпочтительно, он связывается с HSA с достаточной аффинностью, так что конъюгат будет предпочтительно распределяться в ткани, отличной от ткани почек.

Однако, предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

В другом предпочтительном варианте осуществления липидный лиганд связывается с HSA слабо или вообще не связывается, так что конъюгат предпочтительно будет распределяться в почке. Другие фрагменты, которые нацелены на клетки почек, также можно использовать вместо или в дополнение к липидным лигандам.

В другом аспекте лигандом является фрагмент, например витамин, который поглощается целевой клеткой, например пролиферирующей клеткой. Таковые являются особенно пригодными для лечения нарушений, характеризующихся нежелательной пролиферацией клеток, например злокачественного или доброкачественного типа, например раковых клеток. Иллюстративные витамины включают витамин А, Е и К. Другие иллюстративные витамины включают витамины группы В, например фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль, или другие витамины или питательные вещества, поглощаемые раковыми клетками. Также включены HАS, липопротеин низкой плотности (LDL) и липопротеин высокой плотности (HDL).

В другом аспекте лигандом является средство, обеспечивающее проникновение в клетку, предпочтительно спиральное средство для проникновения в клетку. Предпочтительно, средство является амфипатическим. Иллюстративным средством является пептид, такой как tat или antennopodia. Если средством является пептид, то он может быть модифицированным, включая пептидилмиметик, инвертомеры, отличные от пептидных или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральным средством предпочтительно является α-спиральное средство, которое предпочтительно характеризуется липофильной и липофобной фазой.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной сворачиваться в определенную трехмерную структуру, подобную естественному пептиду. Фрагмент, представляющий собой пептид или пептидомиметик, может составлять примерно 5-50 аминокислот в длину, например примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину. Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tyr, Trp или Phe). Фрагментом, представляющим собой пептид, может быть пептид-дендример, стерически затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте фрагмент, представляющий собой пептид, может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS).

Иллюстративный содержащий гидрофобную MTS пептид является RFGF с аминокислотной последовательностью

AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 1).

RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 2)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Фрагмент, представляющий собой пептид, может быть "доставляющим" пептидом, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, как было обнаружено, последовательности из Tat-белка HIV

(GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 3))

и белка *Antennapedia Drosophila*

(RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 4))

способны функционировать в качестве доставляющих пептидов. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (ОВОС) (Lam et al., *Nature*, 354:82-84, 1991). Предпочтительно, пептид или пептидомиметик, связанный со средством, представляющим собой иРНК, посредством введенной мономерной единицы, представляет собой нацеливающий на клетку пептид, такой как содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Фрагмент, представляющий собой пептид, может характеризоваться длиной в пределах от примерно 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Фрагменты, представляющие собой пептиды, могут характеризоваться структурной модификацией, такой как для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже. Фрагмент, представляющий собой RGD-пептид, можно использовать для нацеливания на опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или опухолевая клетка рака молочной железы (Zitzmann et al., *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). RGD-пептид может способствовать нацеливанию средства, представляющего собой иРНК, на опухоли ряда других тканей, в том числе легкого, почки, селезенки или печени (Aoki et al., *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Предпочтительно, RGD-пептид будет способствовать нацеливанию средства, представляющего собой иРНК, на почку. RGD-пептид может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например гликозилированным или метилированным, для способствования нацеливанию на специфические ткани. Например, гликозилированный RGD-пептид может доставлять средство, представляющее собой иРНК, к опухолевой клетке, экспрессирующей  $\alpha_v\beta_3$  (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001). Можно использовать пептиды, которые нацелены на маркеры, которыми обогащены пролиферирующие клетки. Например, содержащие RGD пептиды и пептидомиметики могут быть нацелены на раковые клетки, в частности клетки, на поверхности которых присутствует интегрин. Таким образом, можно применять RGD-пептиды, циклические пептиды, содержащие RGD, RGD-пептиды, которые включают D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно использовать другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрин. Как правило, такие лиганды можно использовать для контроля пролиферации клеток и ангиогенеза. Предпочтительные конъюгаты с таким типом лиганда нацелены на PECAM-1, VEGF или другой раковый ген, например, раковый ген, описанный в данном документе.

"Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку" способен проникать в клетку, например микробную клетку, такую как бактериальная или грибная клетка, или клетку млекопитающего, такую как клетка человека. Пептидом, проникающим в микробную клетку, например, может быть  $\alpha$ -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или Ceropin P1), содержащий дисульфидную связь пептид (например,  $\alpha$ -дефенсин,  $\beta$ -дефенсин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, также может включать клеточный сигнал внутриядерной локализации (NLS). Например, пептидом, обеспечивающим проникновение в клетку, может быть двухкомпонентный амфипатический пептид, такой как MPG, который получен из домена слитого пептида gp41 HIV-1 и NLS из большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., *Nucl. Acids Res.* 31:2717-2724, 2003).

В одном варианте осуществления нацеливающим пептидом может быть амфипатический  $\alpha$ -спиральный пептид. Иллюстративные амфипатические  $\alpha$ -спиральные пептиды включают, без ограничений, цекропины, ликотоксины, парадоксины, буфорин, CPF, бомбинин-подобный пептид (BLP), кателицидины, цератотоксины, пептиды *S.clava*, кишечные антимикробные пептиды миксины (HFIAP), магаинины, бревинины-2, дермасептины, меллитины, плеуроцидины, пептиды  $H_2A$ , пептиды *Xenopus*, эскулентины-1 и цаерины. Некоторое количество факторов предпочтительно будет рассматриваться для поддержания целостности стабильности спирали. Например, будут использовать максимальное количество стабилизирующих спираль остатков (например, leu, ala или lys) и будут использовать минимальное количество дестабилизирующих спираль остатков (например, пролин или циклические мономерные единицы). Будет рассматриваться кэспирующий остаток (например, Gly, представляющий собой иллюстративный N-кэспирующий остаток), и/или будет использоваться C-концевое амидирование для обеспечения дополнительной N-связи для стабилизации спирали. Образование солевых мостиков между остатками с противоположными зарядами, разделенными  $i \pm 3$  или  $i \pm 4$  положениями, может обеспечивать стабильность.

Например, катионные остатки, такие как лизин, аргинин, гомоаргинин, орнитин или гистидин, могут образовывать солевые мостики с анионными остатками, глутаматом или аспаратом.

Лиганды, представляющие собой пептиды и пептидомиметики, включают те пептиды, которые имеют природное происхождение или модифицированы, например, D- или L- пептиды;  $\alpha$ -,  $\beta$ - или  $\gamma$ -пептиды; пептиды с N-метилом; азапептиды; пептиды с одним или несколькими амидами, т.е. пептиды со связями, замещенными одним или несколькими из мочевины, тиомочевины, карбамата или связями сульфонилмочевины; или циклические пептиды.

Нацеливающим лигандом может быть любой лиганд, который способен нацеливаться на специфический рецептор. Примерами являются: фолат, GalNAc, галактоза, манноза, манноза-6P, кластеры сахаров, такие как кластер GalNAc, маннозный кластер, галактозный кластер или аптамер. Кластер является комбинацией двух или более единиц сахара. Нацеливающие лиганды также включают лиганды интегрина рецептора, лиганды для хемокинового рецептора, трансферрин, биотин, лиганды серотонинового рецептора, PSMA, эндотелин, GCP II, соматостатин, лиганды LDL и HDL. Лиганды также могут основываться на нуклеиновой кислоте, например аптамер. Аптамер может быть немодифицированным или может иметь любую комбинацию модификаций, раскрытых в данном документе.

Эндосомальные высвобождающие средства включают имидазолы, поли- или олигоимидазолы, PEI, пептиды, фузогенные пептиды, поликарбоксилаты, полиакатионы, скрытые олиго- или поликатионы или анионы, ацетали, полиацетали, кетали/поликетали, ортоэферы, полимеры со скрытыми или не скрытыми катионными или анионными зарядами, дендримеры со скрытыми или не скрытыми катионными или анионными зарядами.

PK-модулятор означает фармакокинетический модулятор. PK-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные PK-модуляторы включают, без ограничения, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкил-глицериды, диацил-глицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин E, биотин и т.д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотиоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотиоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве PK-модулирующих лигандов).

Кроме того, аптамеры, которые связываются с сывороточными компонентами (например, сывороточными белками), также пригодны в настоящем изобретении в качестве PK-модулирующих лигандов.

Другие конъюгаты, представляющие собой лиганды, пригодные в настоящем изобретении, описаны в заявках на патент США: 10/916185, поданной 10 августа 2004 г.; USSN: 10/946873, поданной 21 сентября 2004 г.; USSN: 10/833934, поданной 3 августа 2007 г.; USSN: 11/115989, поданной 27 апреля 2005 г., и USSN: 11/944227, поданной 21 ноября 2007 г., которые включены при помощи ссылки в полном объеме для всех целей.

В тех случаях, когда присутствуют два или более лиганда, все лиганды могут обладать одинаковыми свойствами, могут обладать различными свойствами, или некоторые лиганды обладают одинаковыми свойствами, в то время как другие обладают различными свойствами. Например, лиганд может обладать нацеливающими свойствами, обладать эндосомолитической активностью или обладать PK-модулирующими свойствами. В предпочтительном варианте осуществления все лиганды обладают различными свойствами.

Лиганды могут быть соединены с олигонуклеотидами в разных местах, например на 3'-конце, 5'-конце и/или во внутреннем положении. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд присоединен к олигонуклеотидам посредством промежуточного связывающего фрагмента, например носителя, описанного в данном документе. Лиганд или связанный лиганд могут присутствовать на мономере в тех случаях, когда мономер введен в растущую нить. В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть введен посредством связывания с мономером-"предшественником" после того, как мономер-"предшественник" был введен в растущую нить. К примеру, мономер, например, с аминоконцевым связывающим фрагментом (т.е. без ассоциированного лиганда), например TAP-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> может быть введен в растущую олигонуклеотидную нить. На последующей стадии, т.е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с электрофильной группой, например группой сложного пентафторфенилового эфира или альдегидной группой, впоследствии может быть присоединен к мономеру-предшественнику путем связывания электрофильной группы лиганда с концевой нуклеофильной группой связывающего фрагмента мономера-предшественника.

В другом примере может быть введен мономер с химической группой, пригодной для участия в реакциях клик-химии, например, связывающий фрагмент/линкер с азидом или алкином на конце. На последующей стадии, т.е. после введения мономера-предшественника в нить, лиганд с комплементарной химической группой, например алкин или азид, может быть присоединен к мономеру-предшественнику путем связывания алкина и азидов вместе.

Что касается двухцепочечных олигонуклеотидов, то лиганды могут быть присоединены к одной

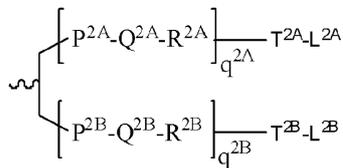
или обеим нитям. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечное средство, представляющее собой иРНК, содержит лиганд, конъюгированный со смысловой нитью. В других вариантах осуществления двухцепочечное средство, представляющее собой иРНК, содержит лиганд, конъюгированный с анти-смысловой нитью.

В некоторых вариантах осуществления лиганд может быть конъюгирован с нуклеосообразованиями, фрагментами, представляющими собой сахара, или межнуклеозидными связями молекул нуклеиновых кислот. Конъюгация с пуриновыми нуклеосообразованиями или их производными может происходить в любом положении, в том числе внутрколецевых и внеколецевых атомов. В некоторых вариантах осуществления 2-, 6-, 7- или 8-положения пуринового нуклеосообразования присоединены к фрагменту конъюгата. Конъюгация с пиримидиновыми нуклеосообразованиями или их производными также может происходить в любом положении. В некоторых вариантах осуществления 2-, 5- и 6-положения пиримидинового основания могут быть замещены фрагментом конъюгата. Конъюгация с фрагментами, представляющими собой сахара, нуклеозидов может происходить при любом атоме углерода. Примеры атомов углерода фрагмента, представляющего собой сахар, который может быть присоединен к фрагменту конъюгата, включают 2', 3' и 5' атомы углерода. 1' положение также может быть присоединено к фрагменту конъюгата, как, например, в абазическом остатке. Межнуклеозидные связи также могут нести фрагменты конъюгата. Что касается фосфоросодержащих связей (например, фосфодиэфирной, фосфотиоатной, фосфодитиоатной, фосфорамидатной и т.п.), то фрагмент конъюгата может быть присоединен непосредственно к атому фосфора или к атому O, N или S, связанному с атомом фосфора. Что касается амин- или амид-содержащих межнуклеотидных связей (например, PNA), фрагмент конъюгата может быть присоединен к атому азота амина или амида или к смежному атому углерода.

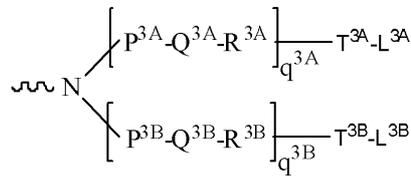
Можно применять любой подходящий в области РНК-интерференции лиганд, хотя лиганд, как правило, представляет собой углевод, например моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, полисахарид.

Линкеры, посредством которых лиганд конъюгирует с нуклеиновой кислотой, включают те, которые описаны выше. Например, лигандом может быть одно или несколько производных GalNAc (N-ацетилглюкозамина), присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

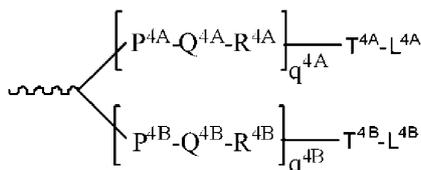
В одном варианте осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентными и трехвалентными разветвленными линкерами, включающими структуры, показанные любой из формул (IV)-(VII)



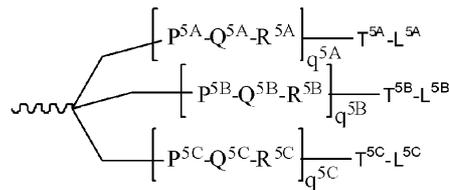
Формула (IV)



Формула (V)



Формула (VI)



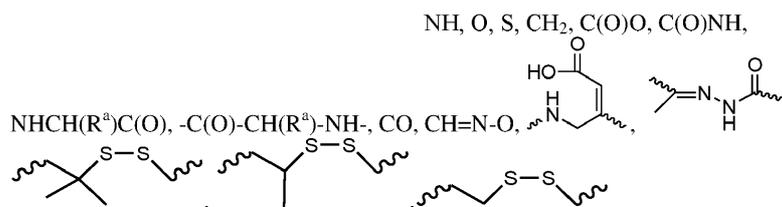
Формула (VII)

или  
где  $q^{2A}$ ,  $q^{2B}$ ,  $q^{3A}$ ,  $q^{3B}$ ,  $q^{4A}$ ,  $q^{4B}$ ,  $q^{5A}$ ,  $q^{5B}$  и  $q^{5C}$  независимо представляют собой для каждого случая 0-20 и где повторяющиеся единицы могут быть одинаковыми или различными;

каждая из  $P^{2A}$ ,  $P^{2B}$ ,  $P^{3A}$ ,  $P^{3B}$ ,  $P^{4A}$ ,  $P^{4B}$ ,  $P^{5A}$ ,  $P^{5B}$ ,  $P^{5C}$ ,  $T^{2A}$ ,  $T^{2B}$ ,  $T^{3A}$ ,  $T^{3B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{4B}$ ,  $T^{4A}$ ,  $T^{5B}$ ,  $T^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствует, переставляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH или CH<sub>2</sub>O;

$Q^{2A}$ ,  $Q^{2B}$ ,  $Q^{3A}$ ,  $Q^{3B}$ ,  $Q^{4A}$ ,  $Q^{4B}$ ,  $Q^{5A}$ ,  $Q^{5B}$ ,  $Q^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sup>N</sup>), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

каждая из  $R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{5C}$  независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой

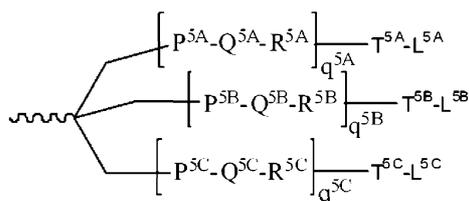


или гетероцикл;

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

$R^a$  представляет собой H или боковую цепь аминокислоты.

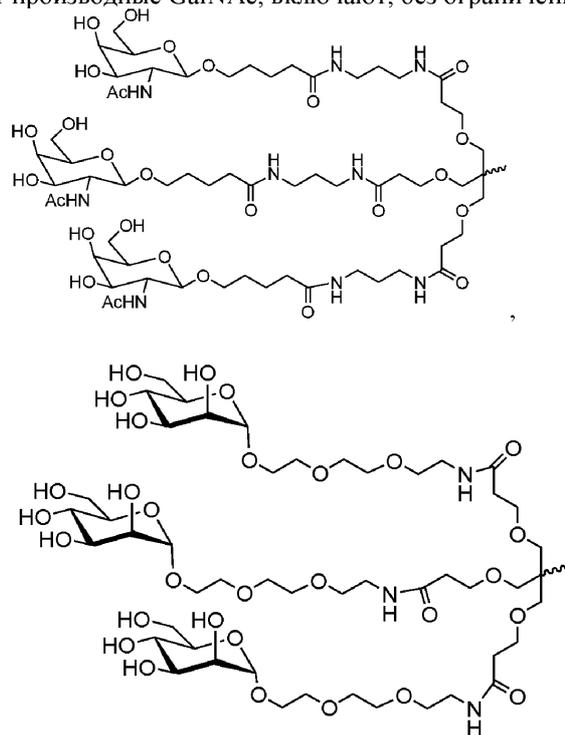
Трехвалентные конъюгирующие производные GalNAc в особенности пригодны для применения со средством для RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, такие как производные формулы (VII)

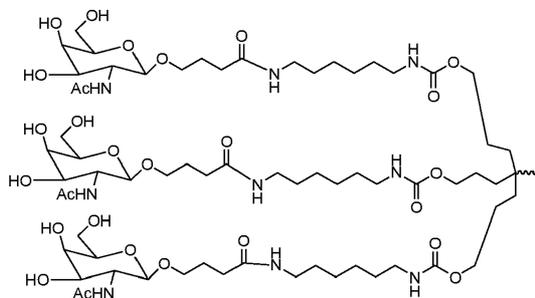
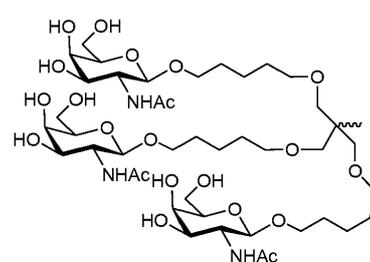
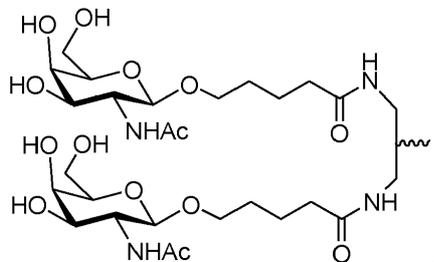
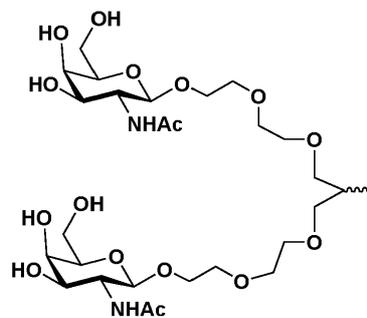
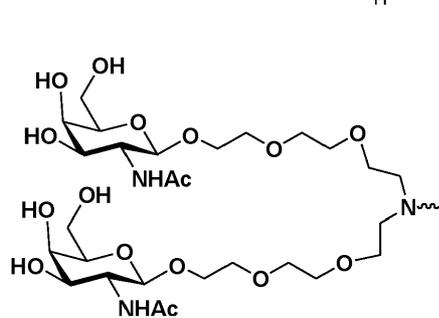
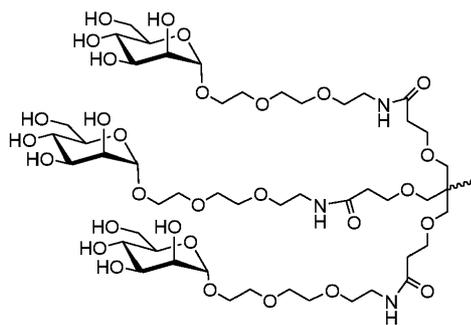


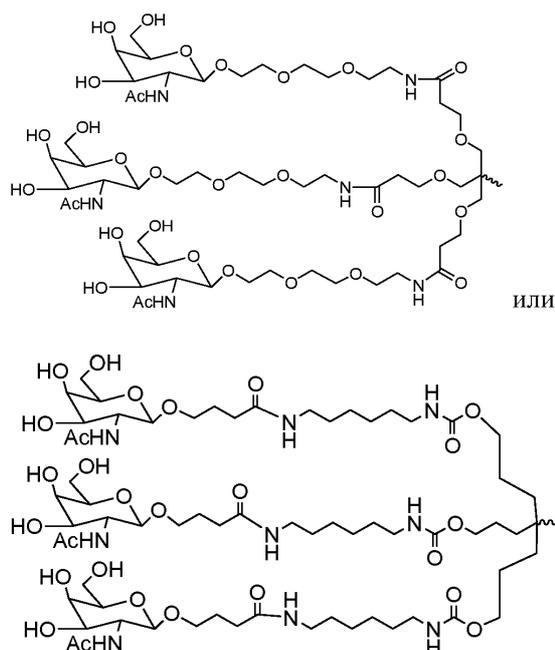
Формула (VII)

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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, посредством которых конъюгируют производные GalNAc, включают, без ограничения, следующие соединения:







В других вариантах осуществления средство для RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы, состоящей из AD-53815, AD-56663, AD-56658, AD-56676, AD-56666, AD-57928 и AD-60212.

### III. Доставка иРНК согласно настоящему изобретению.

Доставку средства, представляющего собой иРНК, согласно настоящему изобретению к клетке например, клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с нарушением липидного обмена, таким как гиперлипидемия), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с иРНК согласно настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения композиции, содержащей иРНК, например, dsRNA, субъекту. В альтернативном случае, доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. Такие альтернативные случаи описаны далее ниже.

Как правило, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с иРНК согласно настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian R.L. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5): 139-144 и WO 94/02595, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме). Что касается доставки *in vivo*, факторы, которые учитывают в контексте доставки молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставленной молекулы, предупреждение неспецифического действия и накопление доставленной молекулы в целевой ткани. Неспецифическое действие иРНК может быть сведено к минимуму путем локального введения, например путем прямой инъекции или вживления в ткань, или местного введения препарата. Локальное введение в место обработки максимально увеличивает локальную концентрацию средства, ограничивает воздействие средства на системные ткани, которые в ином случае могут быть повреждены средством или которые могут разрушить средство, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы иРНК. Несколько исследований показали эффективный нокдаун генных продуктов при введении иРНК локально. Например, было показано, что внутриглазная доставка dsRNA к VEGF путем как инъекции в стекловидное тело макаков-крабоедов (Tolentino M.J. et al. (2004) Retina 24:132-138), так и субретинальных инъекций мышам (Reich S.J., et al. (2003) Mol. Vis. 9:210-216) предупреждает образование новых сосудов в экспериментальной модели возрастной макулярной дистрофии. Кроме того, непосредственная внутриопухолевая инъекция dsRNA мышам уменьшает размер опухоли (Pille J. et al. (2005) Mol. Ther. 11:267-274) и может увеличивать продолжительность жизни мышей с опухолью (Kim W.J. et al. (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li S. et al. (2007) Mol. Ther. 15:515-523). РНК-интерференция также была успешной при локальной доставке к ЦНС путем непосредственной доставки (Dorn G. et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan P.H. et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura H. et al. (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina G.T. et al. (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker E.R. et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya Y. et al. (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602) и к легким путем интраназального введения (Howard K.A. et al. (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang X. et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko V. et al. (2005) Nat. Med. 11:50-55). Что касается введения иРНК системно для лечения заболевания, РНК может быть модифицирована или, в качестве альтернативы, доставлена при помощи системы доставки лекарственного средства; оба способа действуют для предупреждения быстрого разрушения dsR-

НА эндо- и экзонуклеазами *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также могут делать возможным нацеливание композиции с иРНК на целевую ткань, и с их помощью можно избежать нежелательного нецелевого действия. Молекулы иРНК можно модифицировать при помощи химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для повышения поглощения клеткой и предупреждения разрушения. Например, иРНК, направленную против АроВ и конъюгированную с фрагментом, представляющим собой липофильный холестерин, вводили системно мышам и получали в результате нокаун иРНК АроВ как в печени, так и в тонкой кишке (Soutschek J. et al. (2004) *Nature* 432:173-178). Как было показано, конъюгация иРНК с аптамером ингибирует рост опухоли и опосредует регресс опухоли на мышинных моделях рака предстательной железы (McNamara J.O. et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). В альтернативном варианте осуществления иРНК можно доставлять с помощью систем доставки лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионная система доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы иРНК (отрицательно заряженной) и также увеличивают взаимодействия на отрицательно заряженной клеточной мембране с обеспечением эффективного поглощения иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут либо быть связанными с иРНК, либо на них воздействуют для образования пузырька или мицеллы (см., например, Kim S.H. et al. (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), которые заключают в себя иРНК. Образование пузырьков или мицелл также предупреждает разрушение иРНК при введении системно. Способы получения и введения катионных комплексов с иРНК находятся в пределах квалификации специалистов в данной области техники (см., например, Sorensen D.R. et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma U.N. et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold A.S. et al. (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, которые включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме). Некоторые неограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, пригодных для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen D.R. et al. (2003), выше; Verma U.N. et al. (2003), выше), олигофектамин, "твердые частицы с нуклеиновой кислотой-липидом" (Zimmermann T.S. et al. (2006) *Nature* 441:111-114), кардиолипин (Chien P.Y. et al. (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal A. et al. (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), полиэтиленимин (Bonnet M.E. et al. (2008) *Pharm. Res.*, электронная публикация перед печатью 16 августа; Aigner A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), содержащие Arg-Gly-Asp (RGD) пептиды (Liu S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) и полиамидамины (Tomalia D.A. et al. (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo H. et al. (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). В некоторых вариантах осуществления иРНК образуют комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который включен в данный документ при помощи ссылки в полном объеме.

А. Кодированные вектором иРНК согласно настоящему изобретению иРНК, нацеленные на ген PCSK9, могут экспрессироваться транскрипционными единицами, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture A. et al., *TIG*. (1996), 12:5-10; Skillern A. et al., международную РСТ публикацию № WO 00/22113, Congrad, международную РСТ публикацию № WO 00/22114 и Congrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (порядка от часов до недель) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых тканей или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансгены также могут быть сконструированы с возможностью наследования их в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Отдельные нить или нити иРНК могут транскрибироваться с промотора вектора экспрессии. В тех случаях, когда необходимо экспрессировать две отдельные нити с получением, например, dsRNA, тогда в целевую клетку можно совместно вводить два отдельных вектора экспрессии (например, путем трансфекции или инфицирования). В альтернативном случае, каждая отдельная нить dsRNA может транскрибироваться с участием промоторов, оба из которых расположены в одной и той же плазмиде экспрессии. В одном варианте осуществления dsRNA экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированным повтором, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью, таким образом, что dsRNA имеет структуру типа "стебель-петля".

Векторы экспрессии с иРНК, как правило, являются ДНК-плазмидами или вирусными векторами. Векторы экспрессии, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии иРНК, как описано в данном документе. Векторы экспрессии для эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны от ряда коммерческих источников. Обычно предусмотрены такие векторы, содержащие удобные сайты рестрикции для вставки необходимого сегмента нуклеиновой кислоты. Доставка векторов, экспрессирующих иРНК, может быть системной, как, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в целевые клетки, эксплантированные из пациента, с последующим обратным введением пациенту или путем любого другого способа, который обеспечивает возможность введения в желательную целевую клетку.

Целевые клетки можно трансфицировать плазмидами экспрессии иРНК в виде комплекса с носите-

лями-катионными липидами (например, олигофектамином) или носителями на основе некатионных липидов (например, Transit-ТКО™). В настоящем изобретении также рассматриваются множественные трансфекции при помощи липидов для типов иРНК-опосредованного нокдауна, нацеленного на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или более. Успешное введение векторов в клетки хозяина можно контролировать при помощи разнообразных известных способов. Например, о временной трансфекции может сообщать репортер, такой как флуоресцентный маркер, как, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена при помощи маркеров, которые придают трансфицированной клетке устойчивость к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным средствам), такую как устойчивость к гиромизину В.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в данном документе, включают, без ограничения: (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, в том числе без ограничения лентивирусные векторы, вирус мышинного лейкоза Молони и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированного вируса; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) векторы на основе пикорнавируса; (i) векторы на основе вируса поксвируса, такого как ортопокс, например, векторы на основе вируса осповакцины, или авипокс, например канарипокс или оспы кур; и (j) хелпер-зависимый или "слабый" аденовирус. Также преимущественными могут быть вирусы с нарушенной репликацией. Различные векторы будут или не будут встраиваться в геном клеток. При необходимости, конструкции могут включать вирусные последовательности для трансфекции. В качестве альтернативы, конструкция может быть встроена в векторы, способные к эписомальной репликации, например векторы на основе EPV и EBV. В конструкциях для рекомбинантной экспрессии иРНК, как правило, будут необходимы регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.д. для обеспечения экспрессии иРНК в целевых клетках. Другие аспекты, учитываемые в отношении векторов и конструкций, описаны далее ниже.

Векторы, пригодные для доставки иРНК, будут включать регуляторные элементы (промотор, энхансер и т.д.), достаточные для экспрессии иРНК в желательных целевых клетке или ткани. Регуляторные элементы можно выбирать для получения либо конститутивной, либо регулируемой/индуцибельной экспрессии.

Экспрессия иРНК может быть точно регулируемой, например, путем использования индуцибельной регуляторной последовательности, которая чувствительна к определенным физиологическим регуляторам, например, уровням циркулирующей глюкозы или гормонам (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Такие индуцибельные экспрессирующие системы, подходящие для управления экспрессией dsRNA в клетках или у млекопитающих, включают, например, регулирование при помощи экдизона, при помощи эстрогена, прогестерона, тетрациклина, химических индукторов димеризации и изопропил-бета-О-тиогалактопиранозида (TPTG). Специалист в данной области сможет выбрать соответствующую регуляторную/промоторную последовательность, опираясь на предполагаемое использование трансгена иРНК.

Можно использовать вирусные векторы, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК. Например, можно использовать ретровирусный вектор (см. Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Такие ретровирусные векторы содержат компоненты, необходимые для правильной упаковки вирусного генома и интеграции в ДНК клетки-хозяина. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие иРНК, клонируют в один или несколько векторов, которые облегчают доставку нуклеиновой кислоты пациенту. Более подробное описание ретровирусных векторов можно найти, например, в Voesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), в котором описано применение ретровирусного вектора для доставки гена *mdr1* к гемопоэтическим стволовым клеткам для придания стволовым клеткам большей устойчивости к химиотерапии. Другими источниками, иллюстрирующими применение ретровирусных векторов в генной терапии, являются: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); и Grossman and Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993). Лентивирусные векторы, предусматриваемые для использования, включают, например, векторы на основе HIV, описанные в патентах США № 6143520; 5665557 и 5981276, которые включены в данный документ при помощи ссылки.

Аденовирусы также предусматриваются для использования в доставке иРНК согласно настоящему изобретению. Аденовирусы представляют собой особенно перспективные "проводники", например, для доставки генов к респираторному эпителию. Аденовирусы естественным образом инфицируют респираторный эпителий, где они вызывают заболевание с легким течением. Другими мишенями для основанных на аденовирусах системах доставки являются печень, центральная нервная система, эндотелиальные клетки и мышца. Аденовирусы обладают преимуществом в том, что способны инфицировать неделящиеся клетки. В Kozarsky and Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 (1993) представлена обзорная статья о генной терапии на основе аденовирусов. Bout и соавт., Human Gene Therapy 5:3-10 (1994) показали использование аденовирусных векторов для переноса генов в респираторный эпителий макака-резус. Дополнительные примеры использования аденовирусов в генной терапии можно найти в Rosenfeld et al., Science 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., Cell 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., J.

Clin. Invest. 91:225-234 (1993); публикации PCT WO 94/12649 и Wang et al., Gene Therapy 2:775-783 (1995). Подходящий AV вектор для экспрессии иРНК, описанной в настоящем изобретении, способ конструирования рекомбинантного AV вектора и способ доставки вектора в целевые клетки описаны в Xia H. et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010.

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) также можно использовать для доставки иРНК согласно настоящему изобретению (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); патент США № 5436146). В одном варианте осуществления иРНК может экспрессироваться в виде двух отдельных комплементарных одноцепочечных молекул РНК при помощи рекомбинантного AAV-вектора, например, либо с РНК-промоторами, U6 или H1, либо с промотором цитомегаловируса (CMV). Подходящие AAV-векторы для экспрессии dsRNA, описанной в настоящем изобретении, способы конструирования рекомбинантного AV вектора и способы доставки векторов в целевые клетки описаны в Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K.J. et al. (1996), J. Virol., 70: 520-532; Samulski R. et al. (1989), J. Virol., 63: 3822-3826; патенте США № 5252479; патенте США № 5139941; международной заявке на патент № WO 94/13788 и международной заявке на патент № WO 93/24641, полное раскрытие которых включено в данный документ при помощи ссылки.

Другой вирусный вектор, подходящий для доставки иРНК согласно настоящему изобретению, представляет собой поксвирус, такой как вирус осповакцины, например, аттенуированный вирус осповакцины, как, например, модифицированный вирус Анкара (MVA) или NYVAC, авипокс, как, например, оспа кур или канарипокс.

Тропизм вирусных векторов может быть модифицирован путем псевдотипирования векторов белками оболочки или другими поверхностными антигенами из других вирусов или путем замены различных вирусных капсидных белков, в случае необходимости. Например, лентивирусные векторы можно подвергать псевдотипированию поверхностными белками из вируса везикулярного стоматита (VSV), вируса бешенства, вируса Эбола, вируса Мокола и т.п. AAV-векторы можно создать для нацеливания на различные клетки путем конструирования векторов так, чтобы они экспрессировали различные серотипы капсидных белков; см., например, Rabinowitz J.E. et al. (2002), J. Virol. 76:791-801, полное раскрытие которого включено в данный документ при помощи ссылки.

Фармацевтический препарат вектора может включать вектор в приемлемом разбавителе или может включать матрицу замедленного высвобождения, в которую включено средство доставки генов. В альтернативном случае, когда вектор доставки целого гена может вырабатываться нативно рекомбинантными клетками, например ретровирусные векторы, тогда фармацевтический препарат может включать одну или несколько клеток, которые вырабатывают систему доставки генов.

V. Фармацевтические композиции согласно изобретению.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают иРНК согласно настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие иРНК, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, пригодны для лечения заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией или активностью гена PCSK9, например, нарушения липидного обмена. Такие фармацевтические композиции составляют, исходя из способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например, путем внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например, путем инфузии в головной мозг, как, например, непрерывной инфузии при помощи насоса.

Фармацевтические композиции, содержащие средства для RNAi согласно настоящему изобретению, могут быть, например, растворами с буфером или без него или композициями, содержащими фармацевтически приемлемые носители. Такие композиции включают, например, водные или кристаллические композиции, липосомные составы, мицеллярные составы, эмульсии и векторы для генной терапии.

В способах согласно настоящему изобретению средство для RNAi можно вводить в растворе. Свободное средство для RNAi можно вводить в небуферном растворе, например в физиологическом растворе или в воде. В качестве альтернативы, свободную siRNA также можно вводить в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В предпочтительном варианте осуществления буферным раствором является забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора, содержащего средство для RNAi, можно корректировать, с тем чтобы он подходил для введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления буферный раствор дополнительно содержит средство для регулирования осмолярности раствора, так что осмолярность поддерживается на необходимом значении, например, на физиологических значениях для плазмы крови человека. Растворенные вещества, которые можно добавлять к буферному раствору для регулирования осмолярности, включают, без ограничения, белки, пептиды, аминокислоты, не подающиеся метаболизму полимеры, витамины, ионы, сахара, метаболиты, органические кислоты, липиды или соли. В некоторых вариантах осуществления средство для регулирования осмолярности раствора представляет собой соль. В определенных вариантах осуществле-

ния средство для регулирования осмолярности раствора представляет собой хлорид натрия или хлорид калия.

Фармацевтические композиции согласно изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена PCSK9. Как правило, приемлемая доза иРНК согласно настоящему изобретению будет составлять в диапазоне от примерно 0,001 до примерно 200,0 мг на килограмм массы тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от примерно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в день. Например, dsRNA можно вводить в количестве примерно 0,01 мг/кг, примерно 0,05 мг/кг, примерно 0,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 1,5 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 20 мг/кг, примерно 30 мг/кг, примерно 40 мг/кг или примерно 50 мг/кг на разовую дозу.

К примеру, средство для RNAi, например dsRNA, можно вводить в дозе примерно

0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9,  
2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1,  
4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3,  
6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5,  
8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9,

или примерно 10 мг/кг.

Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

В другом варианте осуществления средство для RNAi, например dsRNA, вводят в дозе от примерно 0,1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 2 до примерно 50 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 3 до примерно 50 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 4 до примерно 50 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 10 до примерно 50 мг/кг, от примерно 15 до примерно 50 мг/кг, от примерно 20 до примерно 50 мг/кг, от примерно 20 до примерно 50 мг/кг, от примерно 25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 30 до примерно 50 мг/кг, от примерно 35 до примерно 50 мг/кг, от примерно 40 до примерно 50 мг/кг, от примерно 45 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 45 мг/кг, от примерно 1 до примерно 45 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 2 до примерно 45 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 3 до примерно 45 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 10 до примерно 45 мг/кг, от примерно 15 до примерно 45 мг/кг, от примерно 20 до примерно 45 мг/кг, от примерно 20 до примерно 45 мг/кг, от примерно 25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 30 до примерно 45 мг/кг, от примерно 35 до примерно 45 мг/кг, от примерно 40 до примерно 45 мг/кг, от примерно 45 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 2 до примерно 40 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 3 до примерно 40 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 4 до примерно 40 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 10 до примерно 40 мг/кг, от примерно 15 до примерно 40 мг/кг, от примерно 20 до примерно 40 мг/кг, от примерно 20 до примерно 40 мг/кг, от примерно 25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 30 до примерно 40 мг/кг, от примерно 35 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 2 до примерно 30 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 3 до примерно 30 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 4 до примерно 30 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 10 до примерно 30 мг/кг, от примерно 15 до примерно 30 мг/кг, от примерно 20 до примерно 30 мг/кг, от примерно 20 до примерно 30 мг/кг, от примерно 25 до примерно 30 мг/кг, от примерно 25 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,25 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 2 до примерно 20 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 3 до примерно 20 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 4 до примерно 20 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 10 до примерно 20 мг/кг или от примерно 15 до примерно 20 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

К примеру, средство для RNAi, например dsRNA, можно вводить в дозе примерно

0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, или примерно 10 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по

отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть изобретения.

В другом варианте осуществления средство для RNAi, например dsRNA, вводят в дозе от примерно 0,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 2 до примерно 50 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 3 до примерно 50 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 4 до примерно 50 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 50 мг/кг, от примерно 10 до примерно 50 мг/кг, от примерно 15 до примерно 50 мг/кг, от примерно 20 до примерно 50 мг/кг, от примерно 20 до примерно 50 мг/кг, от примерно 25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 25 до примерно 50 мг/кг, от примерно 30 до примерно 50 мг/кг, от примерно 35 до примерно 50 мг/кг, от примерно 40 до примерно 50 мг/кг, от примерно 45 до примерно 50 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 45 мг/кг, от примерно 1 до примерно 45 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 2 до примерно 45 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 3 до примерно 45 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4 до примерно 45 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 45 мг/кг, от примерно 10 до примерно 45 мг/кг, от примерно 15 до примерно 45 мг/кг, от примерно 20 до примерно 45 мг/кг, от примерно 20 до примерно 45 мг/кг, от примерно 25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 25 до примерно 45 мг/кг, от примерно 30 до примерно 45 мг/кг, от примерно 35 до примерно 45 мг/кг, от примерно 40 до примерно 45 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 2 до примерно 40 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 3 до примерно 40 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 4 до примерно 40 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 40 мг/кг, от примерно 10 до примерно 40 мг/кг, от примерно 15 до примерно 40 мг/кг, от примерно 20 до примерно 40 мг/кг, от примерно 20 до примерно 40 мг/кг, от примерно 25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 25 до примерно 40 мг/кг, от примерно 30 до примерно 40 мг/кг, от примерно 35 до примерно 40 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 2 до примерно 30 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 3 до примерно 30 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 4 до примерно 30 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 30 мг/кг, от примерно 10 до примерно 30 мг/кг, от примерно 15 до примерно 30 мг/кг, от примерно 20 до примерно 30 мг/кг, от примерно 20 до примерно 30 мг/кг, от примерно 25 до примерно 30 мг/кг, от примерно 0,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 0,75 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 2 до примерно 20 мг/кг, от примерно 2,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 3 до примерно 20 мг/кг, от примерно 3,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 4 до примерно 20 мг/кг, от примерно 4,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 7,5 до примерно 20 мг/кг, от примерно 10 до примерно 20 мг/кг или от примерно 15 до примерно 20 мг/кг. В одном варианте осуществления dsRNA вводят в дозе от примерно 10 мг/кг до примерно 30 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, как, например, примерно

0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5, 27, 27.5, 28, 28.5, 29, 29.5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49,

или примерно 50 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или иРНК можно вводить в виде двух, трех или более частей дозы через определенные интервалы на протяжении дня, или даже при по-

мощи непрерывной инфузии, или доставки посредством состава с контролируемым высвобождением. В таком случае количество иРНК, содержащееся в каждой части дозы, должно быть соответственно меньше, чтобы обеспечить общую суточную дозу. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, при помощи традиционного состава с замедленным высвобождением, который предусматривает замедленное высвобождение иРНК в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области и особенно удобны для доставки средств в определенный участок, как, например, их можно применять со средствами согласно настоящему изобретению. В таком варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее множество суточной дозы.

В других вариантах осуществления разовая доза фармацевтических композиций может быть длительного действия, так что последующие дозы вводят с интервалами не более 3, 4 или 5 дней или с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 недель. В некоторых вариантах осуществления согласно настоящему изобретению разовую дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят один раз в неделю. В других вариантах осуществления согласно настоящему изобретению разовую дозу фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению вводят каждые два месяца.

Специалисту в данной области будет понятно, что определенные факторы могут влиять на дозу и временные рамки, необходимые для эффективного лечения субъекта, в том числе, без ограничения, тяжесть заболевания или нарушения, типы предшествующего лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Кроме того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать один период лечения или серию периодов лечения. Оценки эффективных доз и времени полужизни *in vivo* для отдельных иРНК, охваченных настоящим изобретением, можно получать, используя традиционные методологии, или на основании проведения исследований *in vivo* с применением соответствующей животной модели, как описано в другой части данного документа.

Достижения в области генетики мышей обеспечили ряд мышинных моделей для изучения различных заболеваний человека, как, например, нарушения свертываемости крови, на которое можно оказать благоприятное воздействие путем снижения экспрессии PCSK9. Такие модели можно использовать для проведения *in vivo* исследований иРНК, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны в данной области и включают, например, мышь, содержащую трансген, экспрессирующий PCSK9 человека.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить различными путями в зависимости от того, необходимо ли локальное или же системное лечение, и от области, подлежащей лечению. Введение может быть местным (например, при помощи трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или вдувания порошков или аэрозолей, в том числе при помощи ингалятора; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и трансдермальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; субдермальное, например посредством вживленного устройства; или интракраниальное, например, интрапаренхиматозное, подоболочечное или интравентрикулярное введение.

иРНК можно доставлять таким образом, чтобы происходило целенаправленное воздействие на конкретную ткань, как, например, печень (например, гепатоциты печени).

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. могут быть необходимы или желательны. Также можно использовать покрытые презервативы, перчатки и т.п. Подходящие составы для местного применения включают те, в которых иРНК, описанные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеил фосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC), дистеароил фосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоил фосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеил фосфатидилэтаноламин (DOTMA)). иРНК, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с ними, в частности, с катионными липосомами. В качестве альтернативы, иРНК могут образовывать комплексы с липидами, в частности, с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, без ограничения, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C<sub>1-20</sub>алкиловые сложные эфиры (например, изопропилмиристинат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ при помощи ссылки.

А. Составы с иРНК, содержащие мембранные молекулярные ансамбли иРНК для применения в композициях и способах согласно настоящему изобретению, могут быть составлены для доставки в мембранный молекулярный ансамбль, например, липосому или мицеллу. Используемое в данном документе выражение "липосома" относится к пузырьку, состоящему из амфифильных липидов, расположенных в виде по меньшей мере одного бислоя, например одного бислоя или множества бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные пузырьки, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водную внутреннюю часть. Водная часть содержит композицию с иРНК. Липофильный материал отделяет водную внутреннюю среду от водной внешней среды, которая, как правило, не включает композицию с иРНК, хотя в некоторых примерах может включать. Липосомы пригодны для переноса и доставки активных ингредиентов к месту приложения действия. Благодаря тому, что мембрана липосомы структурно подобна биологическим мембранам, при применении липосом к тканям бислои липосомы сливаются с бислоем клеточных мембран. По мере того как идет слияние липосомы и клетки, внутреннее водное содержимое, которое включает иРНК, доставляется в клетку, где иРНК может специфически связываться с целевой РНК и может опосредовать RNAi. В некоторых случаях липосомы также являются специфически нацеленными, например, для направления иРНК в конкретные типы клеток.

Липосомы, содержащие средство для RNAi, могут быть получены рядом способов. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте для того, чтобы образовывались мицеллы с липидным компонентом. Например, липидный компонент может быть амфипатическим катионным липидом или липидным конъюгатом. Детергент может характеризоваться высокой критической концентрацией мицеллообразования и может быть неионным. Иллюстративные детергенты включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Препарат средства для RNAi затем добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют со средством для RNAi и конденсируются вокруг средства для RNAi с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например путем диализа, с получением липосомного препарата средства для RNAi.

При необходимости соединение-носитель, которое содействует конденсации, можно добавлять во время реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может быть полимером, отличным от нуклеиновой кислоты (например, спермином или спермидином). Также можно корректировать pH для содействия конденсации.

Способы получения стабильных полинуклеотидных средств доставки, которые включают комплекс полинуклеотида/катионного липида в качестве структурных компонентов средств доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которой включено в данный документ при помощи ссылки. Образование липосом может также включать один или несколько аспектов иллюстративных способов, описанных в Feigner P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987; патенте США № 4897355; патенте США № 5171678; Bangham et al., M. Mol. Biol. 23:238, 1965; Olson et al., Biochim. Biophys. Acta 557:9, 1979; Szoka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 75: 4194, 1978; Mayhew et al., Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984; Kim et al., Biochim. Biophys. Acta 728:339, 1983; и Fukunaga et al., Endocrinol. 115:757, 1984. Широко применяемые методики получения липидных агрегатов соответствующего для использования в качестве средств доставки размера включают разрушение ультразвуком и замораживание-оттаивание с экструзией (см., например, Mayer et al., Biochim. Biophys. Acta 858:161, 1986). Микрофлюидизацию можно применять в тех случаях, когда желательны стабильно малые (от 50 до 200 нм) и относительно единообразные агрегаты (Mayhew et al., Biochim. Biophys. Acta 775:169, 1984). Такие способы легко адаптируются для упаковки препарата средства для RNAi в липосомы.

Липосомы делятся на два широких класса. Катионные липосомы являются положительно заряженными липосомами, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот с образованием стабильных комплексов. Положительно заряженный комплекс нуклеиновой кислоты/липосомы связывается с отрицательно заряженной клеточной поверхностью и интернализируется в эндосому. Вследствие того, что внутри эндосомы кислый pH, липосомы разрываются, высвобождая свое содержимое в клеточную цитоплазму (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно-заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты вместо образования комплекса с ними. Поскольку как нуклеиновая кислота, так и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее, некоторая часть нуклеиновых кислот захватывается водной внутренней средой этих липосом. Липосомы с pH-чувствительностью использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, к монослоям клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена обнаруживали в целевых клетках (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Один главный тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от полученного естественным образом фосфатидилхолина. Композиции нейтральных липосом, например, могут быть образованы из димристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции анионных липосом, как правило, образованы из димристоилфосфатидилхолина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы главным образом из диолеилфосфатидилэтаноламина

(DOPE). Другой тип липосомных композиций образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC соевых бобов и PC яиц. Другой тип образован из смесей фосфолипида, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

Примеры других способов для *in vitro* и *in vivo* введения липосом в клетки включают патент США № 5283185; патент США № 5171678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Feigner, J. Biol. Chem. 269:2550, 1994; Nabel, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:11307, 1993; Nabel, Human Gene Ther. 3:649, 1992; Gershon, Biochem. 32:7143, 1993; и Strauss EMBO J. 11:417, 1992.

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина-А в слой дермы кожи мышей. Результаты показали, что такие неионные липосомные системы были эффективны в обеспечении депонирования циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu et al., S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4(6) 466).

Липосомы также включают "пространственно стабилизированные" липосомы, которые, как используется в данном документе, означают липосомы, содержащие один или несколько специальных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специальные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются те, в которых часть липидной составляющей, образующей пузырек, липосомы (А) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид  $G_{M1}$ , или (В) получена из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, в области техники полагают, что, по меньшей мере, для пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-производные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженного поглощения клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Разнообразные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, известны в данной области. Parahadjopoulos и соавт. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозидов  $G_{M1}$ , сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon и соавт. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen и соавт., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид  $G_{M1}$  или сложные эфиры сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb и соавт) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lime et al.).

В одном варианте осуществления используют катионные липосомы. Катионные липосомы обладают преимуществом в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не могут сливаться настолько эффективно с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo*, и их можно использовать для доставки средств для RNAi к макрофагам.

Дополнительные преимущества липосом включают следующее: липосомы, полученные из натуральных фосфолипидов, биосовместимы и биоразрушаемы; липосомы могут включать широкий диапазон воды и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные средства для RNAi во внутренних отделениях от метаболизма и разрушения (Rosoff, в "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными аспектами в получении липосомных составов являются заряд поверхности липида, размер пузырька и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, хлорид N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), можно использовать для образования малых липосом, которые самопроизвольно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток культуры тканей, что приводит к доставке средства для RNAi (см., например, Feigner P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 и патент США № 4897355 касательно описания DOTMA и его применения с ДНК).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно использовать в комбинации с фосфолипидом с образованием пузырьков, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки сильно анионных нуклеиновых кислот в клетки культуры живых тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. В тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом, тогда суммарный заряд полученных комплексов является также положительным. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроиз-

вольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

Другие опубликованные соединения с катионными липидами включают те, которые были конъюгированы с рядом фрагментов, в том числе, например, карбоксиспермином, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов и включает такие соединения, как 5-карбоксиспермилглициндиохлаолеоиламид ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Мэдисон, Висконсин) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламина 5-карбоксиспермиламид ("DPPE") (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат с катионным липидом включает полученные производные липида с холестерином ("DC-Chol"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao X. and Huang L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Как сообщалось, липополилизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным при трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Для определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, как указывается, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию, чем DOTMA содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты с катионными липидами включают DMRIE и DMRIE-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомные составы в особенности подходят для местного применения, при этом липосомы проявляют некоторые преимущества по сравнению с другими составами. Такие преимущества включают сниженное побочное действие по отношению к высокой системной абсорбции введенного лекарственного средства, повышенное накопление введенного лекарственного средства в необходимой мишени и возможность вводить средство для RNAi в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы используют для доставки средства для RNAi к эпидермальным клеткам и также для усиления проникновения средства для RNAi в дермальные ткани, например в кожу. Например, липосомы можно применять местно. Была документально зафиксирована местная доставка лекарственных средств, составленных в виде липосом, в кожу (см., например, Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 и du Plessis et al., *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino R.J. and Fould-Fogerite S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani T. et al., *Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau C. et al., *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R.M. and Papahadjopoulos D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang C.Y. and Huang L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

Неионные липосомные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности системы, содержащие неионное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионные липосомные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки лекарственного средства в слой дермы кожи мышей. Такие составы со средством для RNAi пригодны для лечения дерматологического нарушения.

Липосомы, которые включают иРНК, могут быть получены с высокой способностью деформироваться. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через пору, которая меньше, чем средний радиус липосомы. Например, типом деформируемых липосом являются трансферсомы. Трансферсомы можно получить путем добавления поверхностных пограничных активаторов, обычно поверхностно-активных веществ, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы, которые включают средство для RNAi, можно доставлять, например, подкожно путем инъекции для доставки средства для RNAi к кератиноцитам в коже. Для того чтобы пройти через неповрежденную кожу млекопитающего, липидные пузырьки должны пройти через ряд мелких пор, каждая с диаметром менее 50 нм, под воздействием подходящего внутрикожного градиента. Кроме того, благодаря свойствам липидов, такие трансферсомы могут быть самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор, например, в коже), самовосстанавливающимися, и зачастую могут достигать свои мишени без разделения на фрагменты, и часто могут быть самозагружающимися.

Другие составы, применимые в настоящем изобретении, описаны в предварительных заявках США с серийными № 61/018616, поданной 2 января 2008 г.; 61/018611, поданной 2 января 2008 г.; 61/039748, поданной 26 марта 2008 г.; 61/047087, поданной 22 апреля 2008 г., и 61/051528, поданной 8 мая 2008 г. В PCT заявке № PCT/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, применимые в настоящем изобретении.

Трансферсомы представляют собой еще один тип липосом и представляют собой липидные агрегаты с высокой способностью деформироваться, они являются перспективными кандидатами как средства доставки лекарственных средств. Трансферсомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры

меньшие, чем капельки. Трансферсомы являются приспособляющимися к окружающей среде, в которой их используют, например они являются самооптимизирующимися (приспосабливающимися к форме пор в коже), самовосстанавливающимися, зачастую достигают мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферсомой можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы использовали для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как эмульсии (в том числе микроэмульсии) и липосомы. Наиболее распространенным способом классифицирования и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как естественных, так и синтетических, является использование гидролипидного баланса (HLB). Природа гидрофильной группы (также известной как "головка") предоставляет наиболее эффективное средство для распределения по категориям различных поверхностно-активных веществ, используемых в составах (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизирована, то ее классифицируют как неионное поверхностно-активное вещество. Неионные поверхностно-активные вещества находят широкое применение в фармацевтических и косметических продуктах, и их можно применять при широком диапазоне значений pH. Обычно их значения HLB находятся в диапазоне от 2 до примерно 18 в зависимости от их структуры. Неионные поверхностно-активные вещества включают неионные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, сложные эфиры глицерила, сложные эфиры полиглицерила, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. Неионные алканоамиды и эфиры, как, например, этоксилаты жирного спирта, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блоксополимеры, также включены в данный класс. Полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества являются наиболее распространенными представителями класса неионных поверхностно-активных веществ.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как анионное. Анионные поверхностно-активные вещества включают карбоксилаты, как, например, омыляющие вещества, ациллактаты, ациламиды аминокислот, сложные эфиры серной кислоты, такие как алкилсульфаты и этоксилированные алкилсульфаты, сульфонаты, такие как алкилбензолсульфонаты, ацилизетионаты, ацилтаураты и сульфосукцинаты, и фосфаты. Наиболее важными представителями класса анионных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и омыляющие вещества.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд при растворении или диспергировании в воде, то поверхностно-активное вещество классифицируют как катионное. Катионные поверхностно-активные вещества включают четвертичные соли аммония и этоксилированные амины. Четвертичные соли аммония являются наиболее применяемыми представителями данного класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести либо положительный, либо отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируют как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламидами, N-алкилбетаины и фосфатиды.

Было рассмотрено применение поверхностно-активных веществ в готовых лекарственных формах, составах и в эмульсиях (Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

иРНК для применения в способах согласно настоящему изобретению может также предусматриваться в виде мицеллярных составов. "Мицеллы" в данном документе определены как конкретный тип молекулярного ансамбля, в котором амфипатические молекулы организованы в виде сферической структуры, так что все гидрофобные части молекулы направлены вовнутрь, оставляя гидрофильные части соприкасающимися с окружающей водной фазой. Противоположное расположение имеет место, если окружающая среда гидрофобная.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через внутрикожные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции с siRNA, C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, вытяжку из ромашки, вытяжку из огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурчника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять во время или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться, по сути, при любом виде смешивания ингредиентов, кроме интенсивного перемешивания для получения мицелл с меньшим размером.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию с siRNA и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Первую мицеллярную композицию затем смешивают по меньшей мере с тремя мицеллообразующими соединениями с образованием смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают путем смешивания композиции с siRNA, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из мицеллообразующих соединений с последующим добавлением оставшихся мицеллообразующих соединений с интенсивным смешиванием.

Фенол и/или м-крезол можно добавлять к смешанной мицеллярной композиции для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. В качестве альтернативы, фенол и/или м-крезол можно добавлять с мицеллообразующими ингредиентами. Изотоническое средство, такое как глицерин, также можно добавлять после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав можно поместить в аэрозольный распылитель и распылитель зарядить газом-вытеснителем. Газ-вытеснитель, который находится под давлением, находится в жидкой форме в распылителе. Соотношения ингредиентов корректируют так, что водная фаза и фаза газа-вытеснителя становятся одной, т.е. присутствует одна фаза. Если присутствует две фазы, то необходимо встряхнуть распылитель перед распылением части содержимого, например, посредством дозирующего клапана. Распыляемая доза фармацевтического средства выталкивается из дозирующего клапана в виде мелкодисперсной струи.

Газы-вытеснители могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, простой диметилэфир и простой диэтиловый эфир. В определенных вариантах осуществления можно использовать HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов могут быть определены при помощи проведения относительно простых экспериментов. Для абсорбции через ротовую полость часто необходимо увеличить, например, по меньшей мере, удвоить или утроить, дозу, предназначенную для инъекции или введения через желудочно-кишечный тракт.

В. Липидные частицы.

иРНК, например dsRNA согласно настоящему изобретению, может быть полностью инкапсулирована в липидном составе, например LNP, или другой частице нуклеиновая кислота-липид.

Используемое в данном документе выражение "LNP" относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. LNP содержат катионный липид, некаатионный липид и липид, который предупреждает агрегацию частиц (например, конъюгат PEG-липид). LNP весьма пригодны для системных применений, поскольку они характеризуются длительным временем жизни в кровотоке после внутривенной (i.v.) инъекции и накапливаются в дистальных участках (например, участках, физически отделенных от места введения). LNP включают "pSPLP", которая включает инкапсулированный комплекс конденсирующее средство-нуклеиновая кислота, который приведен в РСТ публикации № WO 00/03683. Частицы согласно настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр от примерно 50 нм до примерно 150 нм, чаще от примерно 60 нм до примерно 130 нм, чаще от примерно 70 нм до примерно 110 нм, наиболее часто от примерно 70 нм до примерно 90 нм и по сути являются нетоксичными. Кроме того, нуклеиновые кислоты, когда присутствуют в частицах нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к разрушению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыт, например, в патентах США № 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; публикации США № 2010/0324120 и РСТ публикации № WO 96/40964.

В одном варианте осуществления соотношение липида и лекарственного средства (соотношение масса/масса) (например, соотношение липида и dsRNA) будет находиться в диапазоне от примерно 1:1 до примерно 50:1, от примерно 1:1 до примерно 25:1, от примерно 3:1 до примерно 15:1, от примерно 4:1 до примерно 10:1, от примерно 5:1 до примерно 9:1 или от примерно 6:1 до примерно 9:1. Диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилокси)пропиламин (DODMA), 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дилинолеилкарбамоилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дилинолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дилинолеил-3-диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMA), хлористую соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлористую соль 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N,N-дилинолеил-амино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги,

(3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутилат(МСЗ), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанидиол)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от примерно 20 мол.% до примерно 50 мол.% или примерно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

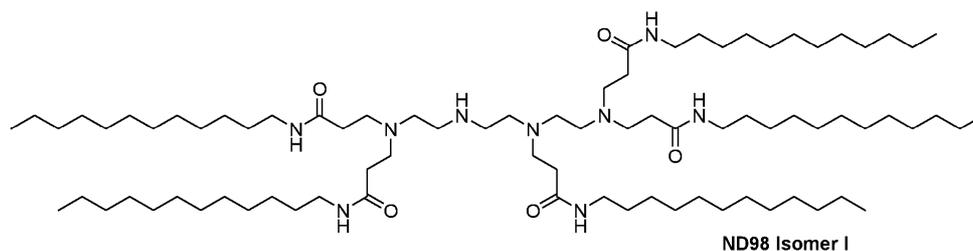
В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц липид-siRNA. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США номер 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки. В одном варианте осуществления частицы липид-siRNA включают 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана; 10%DSPC; 40% холестерина; 10% PEG-C-DOMG (мольный процент) с размером частиц  $63,0 \pm 20$  нм и соотношением siRNA/липид 0,027.

Ионизируемый/некатионный липид может представлять собой анионный липид или нейтральный липид, в том числе, без ограничения, дистеароилфосфатидилхолин (DSPC), диолеоилфосфатидилхолин (DOPC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC), диолеоилфосфатидилглицерин (DOPG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG), диолеоилфосфатидилэтанолламин (DOPE), пальмитоилолеоилфосфатидилхолин (POPC), пальмитоилолеоилфосфатидилэтанолламин (POPE), диолеоилфосфатидилэтанолламин-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (DOPE-mal), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE), димиристоилфосфатидилэтанолламин (DMPE), дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE), 16-О-монометил-PE, 16-О-диметил-PE, 18-1-транс-PE, 1-стеароил-2-олеоилфосфатидилэтанолламин (SOPE), холестерин или их смесь. Некатионный липид может составлять от примерно 5 мол.% до примерно 90 мол.%, примерно 10 мол.% или примерно 58 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице, если холестерин включен.

Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может представлять собой, например, конъюгат полиэтиленгликоль (PEG)-липид, в том числе, без ограничения, PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил (G2), PEG-димиристоилоксипропил (C<sub>4</sub>), PEG-дипальмитилоксипропил (C<sub>6</sub>) или PEG-дистеарилоксипропил (C<sub>8</sub>). Конъюгированный липид, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол.% до примерно 20 мол.% или примерно 2 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид дополнительно включают холестерин в количестве, например, от примерно 10 мол.% до примерно 60 мол.% или примерно 48 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В одном варианте осуществления липидоид ND98-4HCl (MW 1487) (см. заявку на патент США № 12/056230, поданную 26 марта 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки), холестерин (Sigma-Aldrich) и PEG-церамид C16 (Avanti Polar Lipids) можно использовать для получения наночастицы липид-dsRNA (т.е. частиц LNP01). Маточные растворы каждого в этаноле могут быть получены следующим образом: ND98, 133 мг/мл; холестерин, 25 мг/мл; PEG-церамид C16, 100 мг/мл. Маточные растворы ND98, холестерина и PEG-церамида C16 можно затем объединять, например, в молярном соотношении 42:48:10. Объединенный липидный раствор можно смешивать с водным раствором dsRNA (например, в ацетате натрия, pH 5) так, чтобы конечная концентрация этанола составляла примерно 35-45%, а конечная концентрация ацетата натрия составляла примерно 100-300 мМ. Наночастицы липид-dsRNA обычно образуются самопроизвольно при смешивании. В зависимости от необходимого распределения частиц по размеру полученную смесь наночастиц можно продавливать через поликарбонатную мембрану (например, с отсеком по размеру в 100 нм) при помощи, например, экструдера с термоцилиндром, как, например, Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc.). В некоторых случаях стадию экструзии можно пропустить. Удаление этанола и одновременная замена буфера могут быть осуществлены, например, при помощи диализа или тангенциальной поточной фильтрации. Буфер можно заменить, например, забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS) с pH примерно 7, например pH примерно 6,9, pH примерно 7,0, pH примерно 7,1, pH примерно 7,2, pH примерно 7,3 или pH примерно 7,4.



Формула 1

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, ко-

торая, таким образом, включена при помощи ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы с липидом-dsRNA описаны в табл. А.

Таблица А

	<b>Ионизируемый/катионный липид</b>	<b>Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA</b>
LNP-1	1,2-дидиоленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:siRNA ~ 7:1
2-ХТС	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 6:1

LNP06	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5 липид:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5 липид:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3]диоксол-5-амин (ALN100)	ALN100/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3)	MC-3/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2-ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1
LNP13	ХТС	ХТС/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 липид:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/хол/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 7:1
LNP22	ХТС	ХТС/DSPC/хол/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

PEG-DMG: PEG-дидмиристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со ср. мол. весом 2000);

PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со ср. мол. весом 2000);

PEG-сDMA: PEO-карбамоил-1,2-димиристоилоксипропиламин (PEG со ср. мол. весом 2000).

Составы, содержащие LNP (1,2-дидиоленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)), описаны в международной публикации № WO 2009/127060, поданной 15 апреля 2009 г., которая, таким образом, включена при помощи ссылки.

ХТС-содержащие составы описаны, например, в предварительной заявке США с серийным № 61/148366, поданной 29 января 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/156851, поданной 2 марта 2009 г.; предварительной заявке США с серийным №, поданной 10 июня 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/228373, поданной 24 июля 2009 г.; предварительной заявке США с серийным № 61/239686, поданной 3 сентября 2009 г., и международной заявке № PCT/US2010/022614, поданной 29 января 2010 г., которые, таким образом, включены при помощи ссылки.

МС3-содержащие составы описаны, например, в публикации США № 2010/0324120, поданной 10 июня 2010 г., полное содержание которой, таким образом, включено при помощи ссылки.

ALNY-100-содержащие составы описаны, например, в международной заявке на патент с номером PCT/US09/63933, поданной 10 ноября 2009 г., которая, таким образом, включена при помощи ссылки.

C12-200-содержащие составы описаны в предварительной заявке США с серийным № 61/175770, поданной 5 мая 2009 г., и международной заявке № PCT/US10/33777, поданной 5 мая 2010 г., которые, таким образом, включены при помощи ссылки.

Синтез ионизируемых/катионных липидов.

Любое из соединений, например катионные липиды и т.п., используемые в частицах нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению, можно получить при помощи известных методик органического синтеза, включая способы, описанные более подробно в примерах. Все заместители являются такими, как определено ниже, если не указано иное.

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

"Алкенил" означает алкил, который определен выше, содержащий по меньшей мере одну двойную связь между соседними атомами углерода. Алкенилы включают как цис-, так и транс-изомеры. Типичные алкенилы с прямой цепью и разветвленные алкенилы включают этиленил, пропиленил, 1-бутенил, 2-бутенил, изобутиленил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-метил-1-бутенил, 2-метил-2-бутенил, 2,3-диметил-2-бутенил и т.п.

"Алкинил" означает любой алкил или алкенил, которые определены выше, которые дополнительно содержат по меньшей мере одну тройную связь между соседними атомами углерода. Типичные алкинилы с прямой цепью и разветвленные алкинилы включают ацетиленил, пропинил, 1-бутинил, 2-бутинил, 1-пентинил, 2-пентинил, 3-метил-1-бутинил и т.п.

"Ацил" означает любой алкил, алкенил или алкинил, в которых атом углерода в точке присоединения замещен оксогруппой, которая определена ниже. Например, -C(=O)алкил, -C(=O)алкенил и -C(=O)алкинил представляют собой ацильные группы.

"Гетероцикл" означает 5-7-членное моноциклическое или 7-10-членное бициклическое, гетероциклическое кольцо, которое является либо насыщенным, ненасыщенным, либо ароматическим и которое содержит 1 или 2 гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и где гетероатомы азота и серы необязательно могут быть окислены, и гетероатом азота необязательно может быть кватернизирован, в том числе бициклические кольца, в которых любой из вышеперечисленных гетероциклов слит с бензольным кольцом. Гетероцикл может быть присоединен через любой гетероатом или атом углерода. Гетероциклы включают гетероарилы, которые определены ниже. Гетероциклы включают морфолинил, пирролидинонил, пирролидинил, пиперидинил, пиперизинил, гидантоинил, валеролактаминил, оксиранил, оксетанил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, тетрагидропиридинил, тетрагидропримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил, тетрагидропиримидинил, тетрагидротиофенил, тетрагидротиопиранил и т.п.

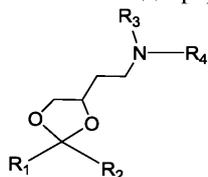
Выражения "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкинил", "необязательно замещенный ацил" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменяется заместителем. В случае оксо-заместителя (=O) замещаются два атома водорода. В связи с этим заместители включают оксо, галоген, гетероцикл, -CN, -OR<sub>x</sub>, -NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, -NR<sub>x</sub>C(=O)R<sub>y</sub>, -NR<sub>x</sub>SO<sub>2</sub>R<sub>y</sub>, -C(=O)R<sub>x</sub>, -C(=O)OR<sub>x</sub>, -C(=O)NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, -SO<sub>n</sub>R<sub>x</sub> и -SO<sub>n</sub>NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, где n равняется 0, 1 или 2, R<sub>x</sub> и R<sub>y</sub> являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных заместителей алкила и гетероцикла дополнительно может быть замещен одним или несколькими из оксо, галогена, -OH, -CN, алкила, -OR<sub>x</sub>, гетероцикла, -NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, -NR<sub>x</sub>C(=O)R<sub>y</sub>, -NR<sub>x</sub>SO<sub>2</sub>R<sub>y</sub>, -C(=O)R<sub>x</sub>, -C(=O)OR<sub>x</sub>, -C(=O)NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>, -SO<sub>n</sub>R<sub>x</sub> и -SO<sub>n</sub>NR<sub>x</sub>R<sub>y</sub>.

"Галоген" означает фтор, хлор, бром и йод.

В некоторых вариантах осуществления в способах согласно настоящему изобретению может потребоваться использование защитных групп. Методика с использованием защитных групп хорошо известна специалистам в данной области (см., например, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green T.W. et al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Вкратце, защитные группы в контексте настоящего изобретения представляют собой любую группу, которая снижает или устраняет нежелательную химическую активность функциональной группы. Защитную группу можно добавлять к функциональной группе для блокирования ее химической активности во время определенных реакций и затем удалять с открытием исходной функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления используют "защитную группу для спиртовой группы". "Защитная группа для спиртовой группы" представляет собой любую группу, которая уменьшает или устраняет нежелательную химическую активность спиртовой функциональной группы. Защитные группы можно добавлять и удалять при помощи методик, хорошо известных в данной области.

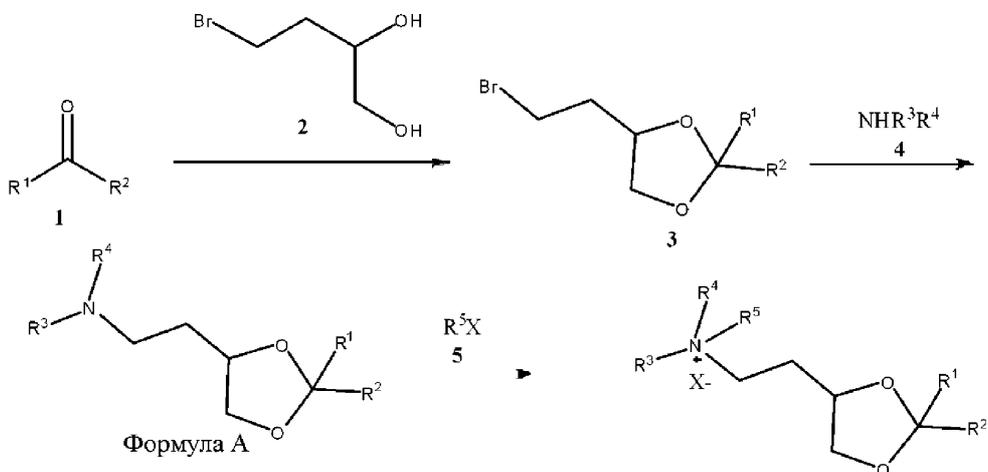
Синтез формулы А.

В некоторых вариантах осуществления частицы нуклеиновая кислота-липид согласно настоящему изобретению составляют при помощи катионного липида формулы А



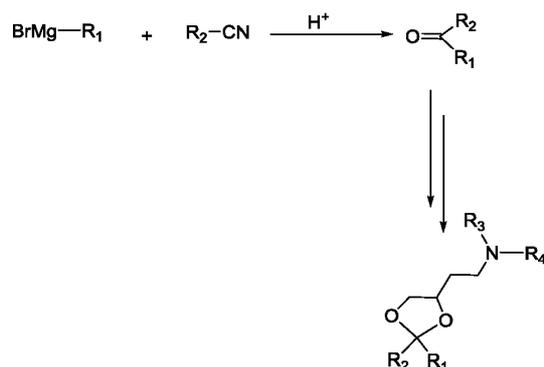
где  $R_1$  и  $R_2$  независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а  $R_3$  и  $R_4$  независимо представляют собой низший алкил или  $R_3$  и  $R_4$  могут, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой ХТС, (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан). Как правило, липид формулы А, приведенной выше, может быть получен в при помощи следующих схем реакций 1 или 2, где все заместители являются такими, как определено выше, если не указано иное.

Схема 1



Липид А, где  $R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а  $R^3$  и  $R^4$  независимо представляют собой низший алкил или  $R^3$  и  $R^4$  могут, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо, может быть получен согласно схеме 1. Кетон 1 и бромид 2 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кетала 3 с амином 4 дает липиды формулы А. Липиды формулы А можно превращать в соответствующую аммонийную соль при помощи органической соли формулы 5, где X представляет собой анион, противоион, выбранный из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата или т.п.

Схема 2



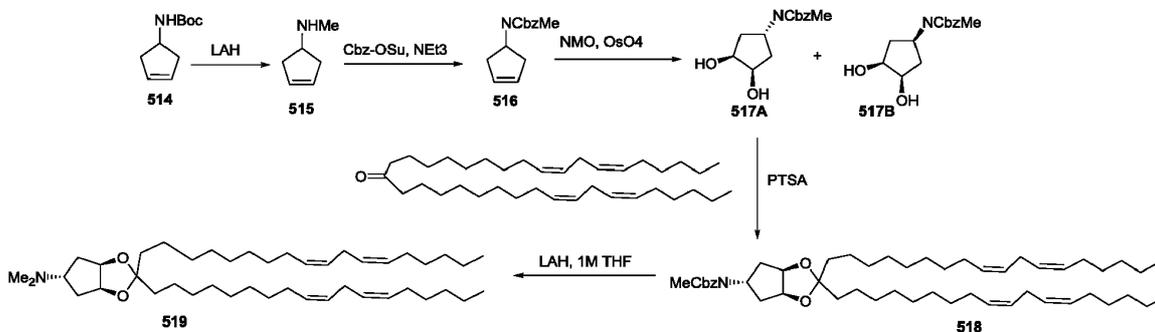
В качестве альтернативы, исходный материал, кетон 1, может быть получен согласно схеме 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 6 и 7 дает кетон 1. Превращение кетона 1 в соответствующие липиды формулы А является таким, как описано на схеме 1.

Синтез МСЗ.

Получение DLin-M-C3-DMA (т.е. (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноата) было следующим. Раствор (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ола (0,53 г), гидрохлорида 4-N,N-диметиламиномасляной кислоты (0,51 г), 4-N,N-диметиламинопиридина (0,61 г) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида (0,53 г) в дихлорметане (5 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Раствор промывали разбавленной хлористоводородной кислотой, за которой следовал разбавленный водный бикарбонат натрия. Органические фракции высушивали над безводным сульфатом магния, фильтровали и растворитель удаляли при помощи роторного вакуумного испарителя. Остаток проходил через колонку с силикагелем (20 г) с использованием градиента элюирования 1-5% метанол/дихлорметан. Фракции, содержащие очищенный продукт, объединяли и растворитель удаляли с получением бесцветного масла (0,54 г).

Синтез ALNY-100.

Синтез кетала 519 [ALNY-100] осуществляли с использованием следующей схемы 3:



### Синтез 515

К перемешиваемой суспензии  $\text{LiAlH}_4$  (3,74 г, 0,09852 моля) в 200 мл безводного THF в двугорлой RBF (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моля) в 70 мл THF при  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере азота. После завершения добавления реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до появления конденсации в течение 4 ч. Течение реакции контролировали при помощи TLC. После завершения реакции (определяли при помощи TLC) смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и гасили аккуратным добавлением насыщенного раствора  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали THF. Фильтрат и осадок, полученный при промывке, смешивали, и разводили 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl, и перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Летучие вещества отгоняли в вакууме с получением хлористоводородной соли 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г.  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO, 400 МГц):  $\delta = 9,34$  (широкий, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

Синтез 516.

К перемешанному раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двугорлой RBF добавляли  $\text{NEt}_3$  (37,2 мл, 0,2669 моля) и охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилоксикарбонил)сукцинимид (20 г, 0,08007 моль) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч, определяли при помощи TLC) смесь промывали последовательно раствором 1н. HCl (1×100 мл) и насыщенным раствором

NaHCO<sub>3</sub> (1×50 мл). Органический слой затем высушивали над безводн. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель выпаривали с получением неочищенного материала, который очищали при помощи колоночной хроматографии с силикагелем с получением 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%). <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц): δ = 7,36-7,27 (m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (br, 1H), 2,74 (s, 3H), 2,60 (m, 2H), 2,30-2,25 (m, 2H). LC-MS [M+H]<sup>+</sup> -232,3 (96,94%).

Синтез 517A и 517B.

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в однокоревой 500 мл RBF и к нему добавляли N-метилморфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), за которым следовали 4,2 мл 7,6% раствора OsO<sub>4</sub> (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~ 3 ч) смесь гасили при помощи добавления твердого Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь разводили DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), после чего следовал насыщенный раствор NaHCO<sub>3</sub> (1×50 мл), вода (1×30 мл) и в конце соляной раствор (1×50 мл). Органическую фазу высушивали над безводн. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель удаляли в вакууме. В результате очистки неочищенного материала при помощи колоночной хроматографии с силикагелем получали смесь диастереоизомеров, которые разделяли при помощи преп. HPLC. Выход: - 6 г неочищенного продукта. 517A - пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%). <sup>1</sup>H-ЯМР (DMSO, 400 МГц): δ = 7,39-7,31 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,48-4,47 (d, 2H), 3,94-3,93 (m, 2H), 2,71 (s, 3H), 1,72- 1,67 (m, 4H). LC-MS - [M+H]<sup>+</sup>-266,3, [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>-283,5 присутствует, HPLC-97,86%. Стереохимию подтверждали при помощи рентгенограммы.

Синтез 518.

При помощи процедуры, аналогичной описанной для синтеза соединения 505, соединение 518 (1,2 г, 41%) получали в виде бесцветного масла. <sup>1</sup>H-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>, 400 МГц): δ = 7,35-7,33 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 1H), 5,37-5,27 (m, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,58-4,57 (m, 2H), 2,78-2,74 (m, 7H), 2,06-2,00 (m, 8H), 1,96-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,37-1,25 (br m, 36H), 0,87 (m, 6H). HPLC-98,65%.

Общая процедура для синтеза соединения 519.

Раствор соединения 518 (1 экв.) в гексане (15 мл) добавляли по каплям к охлажденному на льду раствору ЛАН в THF (1M, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при 40°C в течение 0,5 ч, затем охлаждали опять на ледяной бане. Смесь аккуратно гидролизуют насыщенным водным Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, затем фильтровали через целит и переводили в масло. С помощью колоночной хроматографии получали чистое 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла. <sup>13</sup>C-ЯМР δ=130,2, 130,1 (×2), 127,9 (×3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (×2), 29,7, 29,6 (×2), 29,5 (×3), 29,3 (×2), 27,2 (×3), 25,6, 24,5, 23,3, 22,6, 14,1; электрораспыление MS (+ve): молекулярный вес для C<sub>44</sub>H<sub>80</sub>NO<sub>2</sub> (M + H)<sup>+</sup> вычисл. 654,6, обнаруженный 654,6.

Составы, полученные либо при помощи стандартного способа, либо при помощи способа без экстракции, можно характеризовать одинаковым образом. Например, составы, как правило, характеризуют при помощи визуального осмотра. Это должны быть белесые прозрачные растворы, в которых нет агрегатов или осадка. Размер частиц и распределение частиц по размеру липидных наночастиц можно измерять при помощи рассеяния света, используя, например, Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, США). Размер частиц должны быть примерно 20-300 нм, например 40-100 нм. Распределение частиц по размеру должно быть одновершинным. Общую концентрацию dsRNA в составе, а также захваченную фракцию определяют при помощи анализа на исключение красителя. Образец составленной dsRNA можно инкубировать со связывающимся с РНК красителем, например Ribogreen (Molecular Probes), в присутствии или при отсутствии разрушающего состав поверхностно-активного вещества, например 0,5% Triton-X100. Общую dsRNA в составе можно определять по сигналу от образца, содержащего поверхностно-активное вещество, по отношению к калибровочной кривой. Захваченную фракцию определяют путем вычитания содержания "свободной" dsRNA (которое измерено по сигналу при отсутствии поверхностно-активного вещества) из общего содержания dsRNA. Процент захваченной dsRNA, как правило, составляет >85%. Для состава LNP размер частиц составляет по меньшей мере 30 нм, по меньшей мере 40 нм, по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере 60 нм, по меньшей мере 70 нм, по меньшей мере 80 нм, по меньшей мере 90 нм, по меньшей мере 100 нм, по меньшей мере 110 нм и по меньшей мере 120 нм. Подходящий диапазон, как правило, составляет от примерно по меньшей мере 50 нм до примерно по меньшей мере 110 нм, от примерно по меньшей мере 60 нм до примерно по меньшей мере 100 нм или от примерно по меньшей мере 80 нм до примерно по меньшей мере 90 нм.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или неводной среде, капсулы, желатиновые капсулы, пакетики с порошком для приготовления раствора, таблетки или минитаблетки. Могут быть необходимы загустители, ароматизирующие вещества, разбавители, эмульгаторы, диспергирующие средства или связующие вещества. В некоторых вариантах осуществления пероральные составы являются такими, в которых dsRNA, описанные в настоящем изобретении, вводятся в сочетании с одним или несколькими веществами, способствующими проникновению, поверхностно-активными веществами и хелаторами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли,

желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксихоленозидоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, таурозидоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают полиоксисетилен-9-лауриловый эфир, полиоксисетилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе распыляемых высушенных частиц, или образуют комплексы с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают поли-аминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, полидиэтиламинометилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислоты (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG). Пероральные составы для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, публикации США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), подоболовечного, интравентрикулярного или внутривенного введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие соответствующие добавки, такие как, без ограничения, вещества, способствующие проникновению, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или наполнители.

Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению включают, без ограничения, растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Такие композиции могут быть получены из ряда компонентов, который включает, без ограничения, предварительно полученные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. В частности, предпочтительными являются составы, которые целенаправленно воздействуют на печень при лечении заболеваний печени, таких как гепатокарцинома.

Фармацевтические составы согласно настоящему изобретению, которые в целях удобства могут находиться в виде единичной лекарственной формы, можно получать согласно традиционным методикам, хорошо известным в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию приведения активных ингредиентов во взаимодействие с фармацевтическим(фармацевтическими) носителем(носителями) или наполнителем(наполнителями). Как правило, составы получают путем равномерного и тщательного приведения активных ингредиентов во взаимодействие с жидкими носителями или мелкоизмельченными твердыми носителями или теми, и другими, а затем, при необходимости, придания продукту формы.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть составлены в любой из многих возможных лекарственных форм, как, например, без ограничения, таблетки, капсулы, желатиновые капсулы, жидкие сиропы, пластичные гели, суппозитории и клизмы. Композиции согласно настоящему изобретению также могут быть составлены в виде суспензий в водной, неводной или смешанной среде. Водные суспензии дополнительно могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

#### C. Дополнительные составы.

##### Эмульсии.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, являются гетерогенными системами одной жидкости, диспергированной в другой, в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0,1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and

Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является мелкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы, в тех случаях, когда масляная фаза является мелкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты вдобавок к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе либо как таковое в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, такие как, например, в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии o/w включают маленькие водные капельки, составляющие эмульсию w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию o/w/o.

Эмульсии характеризуются малой термодинамической устойчивостью, или она у них отсутствует. Часто диспергированная или дисперсная фаза эмульсии хорошо диспергирована в дисперсионной или диспергирующей фазе и поддерживается в такой форме при помощи эмульгаторов или вязкости состава. Любая фаза эмульсии может быть полутвердой или твердой, как и в случае мазевых основ, подобных эмульсии, и кремов. Другие способы стабилизации эмульсий охватывают применение эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. Эмульгаторы в целом могут быть классифицированы на четыре категории: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбционные базы и высокодисперсные твердые вещества (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> ed.), New York, NY; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Синтетические поверхностно-активные вещества, также известные как сурфактанты, нашли широкое применение в составе эмульсий, и их рассматривали в литературе (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> ed.), New York, NY; Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Поверхностно-активные вещества обычно являются амфифильными и содержат гидрофильную и гидрофобную часть. Соотношение гидрофильной и гидрофобной природы поверхностно-активного вещества называют гидролипидным балансом (HLB), и оно является ценным инструментом в распределении на категории и выборе поверхностно-активных веществ при получении составов. Поверхностно-активные вещества можно классифицировать на различные классы, исходя из природы гидрофильной группы: неионные, анионные, катионные и амфотерные (см., например, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>th</sup> ed.), New York, NY; Rieger, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Встречающиеся в природе эмульгаторы, используемые в составах эмульсий, включают ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и гуммиарабик. Абсорбционные базы, такие как безводный ланолин и гидрофильный вазелин, обладают гидрофильными свойствами, так что они могут впитывать воду с образованием эмульсий w/o, тем не менее сохраняя свою полутвердую консистенцию. Мелкоизмельченные твердые вещества также использовали в качестве подходящих эмульгаторов в особенности в комбинации с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Они включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, неразбухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный алюмосиликат магния, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как углерод или глицерилат тристеарат.

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в составы эмульсий и вносят вклад в свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, жирные сложные эфиры, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в

Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильные коллоиды или гидроколлоиды включают встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, гуммиарабик, агар, альгиновую кислоту, каррагенан, гуаровую камедь, камедь карайи и трагакант), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксипропилцеллюлозу) и синтетические полимеры (например, карбомеры, простые эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Они диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсии путем образования крепких межфазных пленок вокруг капелек диспергированной фазы и путем повышения вязкости дисперсионной фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат некоторое количество ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут легко поддерживать рост микробов, то такие составы часто включают консерванты. Широко используемые консерванты, включенные в составы эмульсий, включают метилпарабен, пропилпарабен, четвертичные соли аммония, бензалкония хлорид, сложные эфиры р-гидроксibenзойной кислоты и борную кислоту. Антиоксиданты также обычно добавляют к составам эмульсий для предупреждения разрушения состава. Используемые антиоксиданты могут быть ловушками свободных радикалов, как, например, токоферолы, алкил галлаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановителями, такими как аскорбиновая кислота и матабисульфит натрия, и синергистами антиоксидантов, такими как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение составов эмульсий посредством дерматологического, перорального и парентерального путей и способы их получения были рассмотрены в литературе (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Составы эмульсий для пероральной доставки очень широко применяют из-за удобства составления, а также с позиции эффективности при абсорбции и биодоступности (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные средства на основе минеральных масел, жирорастворимые витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира находятся среди материалов, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий o/w.

#### ii. Микроэмульсии.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения композиции иРНК и нуклеиновые кислоты составлены в виде микроэмульсий. Микроэмульсия может быть определена как система воды, масла и амфифильного вещества, которая является отдельным оптически изотропным и термодинамически устойчивым жидким раствором (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии являются системами, которые получают путем сперва диспергирования масла в водном растворе поверхностно-активного вещества, а затем добавления достаточного количества четвертого компонента, как правило, спирта со средней длиной цепи для образования прозрачной системы. Таким образом, микроэмульсии также были описаны как термодинамически устойчивые, изотропически чистые дисперсии двух несмешиваемых жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, pages 185-215). Микроэмульсии обычно получают путем объединения от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. То, является ли микроэмульсия эмульсией по типу "вода в масле" (w/o) или по типу "масло в воде" (o/w), зависит от свойств используемого масла и поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных головок и углеводородных хвостов молекул поверхностно-активного вещества (Schott, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Активно изучался феноменологический подход с использованием фазовой диаграммы, и с его помощью специалистами в данной области были получены обширные данные о том, как составлять микроэмульсии (см., например, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению с традиционными эмульсиями микроэмульсии предлагают преимущество стабилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически устойчивых капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают, без ограничения, ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиглицилолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации со вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно спирт с короткой цепью, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и, таким образом, создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения вторичных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать, без ограничения, материалы, такие как Captex 300, Captex 355, Carmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиглицилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерила, жирные спирты, полиглицеринизированные глицериды, насыщенные полиглицеринизированные C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения растворимости лекарственного средства и повышенной абсорбции лекарственных средств. Липидные микроэмульсии (как o/w, так и w/o) были предложены для увеличения пероральной биодоступности лекарственных средств, включая пептиды (см., например, патент США № 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Микроэмульсии обеспечивают преимущества в виде улучшенной растворимости лекарственного средства, защиты лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможного увеличения абсорбции лекарственного средства за счет индуцированных поверхностно-активным веществом изменений текучести мембран и проницаемости, удобства получения, удобства перорального введения по сравнению с твердой лекарственной формой, улучшенная клиническая действенность и пониженная токсичность (см., например, патент США № 6191105; 7063860; 7070802; 7157099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Часто микроэмульсии могут образовываться самопроизвольно, когда их компоненты объединяют при температуре окружающего воздуха. Это может быть в особенности преимущественным, когда составляют термолабильные лекарственные средства, пептиды или иРНК. Микроэмульсии также были эффективными при трансдермальной доставке активных компонентов как при косметических, так и при фармацевтических применениях. Предполагается, что композиции и составы микроэмульсий согласно настоящему изобретению будут способствовать повышенной системной абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также улучшать локальное клеточное поглощение иРНК и нуклеиновых кислот.

Микроэмульсии согласно настоящему изобретению также могут содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как сорбитанмоностеарат (Grill 3), Labrasol и вещества, способствующие проникновению, для улучшения свойств состава и для повышения абсорбции иРНК и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению. Вещества, способствующие проникновению, используемые в микроэмульсиях согласно настоящему изобретению, могут классифицироваться, как принадлежащие одной из пяти основных категорий: поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие неповерхностно-активные вещества (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждый из этих классов рассматривался выше.

#### iii. Микрочастицы.

Средство для RNAi согласно настоящему изобретению может быть включено в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы можно получать при помощи сушки распылением, но также можно получать другими способами, в том числе лиофилизацией, выпариванием, сушкой в псевдосжиженном слое, сушкой в вакууме или при помощи комбинации этих методик.

#### iv. Вещества, способствующие проникновению.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении применяют разнообразные вещества, способствующие проникновению, для воздействия на эффективную доставку нуклеиновых кислот, в частности иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств присутствуют в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако, как правило, только жирорастворимые или липофильные лекарственные средства легко проходят через клеточные мембраны. Было установлено, что даже нелипофильные лекарственные средства могут проходить через клеточные мембраны, если мембрана, через которую необходимо пройти, обработана веществом, способствующим проникновению. Вдобавок к обеспечению диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Вещества, способствующие проникновению, можно классифицировать как принадлежащие одной

из пяти основных категорий, т.е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатирующие средства и нехелатирующие неповерхностно-активные вещества (см., например, Malmsten M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Каждый из вышеуказанных классов веществ, способствующих проникновению, описан ниже более подробно.

Поверхностно-активные вещества (или "сурфактанты") являются химическими структурными единицами, которые при растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего абсорбция иРНК через слизистую повышается. Вдобавок к солям желчных кислот и жирным кислотам, эти вещества, способствующие проникновению, включают, например, лаурилсульфат натрия, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир и полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир (см., например, Malmsten M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92) и перфторированные эмульсии, такие как FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C<sub>1-20</sub>алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, миистат, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.). (см., например, Touitou E., et al., *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи включает содействие в распределении и абсорбции липидов и жирорастворимых витаминов (см., например, Malmsten M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, Chapter 38 in: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al., Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Разные природные соли желчных кислот и их синтетические производные действуют как вещества, способствующие проникновению. Таким образом, выражение "соли желчных кислот" включают любые встречающиеся в природе компоненты желчи, а также любое из их синтетических производных. Подходящие соли желчных кислот включают, например, холевую кислоту (или ее фармацевтически приемлемую натриевую соль, холат натрия), дегидрохолевую кислоту (дегидрохолат натрия), дезоксихолевую кислоту (дезоксихолат натрия), глюхолевую кислоту (глюхолат натрия), глихолевую кислоту (глихолат натрия), гликодезоксихолевую кислоту (гликодезоксихолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксихолевую кислоту (тауродезоксихолат натрия), хенодезоксихолевую кислоту (хенодезоксихолат натрия), урсодезоксихолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат (STDHF) натрия, гликодигидрофузидат натрия и полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир (POE) (см., например, Malmsten M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Swinyard, Chapter 39 In: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>th</sup> Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, pages 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

Хелатирующие средства, используемые применительно к настоящему изобретению, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металла из раствора путем образования комплексов с ними, в результате чего абсорбция иРНК через слизистую повышается. В отношении их применения в качестве веществ, способствующих проникновению, в настоящем изобретении хелатирующие средства обладают дополнительным преимуществом, также выступая в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку большинство охарактеризованных ДНК-нуклеаз требуют двухвалентный ион металла для катализа и, таким образом, ингибируются хелатирующими средствами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатирующие средства включают, без ограничения, двунариевый этилендиаминтетраацетат (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомовалинат), N-ацилпроизводные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацилпроизводные β-дикетонов (енамины) (см., например, Katdare A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Используемые в данном документе нехелатирующие неповерхностно-активные соединения, способствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию иРНК через слизистую пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способ-

ствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацикло-алканона (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые усиливают поглощение иРНК на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям согласно настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al., патент США №5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка РСТ WO 97/30731), также, как известно, усиливают клеточное поглощение dsRNA. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMRIE-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass<sup>a</sup> D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, USA), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Для усиления проникновения введенных нуклеиновых кислот можно использовать другие средства, в том числе гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

#### v. Носители.

Определенные композиции согласно настоящему изобретению также содержат в составе соединения-носители. Используемые в данном документе выражения "соединение-носитель" или "носитель" могут означать нуклеиновую кислоту или ее аналог, которые являются инертными (т.е. не обладают биологической активностью *per se*), но распознаются в качестве нуклеиновой кислоты *in vivo* процессами, которые снижают биодоступность нуклеиновой кислоты с биологической активностью, например, путем разрушения биологически активной нуклеиновой кислоты или путем содействия ее удалению из кровотока. Совместное введение нуклеиновой кислоты и соединения-носителя, обычно с избытком последнего вещества, может привести к существенному сокращению количества нуклеиновой кислоты, перерабатываемой печенью, почками или другими внесосудистыми депо, предположительно вследствие конкуренции между соединением-носителем и нуклеиновой кислотой за общий рецептор. Например, переработка частично фосфотиоатной dsRNA в ткани печени может быть снижена при ее совместном введении с полиинозиновой кислотой, сульфатом декстрана, полицитидиновой кислотой или 4-ацетамидо-4'изотиоциано-стильбен-2,2'-дисульфокислотой (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

#### vi. Наполнители.

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертную среду для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым, и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения с тем, чтобы обеспечить необходимый объем, консистенцию и т.д., при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Типичные фармацевтические носители включают, без ограничения, связывающие средства (например, прежелатинизированный мансовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или вторичный кислый фосфат кальция и т.д.); смазы-

вающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металла, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); разрыхлители (например, крахмал, натрия крахмалгликолат и т.д.) и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не реагируют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами, также можно применять для составления композиций согласно настоящему изобретению. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п.

Составы для местного применения нуклеиновых кислот могут включать стерильные и нестерильные водные растворы, неводные растворы в обычных растворителях, таких как спирты, или растворы нуклеиновых кислот в жидких или твердых масляных основах. Растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Можно использовать фармацевтически приемлемые органические или неорганические наполнители, подходящие для введения, отличного от парентерального, которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновыми кислотами.

Подходящие фармацевтически приемлемые наполнители включают, без ограничения, воду, солевые растворы, спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и т.п. vii. Другие компоненты.

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, традиционно встречающиеся в фармацевтических композициях, при уровнях применения, установленных в данной области. Таким образом, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, или могут содержать дополнительные материалы, пригодные для физического составления композиций согласно настоящему изобретению в различных лекарственных формах, такие как красители, ароматизирующие вещества, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы. Однако такие материалы при добавлении не должны чрезмерно вступать в конфликт с биологическими активностями компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Составы могут быть стерильными и, при необходимости, их можно смешивать со вспомогательными средствами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими средствами, эмульгаторами, солями для оказания влияния на осмотическое давление, буферами, красящими веществами, ароматизаторами и/или душистыми веществами и т.п., которые не взаимодействуют неблагоприятным образом с нуклеиновой(нуклеиновыми) кислотой(кислотами) состава.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в настоящем изобретении, включают (a) одно или несколько соединений, представляющих собой иРНК, и (b) одно или несколько средств, которые действуют по механизму, отличному от RNAi, и которые пригодны в лечении нарушения свертываемости крови. Примеры таких средств включают, без ограничения, противовоспалительное средство, средства против стеатоза, противовирусное средство и/или средство против фиброза. Кроме того, другие вещества, обычно используемые для защиты печени, такие как силимарин, также можно использовать в сочетании с иРНК, описанными в данном документе. Другие средства, пригодные для лечения заболеваний печени, включают телбивудин, энтекавир и ингибиторы протеазы, такие как теллапревир и другие, раскрытые, например, в публикациях заявок на патент США № 2005/0148548, 2004/0167116 и 2003/0144217, Tung et al., и в публикации заявки на патент США № 2004/0127488, Hale et al.

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например для определения LD<sub>50</sub> (дозы, летальной для 50% популяции) и ED<sub>50</sub> (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсичным и терапевтическим действием является терапевтическим индексом, и его можно выражать как соотношение LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные при анализах клеточных культур и исследованиях на животных, можно использовать при составлении ряда доз для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, описанных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих концентраций, который включают ED<sub>50</sub> с малой токсичностью или без таковой. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов клеточных культур. Доза может быть составлена для животных моделей для получения диапазона концентрации циркулирующего в плазме соединения или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности

(например, достижения уменьшенной концентрации полипептида), что включает  $IC_{50}$  (т.е. концентрацию исследуемого соединения, при помощи которой достигают полумаксимальное ингибирование симптомов), как устанавливают в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодной дозы у людей. Уровни в плазме можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, рассматриваемому выше, иРНК, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией PCSK9. В любом случае курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения иРНК, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

#### IV. Способы ингибирования экспрессии PCSK9.

Настоящее изобретение предусматривает способы ингибирования экспрессии пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством для RNAi, например двухцепочечным средством для RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке, ингибируя, таким образом, экспрессию PCSK9 в клетке.

Приведение клетки в контакт с двухцепочечным средством для RNAi можно выполнять *in vitro* или *in vivo*. *In vivo* приведение клетки в контакт со средством для RNAi включает приведение клетки или группы клеток субъекта, например субъекта-человека, в контакт со средством для RNAi. Также возможны комбинации *in vitro* и *in vivo* способов приведения в контакт. Приведение в контакт может быть непосредственным или опосредованным, как рассматривалось выше. Более того, приведение в контакт клетки можно выполнять посредством нацеливающего лиганда, в том числе любого лиганда, описанного в данном документе или известного в данной области. В предпочтительных вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводный фрагмент, например лиганд, представляющий собой GalNAc3, или любой другой лиганд, который направляет средство для RNAi к месту, представляющему интерес, например, печени субъекта.

Выражение "ингибирование", используемое в данном документе, используют взаимозаменяемо с "сокращением", "сайленсингом", "понижающей регуляцией" и другими подобными выражениями, и оно включает любой уровень ингибирования.

Подразумевают, что фраза "ингибирование экспрессии PCSK9" означает ингибирование экспрессии любого гена PCSK9 (такого как, например, ген PCSK9 мыши, ген PCSK9 крысы, ген PCSK9 обезьяны или ген PCSK9 человека), а также вариантов или мутантов гена PCSK9. Таким образом, ген PCSK9 может быть геном PCSK9 дикого типа, мутантным геном PCSK9 или трансгенным геном PCSK9 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена PCSK9" включает любой уровень ингибирования гена PCSK9, например, по меньшей мере, частичную супрессию экспрессии гена PCSK9. Экспрессию гена PCSK9 можно оценивать, исходя из уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена PCSK9, например уровня мРНК PCSK9, уровня белка PCSK9 или уровней липидов. Данный уровень можно оценивать в отдельной клетке или в группе клеток, в том числе, например, образце, полученном от субъекта.

Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких переменных, которые связаны с экспрессией PCSK9, по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например, исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению экспрессия гена PCSK9 ингибируется по меньшей мере примерно на 5%, по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 15%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 35%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 45%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 55%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 65%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 75%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 91%, по меньшей мере примерно на 92%, по меньшей мере примерно на 93%, по меньшей мере примерно на 94%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии гена PCSK9 может служить снижение количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или первой группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется ген PCSK9 и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством для RNAi согласно настоящему изобретению или посредством введения средства для RNAi согласно на-

стоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились), так что экспрессия гена PCSK9 ингибируется по сравнению со второй клеткой или второй группой клеток, по сути, идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не обрабатывали (контрольная(ые) клетка(и)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают посредством выражения уровня мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

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

В альтернативном случае, ингибирование экспрессии гена PCSK9 можно оценивать по снижению показателя, который функционально связан с экспрессией гена PCSK9, например экспрессией белка PCSK9, к примеру уровней липидов, уровней холестерина, например уровней LDLc. Сайленсинг гена PCSK9 можно выявить в любой клетке, экспрессирующей PCSK9 либо конститутивно, либо при помощи генной инженерии, и с помощью любого анализа, известного в данной области. Печень является основным местом экспрессии PCSK9. Другие важные места экспрессии включают поджелудочную железу, почку и кишечник.

Доказательством ингибирования экспрессии белка PCSK9 может служить снижение уровня белка PCSK9, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше в отношении оценки супрессии мРНК, ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе обработанных клеток можно аналогично выражать как процент от уровня белка в контрольной клетке или группе контрольных клеток.

Контрольная клетка или группа контрольных клеток, которые можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена PCSK9, включают клетку или группу клеток, которые еще не были в контакте со средством для RNAi согласно настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа контрольных клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, субъекта-человека или субъекта-животного) перед лечением субъекта средством для RNAi.

Уровень мРНК PCSK9, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять при помощи любого способа, известного в данной области, для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии PCSK9 в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например мРНК гена PCSK9. РНК можно извлекать из клеток при помощи методик извлечения РНК, включая, например, извлечение с помощью кислого фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen) или RAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы защиты от РНКаз (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию in situ и микроматричные анализы.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии PCSK9 определяют при помощи зонда для нуклеиновой кислоты. Выражение "зонд", используемое в данном документе, означает любую молекулу, которая способна селективно связываться со специфическим PCSK9. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Могут быть особым образом сконструированы зонды, содержащие метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, без ограничения, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенные мРНК можно использовать при анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают, без ограничения, анализы, представляющие собой саузерн- или нозерн-блоттинг, анализы, представляющие собой полимеразную цепную реакцию (PCR), и матрицы с зондами. Один способ определения уровней мРНК включает приведение выделенной мРНК в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК PCSK9. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например путем пропускания выделенной мРНК через агарозный гель и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например, на генном микрочипе Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы обнаружения мРНК для применения в определении уровней мРНК PCSK9.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии PCSK9 в образце включает способ амплификации нуклеиновой кислоты и/или обратной транскрипции (с получением кДНК) например, мРНК в образце, например, при помощи RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен в Mullis, 1987, патенте 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), транскрипционно-опосредованной амплификационной системы (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), Q-β репликазы (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033), или любой

другой способ амплификации нуклеиновой кислоты, за которым следует обнаружение амплифицированных молекул при помощи методик, хорошо известных специалисту в данной области. Такие схемы обнаружения особенно пригодны для обнаружения молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах согласно настоящему изобретению уровни экспрессии PCSK9 определяют при помощи флуорогенной RT-PCR (т.е. системы TaqMan™ System).

Уровни экспрессии мРНК PCSK9 можно контролировать при помощи мембранного блота (как, например, используемого при анализе гибридизации, такого как нозерн, саузерн, дот и т.п.) или микролунок, опытных пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанную нуклеиновую кислоту). См. патенты США № 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ при помощи ссылки. Определение уровня экспрессии PCSK9 также может включать использование зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с использованием анализов с разветвленной ДНК (bDNA) или PCR в режиме реального времени (qPCR). Применение таких способов описано и проиллюстрировано в разделе "Примеры", представленном в данном документе.

Уровень экспрессии белка PCSK9 можно определить, используя любой способ, известный в данной области для измерения уровня белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлюоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т.п.

Выражение "образец", используемое в данном документе, означает отбор похожих жидкостей, клеток или тканей, выделенных из организма субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, присутствующих в организме субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, лимфу, мочу, спинномозговую жидкость, слюну, внутриглазные жидкости и т.п. Образцы тканей могут включать образцы из тканей, органов или локальных участков. Например, образцы можно получить из конкретных органов, частей органов или жидкостей или клеток в этих органах. В определенных вариантах осуществления образцы можно получить из печени (например, всей печени, или определенных сегментов печени, или определенных типов клеток в печени, таких как, например, гепатоциты). В предпочтительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает кровь или плазму, полученные от субъекта. В дополнительных вариантах осуществления "образец, полученный от субъекта" означает ткань печени, полученную от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению средство для RNAi вводят субъекту так, что средство для RNAi доставляется к конкретному месту в организме субъекта. Ингибирование экспрессии PCSK9 можно оценивать при помощи измерений уровня или изменения уровня мРНК PCSK9 или белка PCSK9 в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного места в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления местом является печень. Местом также может быть подсеция или подгруппа клеток из любого из указанных выше мест. Место также может включать клетки, которые экспрессируют конкретный тип рецептора.

#### V. Способы лечения или предупреждения ассоциированного с PCSK9 заболевания.

Настоящее изобретение также предусматривает способы лечения или предупреждения заболеваний и состояний, на которые можно воздействовать путем понижающей регуляции экспрессии гена PCSK9. Например, композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения липидемии, например гиперлипидемии, и других форм нарушения баланса липидов, таких как гиперхолестеринемия, гипертриглицеридемия, и патологических состояний, ассоциированных с этими нарушениями, таких как болезни сердца и болезни, протекающие с расстройством кровообращения. Другие заболевания и состояния, на которые можно воздействовать путем понижающей регуляции экспрессии гена PCSK9, включают лизосомную болезнь накопления, в том числе, без ограничения, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Тея-Сакса, дефицит лизосомальной кислой липазы и болезнь Гоше. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества или профилактически эффективного количества средства для RNAi согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение эффективного количества siRNA PCSK9 пациенту с гетерозиготным LDLR-генотипом.

Эффект снижения экспрессии гена PCSK9 предпочтительно приводит к снижению уровней LDLc (холестерина липопротеинов низкой плотности) в крови и, более конкретно, в сыворотке млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления уровни LDLc снижаются по меньшей мере на 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более по сравнению с уровнями перед обработкой.

Используемое в данном документе выражение "субъект" включает человека или отличного от человека животного, предпочтительно позвоночного и более предпочтительно млекопитающего. Субъект может включать трансгенный организм. Наиболее предпочтительно, субъектом является человек, как, например, человек, страдающий от ассоциированного с PCSK9 заболевания или предрасположенный к

его развитию.

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению экспрессия PCSK9 снижается в течение длительного отрезка времени, например по меньшей мере одной недели, двух недель, трех недель, или четырех недель, или дольше. Например, в некоторых случаях экспрессия гена PCSK9 подавляется по меньшей мере примерно на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% путем введения средства, представляющего собой иРНК, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ген PCSK9 подавляется по меньшей мере на примерно 60, 70 или 80% путем введения средства, представляющего собой иРНК. В некоторых вариантах осуществления ген PCSK9 подавляется по меньшей мере примерно на 85, 90 или 95% путем введения двухцепочечного олигонуклеотида.

Средства для RNAi согласно настоящему изобретению можно вводить субъекту при помощи любого способа введения, известного в данной области, в том числе, без ограничения, подкожного, внутривенного, внутримышечного, внутриглазного, внутрибронхиального, внутриплеврального, внутрибрюшинного, внутриартериального, лимфатического, спинномозгового и любых их комбинаций. В предпочтительных вариантах осуществления средства вводят подкожно.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством инъекции вещества замедленного всасывания. Инъекция вещества замедленного всасывания может высвобождать средство для RNAi устойчивым образом в течение длительного периода времени. Таким образом, при помощи инъекции вещества замедленного всасывания можно снижать частоту введения доз, необходимых для получения необходимого действия, например необходимого ингибирования PCSK9, или терапевтического или профилактического действия. Инъекция вещества замедленного всасывания может также предусматривать более устойчивые концентрации в сыворотке. Инъекции вещества замедленного всасывания могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция вещества замедленного всасывания является подкожной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют посредством насоса. Насос может быть внешним насосом или имплантированным хирургическим путем насосом. В определенных вариантах осуществления насос является подкожно имплантированным осмотическим насосом. В других вариантах осуществления насос является инфузионным насосом. Инфузионный насос можно применять для внутривенных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос является подкожным инфузионным насосом. В других вариантах осуществления насос является имплантируемым хирургическим путем насосом, который доставляет средство для RNAi в печень.

Другие способы введения включают эпидуральное, внутричерепное, интрацеребровентрикулярное, назальное введение, внутриартериальное, внутрисердечное, внутрикостную инфузию, подоболочечное, и интравитреальное, и легочное. Способ введения можно выбрать, исходя из того, необходимо местное или системное лечение, и исходя из области, которая подлежит лечению. Путь и место введения можно выбрать для увеличения нацеленного воздействия.

Способ включает введение средства, представляющего собой иРНК, например, дозы, достаточной для понижения уровней мРНК PCSK9 в течение по меньшей мере 5, более предпочтительно 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней; и необязательно введение второй разовой дозы dsRNA, где вторую разовую дозу вводят по меньшей мере через 5, более предпочтительно 7, 10, 14, 21, 25, 30 или 40 дней после введения первой разовой дозы, ингибируя, таким образом, экспрессию гена PCSK9 у субъекта.

В одном варианте осуществления дозы средства, представляющего собой иРНК, согласно настоящему изобретению вводят не более одного раза каждые четыре недели, не более одного раза каждые три недели, не более одного раза каждые две недели или не более одного раза каждую неделю. В другом варианте осуществления введения могут продолжаться в течение одного, двух, трех или шести месяцев, или одного года, или дольше.

В другом варианте осуществления введение может предусматриваться, когда уровни холестерина липопротеинов низкой плотности (LDLc) достигают или превосходят предопределенный минимальный уровень, как, например, более 70, 130, 150, 200, 300 или 400 мг/дл.

Как правило, средство, представляющее собой иРНК, не активизирует иммунную систему, например, оно не повышает уровни цитокинов, как, например, уровни TNF- $\alpha$  или IFN- $\alpha$ . Например, при измерении при помощи анализов, таких как анализ PBMC *in vitro*, как, например, описано в данном документе, повышение уровней TNF- $\alpha$  или IFN- $\alpha$  составляет менее 30, 20 или 10% от уровня в контрольных клетках, обработанных контрольной dsRNA, такой как dsRNA, которая не нацелена на PCSK9.

Например, субъекту можно вводить терапевтическое количество средства, представляющего собой иРНК, как, например, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 или 2,5 мг/кг dsRNA. Средство, представляющее собой иРНК, можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, как, например, в течение периода 5, 10, 15, 20 или 25 мин. Введение повторяют, например, регулярно, как, например, раз в две недели (т.е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После первичного режима обработки обработки можно вводить менее часто. Например, после введения раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в

течение шести месяцев, или года, или дольше. Введение средства, представляющего собой иРНК, может снижать уровни PCSK9, например, в клетке, ткани, крови, моче или другой части организма пациента, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% или более.

Перед введением полной дозы средства, представляющего собой иРНК, пациентам можно вводить меньшую дозу, как, например, на 5% инфузионной реакции, и наблюдать их в отношении отрицательного действия, как, например, аллергических реакций или в отношении повышения уровней липидов или кровяного давления. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательного иммуностимулирующего действия, как, например, повышения уровней цитокина (например, TNF- $\alpha$  или INF- $\alpha$ ).

Эффект лечения или предупредительное действие очевидны, когда наблюдается статистически значимое улучшение одного или нескольких показателей болезненного состояния, или по отсутствию усугубления или развития симптомов в тех случаях, когда их, при иных обстоятельствах, прогнозировали. В качестве примера, благоприятное изменение измеряемого показателя заболевания по меньшей мере на 10% и предпочтительно по меньшей мере на 20, 30, 40, 50% или более может служить признаком эффективного лечения. Об эффективности для данного средства, представляющего собой иРНК, согласно настоящему изобретению или состава такого средства, представляющего собой иРНК, можно также судить при помощи экспериментальной животной модели для данного заболевания, которая известна в данной области. При использовании экспериментальной животной модели, эффективность лечения доказана, если наблюдают статистически значимое снижение маркера или уменьшение симптома.

В одном варианте осуществления средство для RNAi вводят в дозе от примерно 0,25 мг/кг до примерно 50 мг/кг, например от примерно 0,25 мг/кг до примерно 0,5 мг/кг, от примерно 0,25 мг/кг до примерно 1 мг/кг, от примерно 0,25 мг/кг до примерно 5 мг/кг, от примерно 0,25 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 10 мг/кг, от примерно 5 мг/кг до примерно 15 мг/кг, от примерно 10 мг/кг до примерно 20 мг/кг, от примерно 15 мг/кг до примерно 25 мг/кг, от примерно 20 мг/кг до примерно 30 мг/кг, от примерно 25 мг/кг до примерно 35 мг/кг или от примерно 40 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в дозе примерно 0,25 мг/кг, примерно 0,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 2 мг/кг, примерно 3 мг/кг, примерно 4 мг/кг, примерно 5 мг/кг, примерно 6 мг/кг, примерно 7 мг/кг, примерно 8 мг/кг, примерно 9 мг/кг, примерно 10 мг/кг, примерно 11 мг/кг, примерно 12 мг/кг, примерно 13 мг/кг, примерно 14 мг/кг, примерно 15 мг/кг, примерно 16 мг/кг, примерно 17 мг/кг, примерно 18 мг/кг, примерно 19 мг/кг, примерно 20 мг/кг, примерно 21 мг/кг, примерно 22 мг/кг, примерно 23 мг/кг, примерно 24 мг/кг, примерно 25 мг/кг, примерно 26 мг/кг, примерно 27 мг/кг, примерно 28 мг/кг, примерно 29 мг/кг, 30 мг/кг, примерно 31 мг/кг, примерно 32 мг/кг, примерно 33 мг/кг, примерно 34 мг/кг, примерно 35 мг/кг, примерно 36 мг/кг, примерно 37 мг/кг, примерно 38 мг/кг, примерно 39 мг/кг, примерно 40 мг/кг, примерно 41 мг/кг, примерно 42 мг/кг, примерно 43 мг/кг, примерно 44 мг/кг, примерно 45 мг/кг, примерно 46 мг/кг, примерно 47 мг/кг, примерно 48 мг/кг, примерно 49 мг/кг или примерно 50 мг/кг. В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят в дозе примерно 25 мг/кг.

Доза средства для RNAi, которую вводят субъекту, может быть подобрана с уравниванием риска и пользы определенной дозы, например, для достижения необходимого уровня супрессии гена PCSK9 (который определяют, например, исходя из супрессии мРНК PCSK9, экспрессии белка PCSK9 или снижения уровней липидов) или необходимого терапевтического или профилактического действия, вместе с тем одновременно избегая нежелательного побочного действия.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят двумя или более дозами. При необходимости облегчить проведение повторяющихся или частых инфузий может быть целесообразным вживление устройства для доставки, например, насоса, полупостоянного стента (например, внутривенного, внутрибрюшинного, интракостерального или внутрисуставного), или сосуда. В некоторых вариантах осуществления число или количество последовательных доз зависит от достижения необходимого действия, например супрессии гена PCSK9, или достижения терапевтического или профилактического действия, например уменьшения симптома гиперхолестеринемии. В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят в соответствии со схемой. Например, средство для RNAi можно вводить один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю или пять раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления схема включает введения с равными интервалами, например, каждый час, каждые 4 ч, каждые 6 ч, каждые 8 ч, каждые 12 ч, каждый день, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц. В других вариантах осуществления схема включает введения с небольшим интервалом с последующим более длительным периодом времени, в течение которого средство не вводят. Например, схема может включать первоначальный набор доз, которые вводят в течение относительно короткого периода времени (например, примерно каждые 6 ч, примерно каждые 12 ч, примерно каждые 24 ч, примерно каждые 48 ч или примерно каждые 72 ч) с последующим более длительным периодом времени (например, примерно 1 неделя, примерно 2 недели, примерно 3 недели, примерно 4 недели, примерно 5 недель, примерно 6 недель, примерно 7 недель или примерно 8 недель), в течение которого средство для RNAi не вводят. В одном варианте осуще-

ствления средство для RNAi первоначально вводят каждый час, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, раз в день, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц). В другом варианте осуществления средство для RNAi первоначально вводят ежедневно, а впоследствии вводят с более длительными интервалами (например, раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц). В некоторых вариантах осуществления более длительный интервал увеличивается со временем, или его определяют, исходя из достижения необходимого действия. В конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят один раз в день в течение первой недели с последующим введением доз раз в неделю, начиная с восьмого дня введения. В другом конкретном варианте осуществления средство для RNAi вводят через день в течение первой недели с последующим введением доз раз в неделю, начиная с восьмого дня введения.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят два раза в неделю. В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят два раза в неделю в дозе 1 мг/кг. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят два раза в неделю в дозе 2 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз каждые две недели. В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз каждые две недели в дозе 1 мг/кг. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз каждые две недели в дозе 2 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз в неделю. В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз в неделю в дозе 0,5 мг/кг. В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз в неделю в дозе 1 мг/кг. В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят один раз в неделю в дозе 2 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления средство для RNAi вводят при режиме дозирования, который включает "фазу насыщения" из введений с небольшими интервалами, за которой может следовать "фаза поддержания", в которой средство для RNAi вводят с более длительными интервалами. В одном варианте осуществления фаза насыщения включает пять ежедневных введений средства для RNAi в течение первой недели. В другом варианте осуществления фаза поддержания включает введения средства для RNAi один или два раза в неделю. В дополнительном варианте осуществления фаза поддержания длится 5 недель. В одном варианте осуществления фаза насыщения включает введение дозы 2, 1 или 0,5 мг/кг пять раз в неделю. В другом варианте осуществления фаза поддержания включает введение дозы 2, 1 или 0,5 мг/кг один раз, два раза или три раза в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев.

Любую из этих схем необязательно можно повторять для одного или нескольких повторов. Число повторов может зависеть от достижения необходимого действия, например супрессии гена PCSK9, и/или достижения терапевтического или профилактического действия, например снижения уровней сывороточного холестерина или уменьшения симптома гиперхолестеринемии.

В дополнительных вариантах осуществления введение siRNA осуществляют в комбинации с дополнительным терапевтическим средством. siRNA и дополнительное терапевтическое средство можно вводить в комбинации в одной и той же композиции, например парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или другим способом, описанным в данном документе.

Примеры дополнительных терапевтических средств включают средства, известные для лечения нарушений липидного обмена, таких как гиперхолестеринемия, атеросклероз или дислипидемия. Например, siRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить, например, с ингибитором редуктазы HMG-CoA (например, статином), фибратом, секвестрантом желчных кислот, ниацином, антитромбоцитарным средством, ингибитором ангиотензинпревращающего фермента, антагонистом рецепторов ангиотензина II (например, лозартаном калия, как, например, Cozaar® от Merck & Co.), ингибитором ацил-CoA:холестерин-ацилтрансферазы (ACAT), ингибитором абсорбции холестерина, ингибитором транспортного белка эфиров холестерина (СЕТР), ингибитором микросомального белка-переносчика триглицеридов (МТТР), модулятором холестерина, модулятором желчной кислоты, агонистом рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PPAR), средством для генной терапии, комплексным защитным веществом для сосудов (например, AGI-1067 от Atherogenics), ингибитором гликопротеина IIb/IIIb, аспирином или аспирино-подобным веществом, ингибитором IBAT (например, S-8921 от Shionogi), ингибитором синтеза сквалена или ингибитором моноцитарного хемоаттрактантного белка (MCP)-I. Иллюстративные ингибиторы редуктазы HMG-CoA включают аторвастатин (Lipitor®/Tahor/Sortis/Torvast/Cardyl от Pfizer), правастатин (Pravachol от Bristol-Myers Squibb, Mevalotin/Sanaprav от Sankyo), симвастатин (Zocor®/Sinvacor от Merck, Denan от Boehringer Ingelheim, Lipovas от Banyu), ловастатин (Mevacor/Mevinacor от Merck, Lovastatina от Bexal, Liposcler от Cepa Schwarz Pharma), флувастатин (Lescol®/Locol/Lochol от Novartis, Cranoc от Fujisawa, Digaril от Solvay), церивастатин (Lipobay/Glaxo от Bayer, Baycol от

SmithKline), розувастатин (Crestor® от AstraZeneca) и питивастатин (итавастатин/ризивастатин) (Nissan Chemical, Kowa Kogyo, Sankyo и Novartis). Иллюстративные фибраты включают, например, безафибрат (например, Befizal®/Cedur®/Bezalip® от Roche, Bezatol от Kissei), клофибрат (например, Atromid-S® от Wyeth), фенофибрат (например, Lipidil/Lipantil от Fournier, Tricor® от Abbott, Lipantil от Takeda, дженерики), гемфиброзил (например, Lopid/Lipug от Pfizer) и ципрофибрат (Modalim® от Sanofi-Synthelabo). Иллюстративные секвестранты желчных кислот включают, например, холестирамин (Questran® и Questran Light™ от Bristol-Myers Squibb), коlestипол (например, Colestid от Pharmacia) и колесевелам (Wel-Chol™ от Genzyme/Sankyo). Иллюстративные средства для терапии с ниацином включают, например, составы с быстрым высвобождением, такие как Nicobid от Aventis, Niacor от Upsher-Smith, Nicolar от Aventis и Percycit от Sanwakagaku. Составы замедленного высвобождения с ниацином включают, например, Niaspan от Kos Pharmaceuticals и Slo-Niacin от Upsher-Smith. Иллюстративные антитромбоцитарные средства включают, например, аспирин (например, аспирин от Bayer), клопидогрель (Plavix от Sanofi-Synthelabo/Bristol-Myers Squibb) и тиклопидин (например, Ticlid от Sanofi-Synthelabo и Panaldine от Dai-ichi). Другие аспирин-подобные соединения пригодные в комбинации с dsRNA, нацеленными на PCSK9, включают, например, Asacard (медленно высвобождающийся аспирин от Pharmacia) и памикогрель (Kanabo/Angelini Ricerche/CEPA). Иллюстративные ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента включают, например, рамиприл (например, Altase от Aventis) и эналаприл (например, Vasotec от Merck & Co.). Иллюстративные ингибиторы ацилCoA:холестерин-ацилтрансферазы (ACAT) включают, например, авазимиб (Pfizer), эфлюцимиб (BioMerieux Pierre Fabre/Eli Lilly), CS-505 (Sankyo и Kyoto) и SMP-797 (Sumito). Иллюстративные ингибиторы абсорбции холестерина включают, например, эзетимиб (Zetia® от Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals) и Pamaqueside (Pfizer). Иллюстративные ингибиторы CETP включают, например, торцетрапиб (также называемый CP-529414 от Pfizer), JTT-705 (Japan Tobacco) и CETi-I (Avant Immunotherapeutics). Иллюстративные ингибиторы микросомального белка-переносчика триглицеридов (MTP) включают, например, имплитапид (Bayer), R-103757 (Janssen) и CP-346086 (Pfizer). Другие иллюстративные модуляторы холестерина включают, например, NO-1886 (Otsuka/TAP Pharmaceutical), CI-1027 (Pfizer) и WAY-135433 (Wyeth-Ayerst).

Иллюстративные модуляторы желчной кислоты включают, например, HBS-107 (Hisamitsu/Banyu), Btg-511 (British Technology Group), BARI-1453 (Aventis), S-8921 (Shionogi), SD-5613 (Pfizer) и AZD-7806 (AstraZeneca). Иллюстративные агонисты рецептора, активируемого пролифератором пероксисом, (PPAR) включают, например, тезаглитазар (AZ-242) (AstraZeneca), нетоглитазон (MCC-555) (Mitsubishi/Johnson & Johnson), GW-409544 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), GW-501516 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), LY-929 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly), LY-465608 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly), LY-518674 (Ligand Pharmaceuticals и Eli Lilly) и MK-767 (Merck и Kyorin). Иллюстративные средства для разновидностей генной терапии включают, например, AdGWEGF 121.10 (GenVec), ApoA1 (UCB Pharma/Groupe Fournier), EG-004 (Trinam) (Ark Therapeutics) и АТФ-связывающая кассета-транспортер-А1 (ABCA1) (CV Therapeutics/Incyte, Aventis, Xenon). Иллюстративные ингибиторы гликопротеина IIb/IIIa включают, например, роксифибан (также называемый DMP754, Bristol-Myers Squibb), гантофибан (Merck KGaA/Yamanouchi) и кромафибан (Millennium Pharmaceuticals). Иллюстративные ингибиторы синтеза сквалена включают, например, BMS-1884941 (Bristol-Myers Squibb), CP-210172 (Pfizer), CP-295697 (Pfizer), CP-294838 (Pfizer) и TAK-475 (Takeda). Иллюстративным ингибитором MCP-I является, например, RS-504393 (Roche Bioscience). Противоатеросклеротическое средство BO-653 (Chugai Pharmaceuticals) и производное никотиновой кислоты Nyclin (Yamanouchi Pharmaceuticals) также подходят для введения в комбинации с dsRNA, описанной в настоящем изобретении. Иллюстративные средства комбинированной терапии, подходящие для введения с dsRNA, нацеленными на PCSK9, включают, например, адвикор (ниацин/ловастатин от Kos Pharmaceuticals), амлодипин/аторвастатин (Pfizer) и эзетимиб/симвастатин (например, таблетки Vytorin® с дозировкой 10/10, 10/20, 10/40 и 10/80, Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals). Средства для лечения гиперхолестеринемии, и подходящие для введения в комбинации с dsRNA, нацеленными на PCSK9, включают, например, ловастатин, ниацин, таблетку с пролонгированным действием Altoprev® (Andrx Labs), ловастатин, таблетки Caduet® (Pfizer), амлодипин безилат, аторвастатин в форме кальциевой соли, таблетки Crestor® (AstraZeneca), розувастатин в форме кальциевой соли, капсулы Lescol® (Novartis), флувастатин в форме натриевой соли Lescol® (Reliant, Novartis), флувастатин в форме натриевой соли, таблетки Lipitor® (Parke-Davis), аторвастатин в форме кальциевой соли, капсулы Lofibra® (Gate), таблетки с пролонгированным действием Ниаспан (Kos), ниацин, таблетки Pravachol (Bristol-Myers Squibb), правастатин в форме натриевой соли, таблетки TriCor® (Abbott), фенофибрат, таблетки Vytorin® с дозировкой 10/10 (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals), эзетимиб, симвастатин, таблетки WelChol™ (Sankyo), колесевелам в форме хлористоводородной соли, таблетки Zetia® (Schering), эзетимиб, таблетки Zetia® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals) и эзетимиб, таблетки Zocor® (Merck).

В одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят в комбинации с комбинацией эзетимиба/симвастатина (например, Vytorin® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals)). В

одном варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, вводят пациенту и затем пациенту вводят дополнительное терапевтическое средство (или vice versa). В другом варианте осуществления средство, представляющее собой иРНК, и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно.

В другом аспекте в настоящем изобретении описан способ инструктирования конечного пользователя, например лица, осуществляющего уход или лечение, или субъекта, в отношении того, как вводить средство, представляющее собой иРНК, описанное в данном документе. Способ включает, необязательно, предоставление конечному пользователю одной или нескольких доз средства, представляющего собой иРНК, и инструктирование конечного пользователя по введению средства, представляющего собой иРНК, в режиме, описанном в данном документе, таким образом, инструктируя конечного пользователя.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ лечения пациента путем отбора пациента при условии, что пациент нуждается в снижении уровня LDL, снижении уровня LDL без снижения уровня HDL, снижении уровня ApoB или снижении уровня общего холестерина. Способ включает введение пациенту siRNA в количестве, достаточном для снижения уровней LDL или уровней ApoB у пациента, например, без снижения в значительной степени уровней HDL.

Генетическая предрасположенность играет роль в развитии ассоциированных с целевым геном заболеваний, например гиперлипидемии. Таким образом, пациента, нуждающегося в siRNA, можно выявить путем анализа семейного анамнеза или, например, тестирования на наличие одного или нескольких генетических маркеров или вариантов. Примеры генов, вовлеченных в гиперлипидемию, включают, без ограничения, например, таковые рецептора LDL (LDLR), аполипротеинов (ApoA1, ApoB, ApoE и т.п.), транспортного белка эфиров холестерина (СЕТР), липопротеинлипазы (LPL), печеночной липазы (LIPC), эндотелиальной липазы (EL), лецитин:холестерин ацилтрансферазы (LCAT).

Медицинский работник, такой как врач, медицинская сестра или член семьи могут принять во внимание семейный анамнез перед назначением или введением средства, представляющего собой иРНК, согласно настоящему изобретению. Кроме того, можно выполнить анализ для определения генотипа или фенотипа. Например, можно выполнить ДНК-анализ с образцом от пациента, например образцом крови, для установления PCSK9-генотипа и/или -фенотипа перед введением пациенту dsRNA к PCSK9. В другом варианте осуществления выполняют анализ для установления родственного генотипа и/или фенотипа, например, LDLR-генотипа. Примеры генетических вариантов гена LDLR можно найти в уровне техники, например, в следующих публикациях, которые включены при помощи ссылки: Costanza et al. (2005) *Am. J. Epidemiol.* 15;161(8):714-24; Yamada et al. (2008) *J. Med. Genet. Jan*; 45(1):22-8, электронная публикация 31 августа 2007 г.; и Boes et al. (2009) *Exp. Gerontol* 44: 136-160, электронная публикация 17 ноября 2008 г.

#### VI. Наборы.

Изобретение также предусматривает наборы для применения любого из средств, представляющих собой иРНК, и/или осуществления любого из способов согласно изобретению. Такие наборы включают одно или несколько средств для RNAi и инструкции по применению, например инструкции для ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке путем приведения клетки в контакт со средством(ами) для RNAi в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии PCSK9. Наборы могут необязательно дополнительно содержать средства для приведения клетки в контакт со средством для RNAi (например, устройство для инъекции) или средства для определения степени ингибирования PCSK9 (например, средства для определения степени ингибирования мРНК PCSK9 или белка TTR). Такие средства для определения степени ингибирования PCSK9 могут включать средства для получения образца от субъекта, такого как, например, образец плазмы. Наборы согласно настоящему изобретению необязательно могут дополнительно содержать средства для введения средства(средств) для RNAi субъекту или средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое значение, которое обычно понятно специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, можно применять в практическом осуществлении или испытании иРНК и способов, описанных в настоящем изобретении, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие литературные источники, которые упоминаются в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не подразумеваются как ограничивающие.

#### Примеры

##### Материалы и способы.

Следующие материалы и способы использовали в примерах. Синтез кДНК с использованием набора "ABI High capacity c DNA reverse transcription kit" (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813).

Мастер-микс из 2 мкл 10X буфера, 0,8 мкл 25X dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H<sub>2</sub>O на реакцию добавляли в 10 мкл общей РНК.

кДНК получали с использованием термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C 10 мин, 37°C 120 мин, 85°C 5 с, хранение при 4°C.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки Нер3В, НерG2 или HeLa (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в рекомендованной среде (ATCC), дополненной 10% FBS и глутамином (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Для дуплексов, отсортированных в 96-луночном формате, трансфекцию выполняли путем добавления 44,75 мкл Opti-MEM с 0,25 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса siRNA в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Пятьдесят мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих ~2×10<sup>4</sup> клеток, затем добавляли к смеси siRNA. Для дуплексов, отсортированных в 384-луночном формате, 5 мкл Opti-MEM с 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, № по кат. 13778-150) смешивали с 5 мкл каждого дуплекса siRNA на отдельную лунку. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин с последующим добавлением 40 мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих ~8×10<sup>3</sup> клеток. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК. Эксперименты в отношении разовой дозы выполняли при конечной концентрации дуплекса 10 и 0,1 нМ и эксперименты в отношении эффекта дозы выполняли с использованием 8×5-кратных серийных разведений, начиная с 2 нМ.

Трансфекция посредством свободного поглощения.

Пять мкл каждой конъюгированной с GalNac siRNA в PBS объединяли с 3×10<sup>4</sup> свежеразмороженных криосохраненных гепатоцитов макаков-крабоедов (In Vitro Technologies-Celsis, Балтимор, Мэриленд; серийный номер JQD), ресуспендированных в 95 мкл сред "In Vitro Gro CP media" (In Vitro Technologies-Celsis, Балтимор, Мэриленд), в каждой лунке 96-луночного планшета или 5 мкл siRNA и 45 мкл сред, содержащих 1,2×10<sup>3</sup> клеток, для формата 384-луночного планшета. Смеси инкубировали в течение примерно 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. siRNA тестировали при множестве концентраций от 500 до 0,1 нМ для экспериментов в отношении разовой дозы и с использованием 8×5-кратных серийных разведений, начиная с 500 нМ, для экспериментов в отношении эффекта дозы.

Выделение общей РНК с использованием набора "DYNABEADS mRNA Isolation Kit" (Invitrogen, номер по каталогу 610-12).

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем смешивали в течение 5 мин при 850 об/мин с помощью Eppendorf Thermomixer (скорость смешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и смешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и смешивали в течение 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и смешивали в течение 1 мин. Гранулы опять фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл элюирующего буфера, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулам давали возможность высохнуть в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и смешивали в течение 5 мин при 70°C. Гранулы фиксировали на магните в течение 5 мин. Удаляли пятьдесят мкл супернатанта и добавляли в другой 96-луночный планшет.

Для 384-луночного формата клетки лизировали в течение одной минуты путем добавления 50 мкл лизирующего/связывающего буфера. Применяли два мкл магнитных гранул на лунку. Необходимый объем гранул делили на аликвоты, фиксировали на магнитном стенде и удаляли раствор для хранения гранул. Гранулы затем ресуспендировали в необходимом объеме лизирующего/связывающего буфера (25 мкл на лунку) и 25 мкл суспензии с гранулами добавляли к лизированным клеткам. Смесь лизата и гранул инкубировали в течение 10 мин на VibraTransaltor при параметре № 7 (UnionScientific Corp., Рэндоллстаун, Мэриленд). Впоследствии гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда, супернатант удаляли и гранулы промывали один раз 90 мкл буфера А с последующими отдельными стадиями промывания 90 мкл буфера В и 100 мкл элюирующего буфера. Гранулы пропитывали каждым промывочным буфером в течение ~1 мин (без использования смешивания). После конечной стадии промывания гранулы ресуспендировали в 15 мкл элюирующего буфера в течение 5 мин при 70°C с последующим фиксированием гранул и удалением супернатанта (до 8 мкл) для синтеза кДНК и/или хранения очищенной РНК (-20°C).

PCR в режиме реального времени.

Два мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 0,5 мкл зонда TaqMan для GAPDH человека (Applied Biosystems, № по кат. 4326317E), 0,5 мкл зонда TaqMan для PCSK9 человека (Applied Biosystems, № по кат. Hs03037355\_m1) для клеток человека или 0,5 мкл набора реагентов "Custom TaqMan Assay" для GAPDH яванского макака (150 нМ супо GAP F праймер-5'GCATCCTGGGCTACACTGA (SEQ ID NO: 5); 150 нМ супо GAP R праймер-5'-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC (SEQ ID NO: 6) 250 нМ супо GAP зонд-

5'-5HEX-CCAGGTGGTCTCCTCC-BHQ1-Q-3' (SEQ ID NO: 7)), 0,5 мкл набора реагентов "Custom TaqMan Assay" для PCSK9 яванского макака (900 нМ супо PCSK9 F праймер 5'-ACGTGGCTGGCATTGCA (SEQ ID NO: 8); 900 нМ супо PCSK9 R праймер 5'-AAGTGGATCAGTCTCTGCCTCAA (SEQ ID NO: 9); 250 нМ супо PCSK9 зонд 5'-6FAM-CATGATGCTGTCTGCCGAGCCG-BHQ1-Q-3' (SEQ ID NO: 10)) для клеток яванского макака, и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, № по кат. 04887301001) на лунку в 384-луночном планшете (Roche, № по кат. 04887301001). PCR в режиме реального времени выполняли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche) с применением  $\Delta\Delta C_t$ (RQ)-анализа. Каждый дуплекс исследовали при двух независимых трансфекциях и каждую трансфекцию оценивали в двух параллельных испытаниях, если не указано иное.

Для вычисления относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с применением  $\Delta\Delta C_t$ -способа и нормализовали в соответствии с таковыми анализом, выполненным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или имитационными трансфицированными клетками. Для анализов со свободным поглощением данные нормализовали в соответствии с таковыми по обработанному PBS или GalNAc-1955 (самая высокая концентрация для экспериментальных соединений) клеткам.  $IC_{50}$  вычисляли с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с таковыми для клеток, трансфицированных AD-1955 в таком же диапазоне доз или в отношении его наиболее низкой дозы.

Смысловая и бессмысловая последовательности AD-1955 представляют собой  
 смысловая: 5'-cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT-3' (SEQ ID NO: 11) и  
 бессмысловая: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (SEQ ID NO: 12).

Таблица В. Сокращения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат

Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфотиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфотиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-O-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-O-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-O-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-O-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-O-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-O-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-O-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-O-метилуридин-3'-фосфотиоат
dT	2'-дезокситимидин
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфотиоат
dU	2'-дезоксиуридин
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипропиол-Нур-(GalNAc-алкил)3
(Aeo)	2'-O-метоксиэтиладенозин-3'-фосфат

(Aeos)	2'-О-метоксиэтиладенозин-3'-фосфотиоат
(Geo)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфат
(Geos)	2'-О-метоксиэтилгуанозин-3'-фосфотиоат
(Teo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфат
(Teos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
(m5Ceo)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Ceos)	2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(A3m)	3'-О-метиладенозин-2'-фосфат
(A3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозиладенозин-2'-фосфат
(G3m)	3'-О-метилгуанозин-2'-фосфат
(G3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилгуанозин-2'-фосфат
(C3m)	3'-О-метилцитидин-2'-фосфат
(C3mx)	3'-О-метил-ксилофуранозилцитидин-2'-фосфат
(U3m)	3'-О-метилуридин-2'-фосфат
(U3mx)	3'-О-метилксилоуридин-2'-фосфат
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(pshe)	гидроксиэтилфосфотиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецил-уридин-3'-фосфат
(Tgn)	тимидин-глицоль-нуклеиновая кислота (GNA), S-изомер
(Cgn)	цитидин-глицоль-нуклеиновая кислота (GNA)
(Chd)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Ggn)	2'-О-гексадецил-цитидин-3'-фосфат
(Agn)	аденозин-глицоль-нуклеиновая кислота (GNA)
P	5'-фосфат
(m5Cam)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфат
(m5Cams)	2'-О-(N-метилацетамид)-5-метилцитидин-3'-фосфотиоат
(Tam)	2'-О-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфат
(Tams)	2'-О-(N-метилацетамид)тимидин-3'-фосфотиоат
(Aam)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфат
(Aams)	2'-О-(N-метилацетамид)аденозин-3'-фосфотиоат
(Gam)	2'-О-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфат
(Gams)	2'-О-(N-метилацетамид)гуанозин-3'-фосфотиоат
(Uyh)	2'-О-(1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-уридин-3'-фосфат
(Ayh)	2'-О-(1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-аденозин-3'-фосфат
(Gyh)	2'-О-(1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-гуанозин-3'-фосфат
(Cyh)	2'-О-(1-гексил-4-метил-1,2,3-триазолил)-цитидин-3'-фосфат

Пример 1. Синтез конъюгированных с GalNAc олигонуклеотидов.

Серии дуплексов siRNA, охватывающих последовательность мРНК PCSK9, конструировали, синтезировали и конъюгировали с трехвалентным GalNAc на 3-конце смысловой нити, применяя методики, описанные выше. Последовательности таких дуплексов показаны в табл. 1. Такие же последовательности также синтезировали с различными нуклеотидными модификациями и конъюгировали с трехвалентным GalNAc. Последовательности модифицированных дуплексов показаны в табл. 2.

Таблица 1. Немодифицированные последовательности для PCSK9

Название дуплекса	Название смыслового олигонуклеотида	Смысловая транс. посл.	SEQ ID NO:	Название антисмыслового олигонуклеотида	Антисмысловая транс. посл.	SEQ ID NO:	Начало в NM_14936.3	Конец в NM_174936.3
AD-53649.1	A-110542.1	CGAGGACGGCGACUACGAGGA	13	A-109239.2	UCCUCGUAGUCGCCGUCCUCGUC	234	459	481
AD-53661.1	A-110544.1	ACCGCUGCGCAAGGAUCCGU	14	A-109243.2	ACGGAUCCUUGGCGCAGCGGUGG	235	554	576
AD-53667.1	A-110545.1	GCUGCGCCAAGGAUCCGUGGA	15	A-109245.2	UCCACGGAUCCUUGGCGCAGCGG	236	557	579
AD-53679.1	A-110547.1	CUACGUGGUGGUGCUAAGGA	16	A-109249.2	UCCUUCAGCACCCACCGUAGGU	237	591	613
AD-53685.1	A-110548.1	CCCGCCGGGGAUACCCACCA	17	A-109251.2	UGGUGAGGUAUCCCGCGGGCA	238	668	690
AD-53691.1	A-110549.1	CCGCGGGGAUACCCACCAA	18	A-109253.2	UUGGUGAGGUAUCCCGCGGGC	239	669	691
AD-53650.1	A-110550.1	GCCGGGGAUACCCACCAAGA	19	A-109255.2	UCUUGGUGAGGUAUCCCGCGCG	240	671	693
AD-53656.1	A-110551.1	CCGGGGAUACCCACCAAGAU	20	A-109257.2	AUCUUGGUGAGGUAUCCCGCGG	241	672	694
AD-53668.1	A-110553.1	AUACCCACCAAGAUCCUGCA	21	A-109261.2	UGCAGGAUCUUGGUGAGGUAUCC	242	678	700
AD-53674.1	A-110554.1	CACCAAGAUCCUGCAUGUCUU	22	A-109263.2	AAGACAUGCAGGAUCUUGGUGAG	243	684	706
AD-53680.1	A-110555.1	CAAGAUCCUGCAUGUCUCCA	23	A-109265.2	UGGAGACAUGCAGGAUCUUGGU	244	687	709
AD-53692.1	A-110557.1	GUUGCCCAUGUCGACUACAU	24	A-109269.2	AUGUAGUCGACAUGGGGCAACU	245	768	790
AD-53651.1	A-110558.1	GCCCAUGUCGACUACAUCA	25	A-109271.2	UCGAUGUAGUCGACAUGGGGCAA	246	771	793
AD-53657.1	A-110559.1	CCAUGUCGACUACAUAGGGA	26	A-109273.2	UCCUCGAUGUAGUCGACAUGGGG	247	774	796
AD-53663.1	A-110560.1	UCGACUACAUAGGAGGAGACU	27	A-109275.2	AGUCCUCCUGAUGUAGUCGACA	248	779	801
AD-53669.1	A-110561.1	ACUACAUAGGAGGAGACUCCU	28	A-109277.2	AGGAGUCCUCCUGAUGUAGUCG	249	782	804
AD-53675.1	A-110562.1	UACAUAGGAGGAGACUCCUCU	29	A-109279.2	AGAGGAGUCCUCCUGAUGUAGU	250	784	806
AD-53681.1	A-110563.1	UCGAGGAGGACUCCUCUGUCU	30	A-109281.2	AGACAGAGGAGUCCUCCUGAUG	251	788	810
AD-53687.1	A-110564.1	CGAGGAGGACUCCUCUGUCUU	31	A-109283.2	AAGACAGAGGAGUCCUCCUGAU	252	789	811
AD-53693.1	A-110565.1	GUACCGGGCGGAUGAAUACCA	32	A-109285.2	UGGUAUUCUCCGCCCGGUACCG	253	855	877
AD-53652.1	A-110566.1	CCUGGUGGAGGUGUAUCUCCU	33	A-109287.2	AGGAGAUACACCUCCACAGGCU	254	894	916
AD-53658.1	A-110567.1	CUGGUGGAGGUGUAUCUCCUA	34	A-109289.2	UAGGAGAUACACCUCCACAGGC	255	895	917
AD-53664.1	A-110568.1	GGUGGAGGUGUAUCUCCUAGA	35	A-109291.2	UCUAGGAGAUACACCUCCACAG	256	897	919
AD-53670.1	A-110569.1	UGGAGGUGUAUCUCCUAGACA	36	A-109293.2	UGUCUAGGAGAUACACCUCCACC	257	899	921
AD-53676.1	A-110570.1	AGGUGUAUCUCCUAGACACCA	37	A-109295.2	UGGUGUCUAGGAGAUACACCUCC	258	902	924
AD-53682.1	A-110571.1	GUAUCUCCUAGACACCAAGCAU	38	A-109297.2	AUGCUGGUGUCUAGGAGAUACAC	259	906	928
AD-53688.1	A-110572.1	UAUCUCCUAGACACCAAGCAU	39	A-109299.2	UAUGCUGGUGUCUAGGAGAUACA	260	907	929
AD-53694.1	A-110573.1	UCUCCUAGACACCAAGCAUACA	40	A-109301.2	UGUAUGCUGGUGUCUAGGAGAU	261	909	931
AD-53653.1	A-110574.1	UCCUAGACACCAAGCAUACAGA	41	A-109303.2	UCUGUAUGCUGGUGUCUAGGAGA	262	911	933
AD-53659.1	A-110575.1	AGACACCAAGCAUACAGAGUGA	42	A-109305.2	UCACUCUGUAUGCUGGUGUCUAG	263	915	937
AD-53665.1	A-110576.1	CACCAGCAUACAGAGUGACCA	43	A-109307.2	UGGUCACUCUGUAUGCUGGUGUC	264	918	940
AD-53671.1	A-110577.1	UACAGAGUGACCACCGGAAA	44	A-109309.2	UUUCCGGUGGUCACUCUGUAUG	265	926	948
AD-53677.1	A-110578.1	ACAGAGUGACCACCGGAAA	45	A-109311.2	AUUUCCGGUGGUCACUCUGUAU	266	927	949
AD-53683.1	A-110579.1	GAGUGACCACCGGAAAUCGA	46	A-109313.2	UCGAUUUCCGGUGGUCACUCUG	267	930	952
AD-53689.1	A-110580.1	GGAAAUCGAGGGCAGGGUCAU	47	A-109315.2	AUGACCCUGCCUCGAUUUCCCG	268	942	964
AD-53695.1	A-110581.1	AAUCGAGGGCAGGGUCAUGGU	48	A-109317.2	ACCAUGACCCUGCCUCGAUUUCC	269	945	967
AD-53654.1	A-110582.1	GCAGGGUCAUGGUCACCGACU	49	A-109319.2	AGUCGGUGACCAUGACCCUGCCC	270	953	975
AD-53660.1	A-110583.1	CAGGGUCAUGGUCACCGACUU	50	A-109321.2	AAGUCGGUGACCAUGACCCUGCC	271	954	976
AD-53666.1	A-110584.1	GGUCAUGGUCACCGACUUCGA	51	A-109323.2	UCGAAGUCGGUGACCAUGACCCU	272	957	979
AD-53672.1	A-110585.1	UCAUGGUCACCGACUUCGAGA	52	A-109325.2	UCUCGAAGUCGGUGACCAUGACC	273	959	981
AD-53678.1	A-110586.1	AGGACGGGACCGCUUCCACA	53	A-109327.2	UGUGGAAGCGGGUCCGUCCUCC	274	992	1014
AD-53684.1	A-110587.1	CGGGACCCGCUUCCACAGACA	54	A-109329.2	UGUCUGUGGAAGCGGGUCCCGUC	275	996	1018
AD-53690.1	A-110588.1	UCCACAGACAGGGCAGCAAGU	55	A-109331.2	ACUUGCUGGCCUGUCUGGGAAG	276	1007	1029
AD-53696.1	A-110589.1	CCUGCGGUGCUAACUGCCA	56	A-109333.2	UGGCAGUUGAGCACGCAGGCU	277	1107	1129
AD-53702.1	A-110590.1	CUGCGGUGCUAACUGCCA	57	A-109335.2	UUGGCAGUUGAGCACGCAGGCU	278	1108	1130
AD-53708.1	A-110591.1	CGUGCUAACUGCCAAGGGAA	58	A-109337.2	UUCUCCUUGGAGUUGAGCACGCG	279	1113	1135
AD-53714.1	A-110592.1	CACCCUAUAGGCCUGGAGUU	59	A-109339.2	AACUCCAGGCCUAUGAGGGUGCC	280	1149	1171
AD-53720.1	A-110593.1	ACCCUAUAGGCCUGGAGUUU	60	A-109341.2	AAACUCCAGGCCUAUGAGGGUGC	281	1150	1172
AD-53726.1	A-110594.1	CCCUAUAGGCCUGGAGUUUA	61	A-109343.2	UAAACUCCAGGCCUAUGAGGGUG	282	1151	1173

AD-53732.1	A-110595.1	CCUCAUAGGCCUGGAGUUUAU	62	A-109345.2	AUAAACUCCAGGCCUUGAGGGU	283	1152	1174
AD-53738.1	A-110596.1	CUCAUAGGCCUGGAGUUUAU	63	A-109347.2	AAUAAACUCCAGGCCUUGAGGG	284	1153	1175
AD-53697.1	A-110597.1	UAGGCCUGGAGUUUAUUCGGA	64	A-109349.2	UCCGAAUAAACUCCAGGCCUUAUG	285	1157	1179
AD-53703.1	A-110598.1	AGGCCUGGAGUUUAUUCGGAA	65	A-109351.2	UUCCGAAUAAACUCCAGGCCUUAU	286	1158	1180
AD-53709.1	A-110599.1	GGCCUGGAGUUUAUUCGAAA	66	A-109353.2	UUUCCGAAUAAACUCCAGGCCUA	287	1159	1181
AD-53715.1	A-110600.1	GCCUGGAGUUUAUUCGAAAA	67	A-109355.2	UUUCCGAAUAAACUCCAGGCCU	288	1160	1182
AD-53721.1	A-110601.1	GGAGUUUAUUCGAAAAGCCA	68	A-109357.2	UGGCUUUUCCGAAUAAACUCCAG	289	1164	1186
AD-53727.1	A-110602.1	GUUUUAUUCGAAAAGCCAGCU	69	A-109359.2	AGCUGGCCUUUCCGAAUAAACUC	290	1167	1189
AD-53733.1	A-110603.1	GGGCGGGGUGGUGGUGUCA	70	A-109361.2	UGACCAGCACGCCCCAGCCUC	291	1277	1299
AD-53739.1	A-110604.1	GGUACCGCGGCCGGCAACUU	71	A-109363.2	AAGUUGCCGGCAGCGGUGACCAG	292	1293	1315
AD-53698.1	A-110605.1	GGGACGAUGCCUGCCUCUACU	72	A-109365.2	AGUAGAGGCAGGCAUCGUCCCGG	293	1316	1338
AD-53704.1	A-110606.1	CAACUUUGGCCGUGUGGGA	73	A-109367.2	UCCACACAGCGGCAAGUUGGU	294	1419	1441
AD-53710.1	A-110607.1	UUGGCCGUGUGUGGACCUCU	74	A-109369.2	AGAGGUCCACAGCGGCAAAAG	295	1424	1446
AD-53716.1	A-110608.1	UGGCCGUGUGUGGACCUCUU	75	A-109371.2	AAGAGGUCCACAGCGGCAAA	296	1425	1447
AD-53722.1	A-110609.1	GGCCGUGUGUGGACCUCUUU	76	A-109373.2	AAAGAGGUCCACAGCGGCAAA	297	1426	1448
AD-53728.1	A-110610.1	UGUGGACCUCUUUGCCCA	77	A-109375.2	UGGGGCAAGAGGUCCACACAGC	298	1432	1454
AD-53734.1	A-110611.1	GGGAGGACAUCAUUGGUGCCU	78	A-109377.2	AGGCACCAUGAUGUCCUCCCU	299	1454	1476
AD-53740.1	A-110612.1	ACUGCAGCACCUUCUUGUGU	79	A-109379.2	ACACAAAGCAGGUGCUGCAGUCG	300	1481	1503
AD-53699.1	A-110613.1	GCAUUGCAGCAUGAUGCUGU	80	A-109381.2	ACAGCAUCAUGGCUCAUUGCCA	301	1541	1563
AD-53705.1	A-110614.1	GUUGAGGCAGAGACUGAUCCA	81	A-109383.2	UGGAUCAGUCUCUGCCUACUC	302	1590	1612
AD-53711.1	A-110615.1	UGAGGCAGAGACUGAUCCACU	82	A-109385.2	AGUGGAUCAGUCUCUGCCUAC	303	1592	1614
AD-53717.1	A-110616.1	GAGGCAGAGACUGAUCCACUU	83	A-109387.2	AAGUGGAUCAGUCUCUGCCUAA	304	1593	1615
AD-53723.1	A-110617.1	GGCAGAGACUGAUCCACUUCU	84	A-109389.2	AGAAGUGGAUCAGUCUCUGCCU	305	1595	1617
AD-53729.1	A-110618.1	CAGAGACUGAUCCACUUCUCU	85	A-109391.2	AGAGAAUGGAUCAGUCUCUGCC	306	1597	1619
AD-53735.1	A-110619.1	ACUGAUCCACUUCUCUGCCAA	86	A-109393.2	UUGGCAGAGAAGUGGAUCAGUCU	307	1602	1624
AD-53741.1	A-110620.1	AUCCACUUCUCUGCCAAAGAU	87	A-109395.2	AUCUUUGGCAGAGAAGUGGAUCA	308	1606	1628
AD-53700.1	A-110621.1	GGCCUGGUUCCUGAGGACCA	88	A-109397.2	UGGUCCUCAGGGAACCAGGCCUC	309	1638	1660
AD-53706.1	A-110622.1	GGUACUGACCCCAACCUUGGU	89	A-109399.2	ACCAGGUUGGGGUGCAGUACCCG	310	1662	1684
AD-53712.1	A-110623.1	GUUGGCAGCUGUUUUGCAGGA	90	A-109401.2	UCCUGCAAAACAGCUGCAACCU	311	1715	1737
AD-53718.1	A-110624.1	UGGCAGCUGUUUUGCAGGACU	91	A-109403.2	AGUCCUGCAAAACAGCUGCCAAC	312	1717	1739
AD-53724.1	A-110625.1	GCAGCUGUUUUGCAGGACUGU	92	A-109405.2	ACAGUCCUGCAAAACAGCUGCCA	313	1719	1741
AD-53730.1	A-110626.1	UCUGCCGGGCCACAACGCUU	93	A-109407.2	AAGCGUUGUGGGCCCGCAGACC	314	1883	1905
AD-53736.1	A-110627.1	CUGCCGGGCCACAACGCUUU	94	A-109409.2	AAAGCGUUGUGGGCCCGCAGAC	315	1884	1906
AD-53742.1	A-110628.1	GCCACAACGCUUUUGGGGGU	95	A-109411.2	ACCCCAAAAGCGUUGUGGGCCC	316	1891	1913
AD-53701.1	A-110629.1	CGCUUUUGGGGUGAGGGUGU	96	A-109413.2	ACACCCUCACCCCAAAAGCGU	317	1899	1921
AD-53707.1	A-110630.1	CUUUUGGGGUGAGGGUGUCU	97	A-109415.2	AGACACCCUCACCCCAAAAGCG	318	1901	1923
AD-53713.1	A-110631.1	UUUUGGGGUGAGGGUGUCUA	98	A-109417.2	UAGACACCCUCACCCCAAAAGC	319	1902	1924
AD-53719.1	A-110632.1	GGGUGAGGGUGUCUACGCCA	99	A-109419.2	UGGCGUAGACACCCUCACCCCA	320	1907	1929
AD-53725.1	A-110633.1	GGGUGAGGGUGUCUACGCCAU	100	A-109421.2	AUGGCGUAGACACCCUCACCCCA	321	1908	1930
AD-53731.1	A-110634.1	GGUGAGGGUGUCUACGCCAUU	101	A-109423.2	AAUGGCGUAGACACCCUCACCCCA	322	1909	1931
AD-53737.1	A-110635.1	AGGGUGUCUACGCCAUUGCCA	102	A-109425.2	UGGCAUUGGCGUAGACACCCUCA	323	1913	1935
AD-53743.1	A-110636.1	GUGUCUACGCCAUUGCCAGGU	103	A-109427.2	ACCUGGCAUUGGCGUAGACACCC	324	1916	1938
AD-53749.1	A-110637.1	UGCAGGUCCACAGCUCCA	104	A-109429.2	UGGAGCUGUGUGGACGUCGAGU	325	1960	1982
AD-53755.1	A-110638.1	GCAUGGGACCCGUGUCCACU	105	A-109431.2	AGUGGACACGGUCCCAUGCUG	326	1994	2016
AD-53761.1	A-110639.1	CCACAAGCCGCUUGUGUGA	106	A-109433.2	UCAGCACAGCGGCUUGUGGGUG	327	2078	2100
AD-53767.1	A-110640.1	GAGGCCACGAGGUCAGCCAA	107	A-109435.2	UUGGGCUGACCUCGUGGCCUCAG	328	2097	2119
AD-53773.1	A-110641.1	CACGAGGUCAGCCAAACAGU	108	A-109437.2	ACUGGUUGGGCUGACCUCGUGGC	329	2102	2124
AD-53779.1	A-110642.1	GGGAGGCCAGAUCCACGCUU	109	A-109439.2	AAGCGUGGAUGCUGGCCUCCUG	330	2135	2157
AD-53785.1	A-110643.1	AUCCACGCUUCCUGCUGCCAU	110	A-109441.2	AUGGCAGCAGGAAGCGUGGAUGC	331	2146	2168
AD-53744.1	A-110644.1	GGAAUGCAAAGUCAAGGAGCA	111	A-109443.2	UGCUCUUGACUUUGCAUUCAG	332	2178	2200
AD-53750.1	A-110645.1	AAUCCGGCCCGCAGGAGCA	112	A-109445.2	UGCUCUUGAGGGCCGGGAUUC	333	2202	2224
AD-53762.1	A-110647.1	GCUGGGGUGAGCUUAAAAU	113	A-109449.2	AUUUAAAGCUCAGCCCAAGCC	334	2479	2501

AD-53768.1	A-110648.1	GGAGGUGCCAGGAAGCUCCU	114	A-109451.2	AGGGAGCUUCCUGGCACCUCCAC	335	2648	2670
AD-53774.1	A-110649.1	ACUGUGGGGCAUUCACCAUU	115	A-109453.2	AAUGGUGAAAUGCCCCACAGUGA	336	2674	2696
AD-53780.1	A-110650.1	CCACCAAGGAGGCAGGAUUCU	116	A-109455.2	AGAAUCCUGCCUCCUUGGUGGAG	337	2811	2833
AD-53786.1	A-110651.1	CACCAAGGAGGCAGGAUUCU	117	A-109457.2	AAGAAUCCUGCCUCCUUGGUGGA	338	2812	2834
AD-53804.1	A-110701.1	ACCAAGGAGGCAGGAUUCU	118	A-109557.2	AAAGAAUCCUGCCUCCUUGGUGG	339	2813	2835
AD-53810.1	A-110702.1	GGAGGCAGGAUUCUCCCAUU	119	A-109559.2	AAUGGGAAGAAUCCUGCCUCCU	340	2818	2840
AD-53816.1	A-110703.1	GAGGCAGGAUUCUCCCAUGA	120	A-109561.2	UCAUGGGAAGAAUCCUGCCUCCU	341	2819	2841
AD-53745.1	A-110652.1	UGAUGGCCUCCAUCCAGCU	121	A-109459.2	AGCUGGAGAUGAGGGCCAUCAGC	342	2904	2926
AD-53822.1	A-110704.1	CUUUCUGGAUGGCAUCUAGCA	122	A-109563.2	UGCUGAUGCCAUCAGAAAGCU	343	2971	2993
AD-53751.1	A-110653.1	UUUCUGGAUGGCAUCUAGCCA	123	A-109461.2	UGGCUAGAUGCCAUCAGAAAGC	344	2972	2994
AD-53827.1	A-110705.1	UUCUGGAUGGCAUCUAGCCAA	124	A-109565.2	UUGGCUAGAUGCCAUCAGAAAG	345	2973	2995
AD-53757.1	A-110654.1	UCUGGAUGGCAUCUAGCCAGA	125	A-109463.2	UCUGGCUAGAUGCCAUCAGAAA	346	2974	2996
AD-53833.1	A-110706.1	CUGGAUGGCAUCUAGCCAGAA	126	A-109567.2	UUCUGGCUAGAUGCCAUCAGAA	347	2975	2997
AD-53793.1	A-110707.1	CUUUCUGGCAUCUAGCCAA	127	A-109569.2	UUGGCUAGAUGGCAUCUAGAAAGGU	348	3053	3075
AD-53799.1	A-110708.1	UUUACUCUGCUCUAGCCAGA	128	A-109571.2	UCUGGCAUAGAGCAGAGUAAAGG	349	3054	3076
AD-53763.1	A-110655.1	GCUCUAGCCAGGCUUGGCUA	129	A-109465.2	UAGCACAGCCUGGCAUAGAGCAG	350	3062	3084
AD-53769.1	A-110656.1	CUCAGCCAACCCGCUCCACUA	130	A-109467.2	UAGUGGAGCGGUUGGCUAGAGAC	351	3158	3180
AD-53805.1	A-110709.1	UCAGCCAACCCGCUCCACUAA	131	A-109573.2	UUAGUGGAGCGGUUGGCUAGAGA	352	3159	3181
AD-53811.1	A-110710.1	CCUGCCAAGCUCACACAGCAA	132	A-109575.2	UUGCUGUGUGAGCUUGGCAGGCA	353	3245	3267
AD-53781.1	A-110658.1	GCCAAGCUCACACAGCAGGAA	133	A-109471.2	UUCUGCUGUGUGAGCUUGGCAG	354	3248	3270
AD-53817.1	A-110711.1	CCAAGCUCACACAGCAGGAAA	134	A-109577.2	UUUCCUGCUGUGUGAGCUUGGCA	355	3249	3271
AD-53787.1	A-110659.1	CAAGCUCACACAGCAGGAACU	135	A-109473.2	AGUCCUGCUGUGUGAGCUUGGC	356	3250	3272
AD-53823.1	A-110712.1	AAGCUCACACAGCAGGAACUU	136	A-109579.2	AAGUCCUGCUGUGUGAGCUUGG	357	3251	3273
AD-53746.1	A-110660.1	CUGAAGCCAAGCCUUCUUA	137	A-109475.2	UAAGAAGAGGCUUGGCUUCAGAG	358	3298	3320
AD-53828.1	A-110713.1	UGAAGCCAAGCCUUCUUA	138	A-109581.2	UUAAGAAGAGGCUUGGCUUCAGA	359	3299	3321
AD-53752.1	A-110661.1	GAAGCCAAGCCUUCUUA	139	A-109477.2	AGUAAGAAGAGGCUUGGCUUCAG	360	3300	3322
AD-53758.1	A-110662.1	AAGCCAAGCCUUCUUA	140	A-109479.2	AAGUAAGAAGAGGCUUGGCUUCA	361	3301	3323
AD-53834.1	A-110714.1	AGUGAGGCGGGGAAAGGGGAAA	141	A-109583.2	UUUCCCUUCCAGCCUACUUGU	362	3355	3377
AD-53764.1	A-110663.1	GUGAGGCGGGGAAAGGGGAAACA	142	A-109481.2	UGUCCCUUCCAGCCUACUUG	363	3356	3378
AD-53770.1	A-110664.1	GGCUGGGGAAAGGGGAAACAGAGA	143	A-109483.2	UCUGUGUCCCUUCCAGCCUC	364	3360	3382
AD-53776.1	A-110665.1	GAAGGGGAAACAGACCAGGA	144	A-109485.2	UCCUGGUCUGUGUCCCUUCCC	365	3366	3388
AD-53782.1	A-110666.1	AAGGGGAAACAGACCAGGAA	145	A-109487.2	UUCUGGUCUGUGUCCCUUCC	366	3367	3389
AD-53794.1	A-110715.1	AGGGGAAACAGACCAGGAAA	146	A-109585.2	UUUCCUGGUCUGUGUCCCUUCC	367	3368	3390
AD-53788.1	A-110667.1	GGGAACACAGACCAGGAAGCU	147	A-109489.2	AGCUCCUGGUCUGUGUCCCU	368	3370	3392
AD-53747.1	A-110668.1	ACUGUCCUCCUUGAGCACCA	148	A-109491.2	UGGUGCUAAGGAGGGACAGUUG	369	3509	3531
AD-53753.1	A-110669.1	CCAGCCCCCAAGCAAGCA	149	A-109493.2	UGCUGCUUGGUGGGGCUUGGUG	370	3527	3549
AD-53759.1	A-110670.1	CCCCACCAAGCAAGCAGACA	150	A-109495.2	UGCUGCUUGCUUGGGUGGGGCU	371	3531	3553
AD-53765.1	A-110671.1	CCCACCAAGCAAGCAGACAU	151	A-109497.2	AUGUCUGCUUGCUUGGGUGGGG	372	3532	3554
AD-53771.1	A-110672.1	CCACCAAGCAAGCAGACAU	152	A-109499.2	AAUGUCUGCUUGCUUGGGUGGG	373	3533	3555
AD-53777.1	A-110673.1	CACCAAGCAAGCAGACAUUU	153	A-109501.2	AAAUGUCUGCUUGCUUGGGUGGG	374	3534	3556
AD-53783.1	A-110674.1	ACCAAGCAAGCAGACAUUA	154	A-109503.2	UAAAUGUCUGCUUGCUUGGGUGG	375	3535	3557
AD-53789.1	A-110675.1	CCAAGCAAGCAGACAUUAU	155	A-109505.2	AUAAAUGUCUGCUUGCUUGGGUG	376	3536	3558
AD-53800.1	A-110716.1	CCAAGCAAGCAGACAUUAU	156	A-109587.2	AAUAAAUGUCUGCUUGCUUGGGU	377	3537	3559
AD-53748.1	A-110676.1	CAAGCAAGCAGACAUUAUCU	157	A-109507.2	AGAUAAAUGUCUGCUUGCUUGGG	378	3538	3560
AD-53754.1	A-110677.1	AAGCAAGCAGACAUUAUCU	158	A-109509.2	AAGAUAAAUGUCUGCUUGCUUGG	379	3539	3561
AD-53760.1	A-110678.1	AGCAAGCAGACAUUAUCUU	159	A-109511.2	AAAGAUAAAUGUCUGCUUGCUUG	380	3540	3562
AD-53806.1	A-110717.1	CAAGCAGACAUUAUCUUUU	160	A-109589.2	AAAAAGAUAAAUGUCUGCUUGCU	381	3542	3564
AD-56975.1	A-116394.4		160	A-109589.5		381		
AD-56976.1	A-116407.1		160	A-109589.11		381		
AD-56977.1	A-116406.2		160	A-109589.11		381		
AD-56978.1	A-116418.1		160	A-109589.18		381		
AD-56979.1	A-116393.1	Аналогичная	160	A-109589.6	Аналогичная	381	Аналог	Анал

AD-56980.1	A-116408.1		160	A-109589.12		381	ичная	огичн
AD-56981.1	A-116419.1		160	A-109589.19		381		ая
AD-56982.1	A-116426.1		160	A-109589.19		381		
AD-56983.1	A-116400.1		160	A-109589.7		381		
AD-56984.1	A-116409.1		160	A-109589.13		381		
AD-56985.1	A-116420.1		160	A-109589.20		381		
AD-56986.1	A-116428.1		160	A-109589.20		381		
AD-56986.2	A-116428.2		160	A-109589.17		381		
AD-56987.1	A-116410.1		160	A-109589.14		381		
AD-56988.1	A-116421.1		160	A-109589.21		381		
AD-56989.1	A-116430.1		160	A-109589.21		381		
AD-56990.1	A-116432.1		160	A-109589.9		381		
AD-56991.1	A-116415.1		160	A-109589.15		381		
AD-56992.1	A-116434.1		160	A-109589.15		381		
AD-56993.1	A-116416.1		160	A-109589.16		381		
AD-56994.1	A-116436.1		160	A-109589.22		381		
AD-56995.1	A-116417.1	Аналогичная	160	A-109589.17	Аналогичная	381		
AD-56996.1	A-116438.1		160	A-109589.17		381	Аналог	Анал
AD-56997.1	A-116450.1		160	A-109589.17		381	ичная	огичн
AD-56998.1	A-116471.1		160	A-109589.17		381		ая
AD-56999.1	A-116479.2		160	A-109589.17		381		
AD-57000.1	A-116492.3		160	A-109589.17		381		
AD-57001.1	A-116440.1		160	A-109589.17		381		
AD-57002.1	A-116452.1		160	A-109589.17		381		
AD-57003.1	A-116460.1		160	A-109589.17		381		
AD-57004.1	A-116473.1		160	A-109589.17		381		
AD-57005.1	A-116486.1		160	A-109589.17		381		
AD-57006.1	A-116494.3		160	A-109589.17		381		
AD-57007.1	A-116442.1		160	A-109589.17		381		
AD-57008.1	A-116453.1		160	A-109589.17		381		
AD-57009.1	A-116462.1		160	A-109589.17		381		
AD-57010.1	A-116475.1		160	A-109589.17		381		
AD-57011.1	A-116488.1		160	A-109589.17		381		
AD-57012.1	A-116498.1		160	A-109589.17		381		
AD-57013.1	A-116444.1		160	A-109589.17		381		
AD-57014.1	A-116454.1		160	A-109589.17		381		
AD-57015.1	A-116464.1		160	A-109589.17		381		
AD-57016.1	A-116477.1		160	A-109589.17		381		
AD-57017.1	A-116490.1		160	A-109589.17		381		
AD-57018.1	A-116500.1		160	A-109589.17		381		
AD-57019.1	A-116446.1		160	A-109589.17		381		
AD-57020.1	A-116455.1		160	A-109589.23		381		
AD-57021.1	A-116481.1		160	A-109589.23		381		
AD-57022.1	A-116448.1		160	A-109589.23		381		
AD-57023.1	A-116467.1		160	A-109589.23		381		
AD-57024.1	A-116483.1		160	A-109589.23		381		
AD-57025.1	A-116449.1		160	A-109589.23		381		
AD-57026.1	A-116457.1		160	A-109589.23		381		
AD-57027.1	A-116469.1		160	A-109589.23		381		
AD-53812.1	A-110718.1	AAGCAGACAUUUUUCUUUUGA	161	A-109591.2	UCAAAGAUAAAUGUCUGCUUGC	382	3543	3565
AD-53818.1	A-110719.1	AGCAGACAUUUUUCUUUUGGA	162	A-109593.2	UCCAAAAGAUAAAUGUCUGCUUG	383	3544	3566
AD-53766.1	A-110679.1	GCAGACAUUUUUCUUUUGGGU	163	A-109513.2	ACCCAAAAGAUAAAUGUCUGCUU	384	3545	3567

## 037110

AD-53772.1	A-110680.1	AGACAUUUUAUCUUUUGGGUCU	164	A-109515.2	AGACCCAAAAGAUAAAUGUCUGC	385	3547	3569
AD-53824.1	A-110720.1	GACAUUUUAUCUUUUGGGUCUU	165	A-109595.2	AAGACCCAAAAGAUAAAUGUCUG	386	3548	3570
AD-53778.1	A-110681.1	ACAUUUUAUCUUUUGGGUCUGU	166	A-109517.2	ACAGACCCAAAAGAUAAAUGUCU	387	3549	3571
AD-53784.1	A-110682.1	UUUAUCUUUUGGGUCUGUCCU	167	A-109519.2	AGGACAGACCCAAAAGAUAAAUG	388	3552	3574
AD-53829.1	A-110721.1	UUUAUCUUUUGGGUCUGUCCUU	168	A-109597.2	AAGGACAGACCCAAAAGAUAAAU	389	3553	3575
AD-53790.1	A-110683.1	UAUCUUUUGGGUCUGUCCUCU	169	A-109521.2	AGAGGACAGACCCAAAAGAUAAA	390	3554	3576
AD-53835.1	A-110722.1	AUCUUUUGGGUCUGUCCUCUU	170	A-109599.2	AAGAGGACAGACCCAAAAGAUAA	391	3555	3577
AD-53796.1	A-110684.1	UCUUUUGGGUCUGUCCUCUCU	171	A-109523.2	AGAGAGGACAGACCCAAAAGAUAA	392	3556	3578
AD-53802.1	A-110685.1	UUUUGGGUCUGUCCUCUCUGU	172	A-109525.2	ACAGAGAGGACAGACCCAAAAGA	393	3558	3580
AD-53808.1	A-110686.1	UUUUGGGUCUGUCCUCUCUGUU	173	A-109527.2	AACAGAGAGGACAGACCCAAAAG	394	3559	3581
AD-53795.1	A-110723.1	UUGGGUCUGUCCUCUCUGUUU	174	A-109601.2	AAACAGAGAGGACAGACCCAAA	395	3560	3582
AD-53801.1	A-110724.1	UGGGUCUGUCCUCUCUGUUGA	175	A-109603.2	UCAACAGAGAGGACAGACCCAAA	396	3561	3583
AD-53807.1	A-110725.1	GGGUCUGUCCUCUCUGUUGCA	176	A-109605.2	UGCAACAGAGAGGACAGACCCAA	397	3562	3584
AD-53814.1	A-110687.1	GGUCUGUCCUCUCUGUUGCCU	177	A-109529.2	AGGCAACAGAGAGGACAGACCCA	398	3563	3585
AD-53820.1	A-110688.1	GUCUGUCCUCUCUGUUGCCUU	178	A-109531.2	AAGGCAACAGAGAGGACAGACCC	399	3564	3586
AD-53825.1	A-110689.1	UCUGUCCUCUCUGUUGCCUUU	179	A-109533.2	AAAGGCAACAGAGAGGACAGACC	400	3565	3587
AD-53831.1	A-110690.1	CUGUCCUCUCUGUUGCCUUUU	180	A-109535.2	AAAAGGCAACAGAGAGGACAGAC	401	3566	3588
AD-53791.1	A-110691.1	UGUCCUCUCUGUUGCCUUUUU	181	A-109537.2	AAAAAGGCAACAGAGAGGACAGAA	402	3567	3589
AD-53797.1	A-110692.1	GUCUCUCUCUGUUGCCUUUUUA	182	A-109539.2	UAAAAAGGCAACAGAGAGGACAG	403	3568	3590
AD-48400.1	A-98247.2	UUUUUCUAGACCUUUUUGCUU	183	A-93455.4	AAGCAAAACAGGUCUAGAAAAGU	404	3597	3619
AD-53830.1	A-110872.1			A-110873.1				
AD-53803.1	A-110693.1	UUUCUAGACCUUUUUGCUUU	184	A-109541.2	AAAGCAAAACAGGUCUAGAAAAG	405	3598	3620
AD-53809.1	A-110694.1	UUCUAGACCUUUUUGCUUUU	185	A-109543.2	AAAAGCAAAACAGGUCUAGAAA	406	3599	3621
AD-53813.1	A-110726.1	UCUAGACCUUUUUGCUUUUU	186	A-109607.2	AAAAAGCAAAACAGGUCUAGAAA	407	3600	3622
AD-53815.1	A-110695.1	CUAGACCUUUUUGCUUUUGU	187	A-109545.2	ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	408	3601	3623
AD-56610.1	A-115523.2		187	A-115525.1		408		
AD-56611.1	A-115533.2	Аналогичная	187	A-115534.1	Аналогичная	408		Аналогичная
AD-56612.1	A-115536.2		187	A-115540.3		408		
AD-56613.1	A-115538.3		187	A-115541.5		408		
AD-56614.1	A-110695.9		187	A-115548.1		408		
AD-56615.1	A-110695.5		187	A-115519.1		408		
AD-56616.1	A-115523.3		187	A-115526.1		408		
AD-56617.1	A-115535.1		187	A-109545.7		408		
AD-56618.1	A-115537.2		187	A-115540.4		408		
AD-56619.1	A-115539.3		187	A-115541.6		408		
AD-56620.1	A-115542.2		187	A-115548.2		408		
AD-56621.1	A-115520.1		187	A-115519.2		408		
AD-56622.1	A-115527.1		187	A-115526.2		408		
AD-56623.1	A-115536.1		187	A-109545.8		408		
AD-56624.1	A-115538.2		187	A-115540.5		408		
AD-56625.1	A-115542.1		187	A-109545.12		408		
AD-56626.1	A-115543.2		187	A-115548.3		408		
AD-56627.1	A-115521.1		187	A-115519.3		408		
AD-56628.1	A-115527.2		187	A-115528.1		408		
AD-56629.1	A-115537.1		187	A-109545.9		408		
AD-56630.1	A-115539.2		187	A-115540.6		408		
AD-56631.1	A-115543.1		187	A-109545.13		408		
AD-56632.1	A-115544.2		187	A-115548.4		408		
AD-56633.1	A-115520.2		187	A-109545.6		408		
AD-56634.1	A-115529.1		187	A-115530.1		408		
AD-56635.1	A-115538.1		187	A-109545.10		408		
AD-56636.1	A-110695.8		187	A-115541.1		408		

AD-56637.1	A-115544.1	Аналогичная	187	A-109545.14	Аналогичная	408		
AD-56638.1	A-115545.2		187	A-115548.5		408		
AD-56639.1	A-115520.3		187	A-115522.1		408		
AD-56640.1	A-115529.2		187	A-115531.1		408		
AD-56641.1	A-115539.1		187	A-109545.11		408		
AD-56642.1	A-115535.3		187	A-115541.2		408		
AD-56643.1	A-115545.1		187	A-109545.15		408		
AD-56644.1	A-115546.2		187	A-115548.6		408		
AD-56645.1	A-110695.6		187	A-115522.2		408		
AD-56646.1	A-115529.3		187	A-115532.1		408		
AD-56647.1	A-110695.7		187	A-115540.1		408		
AD-56648.1	A-115536.3		187	A-115541.3		408		
AD-56649.1	A-115546.1		187	A-109545.16		408		
AD-56650.1	A-115547.2		187	A-115548.7		408		
AD-56651.1	A-115523.1		187	A-115524.1		408		
AD-56652.1	A-115533.1		187	A-115532.2		408		
AD-56653.1	A-115535.2		187	A-115540.2		408		
AD-56654.1	A-115537.3		187	A-115541.4		408		
AD-56655.1	A-115547.1		187	A-109545.17		408		
AD-56656.1	A-110695.10		187	A-115549.1		408		
AD-56657.1	A-115550.1		187	A-115551.1		408		
AD-56658.1	A-115564.1		187	A-115565.1		408		
AD-56659.1	A-110695.12		187	A-115579.1		408		
AD-56662.1	A-115542.3		187	A-115549.2		408		
AD-56663.1	A-115552.1	187	A-115553.1	408				
AD-56664.1	A-115566.1	187	A-115567.1	408				
AD-56668.1	A-115543.3	Аналогичная	187	A-115549.3	Аналогичная	408		
AD-56669.1	A-115554.1		187	A-115555.1		408		
AD-56670.1	A-115568.1		187	A-115569.1		408		
AD-56673.1	A-115544.3		187	A-115549.4		408		
AD-56674.1	A-115556.1		187	A-115557.1		408		
AD-56678.1	A-115545.3		187	A-115549.5		408		
AD-56679.1	A-115558.1		187	A-115559.1		408		
AD-56680.1	A-115572.1		187	A-115573.1		408		
AD-56683.1	A-115546.3		187	A-115549.6		408		
AD-56684.1	A-115560.1		187	A-115561.1		408		
AD-56685.1	A-115574.1		187	A-115575.1		408		
AD-56688.1	A-115547.3		187	A-115549.7		408		
AD-56689.1	A-115535.4		187	A-115562.1		408		
AD-56690.1	A-115542.4		187	A-115576.1		408		
AD-56693.1	A-115520.4		187	A-115563.1		408		
AD-56694.1	A-115577.1		187	A-115578.1		408		
AD-53821.1	A-110696.1	UAGACCGUUUUGCUUUUGUA	188	A-109547.2	UACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	409	3602	3624
AD-56660.1	A-115594.1	AGACCGUUUUGCUUUUGU	189	A-115595.1	ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	410	3603	3623
AD-56661.1	A-115580.2	Аналогичная	189	A-115610.1	Аналогичная	410		
AD-56665.1	A-115580.1		189	A-115581.1		410		
AD-56666.1	A-115596.1		189	A-115597.1		410		
AD-56667.1	A-115611.1		GACCGUUUUGCUUUUGU	190		A-115612.1	ACAAAAGCAAAACAGGUCAUA	411
AD-56671.1	A-115582.1	AGACCGUUUUGCUUUUGU	191	A-115583.1	ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	412	3603	3623
AD-56672.1	A-115598.1	Аналогичная	191	A-115599.1	Аналогичная	412		
AD-56676.1	A-115584.1		191	A-115585.1		412		
AD-56677.1	A-115600.1		191	A-115601.1		412		
								Аналог

AD-56681.1	A-115586.1	Аналогичная	191	A-115587.1	Аналогичная	412	ичная	огичная
AD-56682.1	A-115602.1		191	A-115603.1		412		
AD-56686.1	A-115588.1		191	A-115589.1		412		
AD-56687.1	A-115604.1		191	A-115605.1		412		
AD-56691.1	A-115590.1		191	A-115591.1		412		
AD-56692.1	A-115606.1		191	A-115607.1		412		
AD-56695.1	A-115592.1		191	A-115593.1		412		
AD-56696.1	A-115608.1		191	A-115609.1		412		
AD-53826.1	A-110697.1		UUUUGUAACUUGAAGAUUUU	192		A-109549.2		
AD-53832.1	A-110698.1	UUUGUAACUUGAAGAUUUUA	193	A-109551.2	UAAAUAUCUUCAGUUACAAAAG	414	3617	3639
AD-53792.1	A-110699.1	UUGUAACUUGAAGAUUUUUU	194	A-109553.2	AUAAAUAUCUUCAGUUACAAA	415	3618	3640
AD-53798.1	A-110700.1	UGUAACUUGAAGAUUUUUUU	195	A-109555.2	AAUAAAUAUCUUCAGUUACAAA	416	3619	3641
AD-53819.1	A-110727.1	GUAACUUGAAGAUUUUUUU	196	A-109609.2	AAAUAUCUUCAGUUACAAA	417	3620	3642
AD-53815.1		CUAGACCUUUUGUUUUUU	197		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	418	3601	
AD-57928.40		Аналогичная	197		Аналогичная	418		
AD-59182.5			197			418		
AD-59184.3			197			418		
AD-59186.3			197			418		
AD-59171.13			197			418		
AD-59176.7			197			418		
AD-59170.7			197			418		
AD-59175.7		Аналогичная	197		Аналогичная	418		
AD-59179.7			197			418		
AD-59218.1			197			418		
AD-59222.1			197			418		
AD-59226.1			197			418		
AD-59230.1			197			418		
AD-59235.1			197			418		
AD-59207.1			197			418		
AD-59211.1			197			418		
AD-59215.1			197			418		
AD-59219.1			197			418		
AD-59223.1			197			418		
AD-59181.5			197			418		
AD-59172.5			197			418		
AD-59177.5		197		418				
AD-59180.5		197		418				
AD-59183.5		197		418				
AD-59185.5		197		418				

AD-59173.5			197			418						
AD-59232.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUUGU	198		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	419	3600					
AD-59236.1		Аналогичная	198		Аналогичная	419	Аналогичная					
AD-59216.1			198			419						
AD-59220.1			198			419						
AD-59224.1			198			419						
AD-59228.1			198			419						
AD-59233.1			198			419						
AD-59237.1			198			419						
AD-59209.1			198			419						
AD-59208.1			198			419						
AD-59212.1			CUAGACCUGUUUUGCUUUUGU	199				ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	420	3600		
AD-59210.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUUGU	200		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	421	3601					
AD-59214.1		AGACCGUUUUGCUUUUGU	201		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	422	3603					
AD-59227.1		Аналогичная	201		Аналогичная	422						
AD-59231.1			201			422						
AD-59198.3			201			422						
AD-59200.3			201			422						
AD-59203.3			201			422						
AD-59204.3		Аналогичная	201		Аналогичная	422						
AD-59188.3			201			422						
AD-59191.3			201			422						
AD-59213.1			201			422						
AD-59217.1			201			422						
AD-59221.1			201			422						
AD-59225.1			201			422						
AD-59229.1			201			422						
AD-59234.1			201			422						
AD-59238.1			201			422						
AD-59241.1			201			422						
AD-59245.1			201			422						
AD-59250.1			201			422						
AD-59246.1			CUAGACCUGUUUUGCUUUUGU	202					ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	423	3602	
AD-59253.2			UAGACCUGUUUUGCUUUUGU	203					ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	424	3602	
AD-59242.1		AGACCGUUUUGCUUUUGU	204		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	425	3602					
AD-59253.1		UAGACCUGUUUUGCUUUUGU	205		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	426	3602					

AD-59258.1		UAGACCGUUUUGCUUUUGU	206		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGA	427	3602	
AD-59251.1		CUAGACCGUUUUGCUUUUGU	207		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	428	3603	
AD-59256.1		UAGACCGUUUUGCUUUUGU	208		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	429	3604	
AD-59260.1		AGACCGUUUUGCUUUUGU	209		ACAAAAGCAAAACAGGUCU	430	3605	
AD-59248.1		GACCGUUUUGCUUUUGU	210		ACAAAAGCAAAACAGGUCU	431	3605	
AD-59247.1		GACCGUUUUGCUUUUGU	211		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	432	3604	
AD-59252.1		AGACCGUUUUGCUUUUGU	212		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	433	3604	
AD-59257.1		UAGACCGUUUUGCUUUUGU	213		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	434	3604	
AD-59261.1		AGACCGUUUUGCUUUUGU	214		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	435	3603	
AD-59262.1		UAGACCGUUUUGCUUUUGU	215		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	436	3603	
AD-59265.1		CUAGACCGUUUUGCUUUUGU	216		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	437	3603	
AD-59196.13		UAGACCGUUUUGCUUUUGU	217		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	438	3601	
AD-59189.11		AGACCGUUUUGCUUUUGU	218		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	439	3601	
AD-59190.3		UCUAGACCGUUUUGCUUUUGU	219		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	440	3601	
AD-59192.3		UUUAGACCGUUUUGCUUUUGU	220		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA	441	3601	
AD-59240.1			220			441		
AD-59244.1			220			441		
AD-59202.7		Аналогичная	220		Аналогичная	441	Аналогичная	
AD-59195.5			220			441		
AD-59249.1			220			441		
AD-59254.1			220			441		
AD-59259.1			220			441		
AD-59264.1			220			441		
AD-59264.2			220			441		
AD-59255.1			220			441		
AD-57928.1			220			441		
AD-58893.1			220			441		
AD-58894.1			220			441		
AD-58895.1			220			441		
AD-58896.1			220			441		
AD-58897.1			220			441		
AD-58898.1			220			441		
AD-58899.1			220			441		
AD-58900.1		CAAGCAGACAUUUAUCUUUUU	221		AAAAAGAUAAAUGUCUGCUUGCU	442	N/A	
AD-58902.1		UUUUCUAGACCGUUUUGCUU	222		AAGCAAAACAGGUCUAGAAAAGU	443	3597	

		AGACCGUUUUGCUUUUGU	223		ACAAAAGCAAACAGGUCUAG	444		
		AGACCGUUUUGCUUUUGU	224		ACAAAAGCAAACAGGUCUAG	445		
		AGACCGUUUUGCUUUUGU	225		ACAAAAGCAAACAGGUCUAG	446		
		AGACCGUUUUGCUUUUGU	226		ACAAAAGCAAACAGGUCUAG	447		
		AGACCGUUUUGCUUUUGU	227		ACAAAAGCAAACAGGUCUAG	448		
		AGACCGUUUUGCUUUUGU	228		ACAAAAGCAAACAGGUCUAG	449		
		CUAGACCGUUUUGCUUUUGU	229		ACAAAAGCAAACAGGUCUAGAA	450		
		Аналогичная	229		Аналогичная	450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
		AGACCGUUUUGCUUUUGU	230		ACAAAAGCAAACAGGUCUAG	451		
		AGACCGUUUUGCUUUUGU	231		ACAAAAGCAAACAGGUCUAG	452		
		CUAGACCGUUUUGCUUUUGU	232		ACAAAAGCAAACAGGUCUAGAA	453		
		Аналогичная	232		Аналогичная	453		
			232			453		
			232			453		
			232			453		
			232			453		
		CUAGACCGUUUUGCUUUUGU	233		ACAAAAGCAAACAGGUCUAGAA	454		
		Аналогичная	233		Аналогичная	454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
		Аналогичная	233		Аналогичная	454		
			233			454		





AD-53657.1	A-110559.1	CfAfuGfuCfGfAfcUfaCfaUfcGfaGfAfl96	469	776	A-109273.2	uCfcUfcGfaUfgUfGafCfAfuGfGfGfsc	1020
AD-53658.1	A-110567.1	CfuGfGfUfgGfaGfGfUfgUfaUfcUfcCfuAfl96	470	897	A-109289.2	uAfgGfaGfaUfaCfaccUfcCfaCfcAfgsGfsc	1021
AD-53659.1	A-110575.1	AfgAfcAfcCfaGfCfAfuAfcAfgUfgAfl96	471	917	A-109305.2	uCfaCfuCfuGfuAfuUfgUfgGfuGfuCfusAfsG	1022
AD-53660.1	A-110583.1	CfaGfGfUfcUfaUfgGfUfcCfaCfcGfaCfuUfl96	472	956	A-109321.2	aAfgUfcGfGfUfgAfcUfgAfcCfcUfGfsc	1023
AD-53702.1	A-110590.1	CfuGfcGfcGfuGfCfUfcAfaCfuGfcCfaAfl96	473	1110	A-109335.2	uUfgGfcAfgUfgGfagcAfcGfcGfcAfgsGfsc	1024
AD-53703.1	A-110598.1	AfgGfcCfuGfGfAfcUfuUfaUfuCfGfAfl96	474	1160	A-109351.2	uUfcCfGfAfaUfaAfaCfcAfgCfcUfGfsc	1025
AD-53704.1	A-110606.1	CfaAfcUfuUfgGfCfCfGfUfuGfuGfGfAfl96	475	1421	A-109367.2	uCfcAfcAfcAfgCfGgcCfaAfaGfuUfGfsc	1026
AD-53705.1	A-110614.1	GfuUfgAfgGfcAfgAfcUfcUfgAfuCfcAfl96	476	1592	A-109383.2	uGfgAfuCfaGfuCfuccGfcCfuCfaAfcUfsc	1027
AD-53706.1	A-110622.1	GfgUfaCfuGfaCfCfCfcCfaAfcCfuGfGfUfl96	477	1664	A-109399.2	aCfcAfgGfuUfgGfGgcUfcAfgUfaCfcsCfsg	1028
AD-53707.1	A-110630.1	CfuUfuUfgGfGfUfgAfgGfUfgUfcUfl96	478	1903	A-109415.2	aGfaCfaCfcCfuCfaccCfcCfaAfaAfgsCfsg	1029
AD-53661.1	A-110544.1	AfcCfcCfuGfcGfCfCfaAfgGfaUfcCfGfUfl96	479	556	A-109243.2	aCfGfaUfcCfuUfgGfcAfgCfGfGfsc	1030
AD-53663.1	A-110560.1	UfcGfaCfuAfcAfuCfGfAfgGfaGfAfcUfl96	480	781	A-109275.2	aGfuCfcUfcCfuGfGfaUfgUfcGfsc	1031
AD-53664.1	A-110568.1	GfgUfgGfaGfUfgUfaUfcUfcUfgAfl96	481	899	A-109291.2	uCfuAfgGfaGfaUfaCfcUfcCfaCfsc	1032
AD-53665.1	A-110576.1	CfaCfcAfgCfaUfAfcCfaGfaGfaCfcAfl96	482	920	A-109307.2	uGfgUfcAfcUfcUfguaUfgCfuGfGfUfsc	1033
AD-53666.1	A-110584.1	GfgUfcAfuGfUfAfcAfcCfGfAfcUfcAfl96	483	959	A-109323.2	uCfGfaGfuCfGfGfGfaCfcAfuGfaCfcsCfsc	1034
AD-53708.1	A-110591.1	CfGfUfcCfuCfaAfcUfcCfCfaGfGfaAfl96	484	1115	A-109337.2	uUfcCfcUfuGfGfGfGfUfgAfgCfcsCfsg	1035
AD-53709.1	A-110599.1	GfgCfcUfgGfaGfUfuUfuUfcUfgAfaAfl96	485	1161	A-109353.2	uUfuCfcGfaUfaAfaUfcCfaGfCfcsUfsc	1036
AD-53710.1	A-110607.1	UfuGfGfCfcGfUfGfUfgUfgGfaCfcUfcUfl96	486	1426	A-109369.2	aGfaGfgUfcCfaCfaccGfcGfCfcsAfsG	1037
AD-53711.1	A-110615.1	UfgAfgGfcAfgAfcUfcUfgAfuCfcAfcUfl96	487	1594	A-109385.2	aGfuGfgAfuCfaGfuccCfuGfcCfuCfasAfc	1038
AD-53712.1	A-110623.1	GfuUfgGfcAfgCfuUfuUfgCfaGfAfl96	488	1717	A-109401.2	uCfcUfgCfaAfaAfcCfuGfcCfaCfcsCfsc	1039
AD-53713.1	A-110631.1	UfuUfuGfGfGfUfgUfgGfGfuGfuCfuAfl96	489	1904	A-109417.2	uAfgAfcAfcCfuUfcCfcCfaAfaAfgsGfsc	1040
AD-53667.1	A-110545.1	GfcUfgCfGfCfaAfcGfAfuCfcGfGfAfl96	490	559	A-109245.2	uCfcAfcGfAfuCfuccGfGfGfGfsc	1041
AD-53668.1	A-110553.1	AfuAfcCfuCfaCfCfAfaGfaUfcCfuGfcAfl96	491	680	A-109261.2	uGfcAfgGfaUfcUfuggUfgAfgGfuAfcUfsc	1042
AD-53669.1	A-110561.1	AfcUfaCfaUfcGfAfgGfAfgGfaCfuCfcUfl96	492	784	A-109277.2	aGfgAfgUfcCfuCfuccGfaUfgUfaGfsc	1043
AD-53670.1	A-110569.1	UfgGfaGfUfgUfaUfcUfcCfuAfgAfl96	493	901	A-109293.2	uGfuCfuAfgGfaGfaUfaCfcUfcCfsc	1044
AD-53671.1	A-110577.1	UfaCfaGfaGfGfAfcAfcCfGfGfAfl96	494	928	A-109309.2	uUfuCfcCfGfGfGfGfAfcUfcUfgUfsc	1045
AD-53672.1	A-110585.1	UfcAfuGfGfUfcAfcCfGfAfcUfcAfl96	495	961	A-109325.2	uCfuCfGfAfaGfGfGfGfaCfcAfuGfsc	1046
AD-53714.1	A-110592.1	CfaCfcCfuCfaUfAfgGfCfcUfgGfaGfuUfl96	496	1151	A-109339.2	aAfcUfcCfaGfGfCfuccUfgAfgGfUfsc	1047
AD-53715.1	A-110600.1	GfcCfuGfGfUfuUfuUfcUfgGfaAfaAfl96	497	1162	A-109355.2	uUfuUfcCfGfAfaUfaaCfuCfcAfgGfsc	1048
AD-53716.1	A-110608.1	UfgGfcCfGfGfUfGfUfgGfGfCfuCfuUfl96	498	1427	A-109371.2	aAfgAfgGfuCfcAfcaccAfgCfGfCfasAfsa	1049
AD-53717.1	A-110616.1	GfaGfgCfaGfaGfAfcUfcUfcCfuUfl96	499	1595	A-109387.2	aAfgUfgGfaUfcAfgUfcUfcUfcUfsc	1050
AD-53718.1	A-110624.1	UfgGfcAfgCfuGfUfuUfgCfaGfAfl96	500	1719	A-109403.2	aGfuCfcUfgCfaAfaaccAfgCfuGfcCfasAfc	1051
AD-53719.1	A-110632.1	GfgGfgUfgAfgGfUfgUfgUfaCfGfAfl96	501	1909	A-109419.2	uGfgCfGfUfaGfaCfaccCfuCfaCfcCfcsCfsc	1052
AD-53674.1	A-110554.1	CfaCfcAfaGfaUfcCfGfGfAfuGfuCfuUfl96	502	686	A-109263.2	aAfgAfcAfuGfcAfggUfcUfuGfGfUfsc	1053
AD-53675.1	A-110562.1	UfaCfaUfcGfaGfGfAfgGfaCfuCfcUfl96	503	786	A-109279.2	aGfaGfgAfgUfcCfuccUfcGfaUfgUfsc	1054
AD-53676.1	A-110570.1	AfgGfuGfuAfuCfUfcUfcUfaGfaCfaAfl96	504	904	A-109295.2	uGfgUfgUfcUfaGfGgAfuAfcAfcUfsc	1055
AD-53677.1	A-110578.1	AfcAfgAfgUfgAfcCfCfaCfcGfGfaAfaUfl96	505	929	A-109311.2	aUfuUfcCfcGfUfgGfCfaCfuCfuGfsc	1056
AD-53678.1	A-110586.1	AfgGfaCfGfGfAfcCfcGfCfuCfcAfaAfl96	506	994	A-109327.2	uGfuGfgAfaGfcGfGgcCfcUfcCfsc	1057
AD-53720.1	A-110593.1	AfcCfcUfcAfuAfcGfGfCfuGfGfUfuUfl96	507	1152	A-109341.2	aAfaCfuCfcAfgGfCfuAfuGfGfGfsc	1058
AD-53721.1	A-110601.1	GfgAfgUfuUfaUfCfGfGfaAfaAfl96	508	1166	A-109357.2	uGfgCfuUfuUfcGfGfaUfaCfuCfcsAfsG	1059
AD-53722.1	A-110609.1	GfgCfcGfcUfgUfgUfgGfaCfcUfcUfl96	509	1428	A-109373.2	aAfaGfaGfgUfcCfaccCfaGfcGfCfsc	1060
AD-53723.1	A-110617.1	GfgCfaGfaGfaCfuUfgGfaCfuUfcUfl96	510	1597	A-109389.2	aGfaAfgUfgUfcUfcUfcUfcUfsc	1061
AD-53724.1	A-110625.1	GfcAfgCfuGfuUfuUfgCfaGfAfl96	511	1721	A-109405.2	aCfaGfuCfuUfgCfaaAfcAfgCfuGfsc	1062
AD-53725.1	A-110633.1	GfgGfuGfaGfGfUfgGfUfcAfcCfaAfl96	512	1910	A-109421.2	uUfgGfcGfuAfgAfcaccCfcUfcAfcCfsc	1063
AD-53679.1	A-110547.1	CfuAfcGfuGfGfUfgGfUfcUfgAfaAfl96	513	593	A-109249.2	uCfcUfuCfaGfcAfcaccCfaAfcGfGfsc	1064
AD-53680.1	A-110555.1	CfaAfgAfuCfcUfGfCfaUfgUfcUfcAfl96	514	689	A-109265.2	uGfgAfaGfaCfaUfgGfGfAfuCfuUfsc	1065
AD-53681.1	A-110563.1	UfcGfaGfGfAfgAfcUfcUfcUfcUfl96	515	790	A-109281.2	aGfaCfaGfaGfGfGfGfCfuCfcUfcUfsc	1066
AD-53682.1	A-110571.1	GfuAfuCfuCfcUfAfgGfaCfaCfcAfl96	516	908	A-109297.2	aUfgCfuGfGfUfcUfcAfgAfuAfcUfsc	1067
AD-53683.1	A-110579.1	GfaGfuGfaCfcAfcCfGfGfAfaAfl96	517	932	A-109313.2	uCfGfaUfuUfcCfGfGfUfcUfcUfsc	1068
AD-53684.1	A-110587.1	CfGfGfAfcCfcGfCfuUfcCfaAfcAfl96	518	998	A-109329.2	uGfuCfuGfuAfgAfgGfGfCfcUfsc	1069
AD-53726.1	A-110594.1	CfcCfuCfaUfaGfGfCfcUfgGfaGfuAfl96	519	1153	A-109343.2	uAfaAfcUfcCfaGfGfCfuUfgAfgGfsc	1070
AD-53727.1	A-110602.1	GfuUfuAfuUfcGfGfAfaAfaGfcCfaAfl96	520	1169	A-109359.2	aGfcUfgGfCfuUfuUfuccGfaAfuAfcUfsc	1071
AD-53728.1	A-110610.1	UfgUfgUfgGfaCfcUfcUfcUfcAfl96	521	1434	A-109375.2	uGfgGfGfAfaGfGfGfUfcCfaCfsc	1072
AD-53729.1	A-110618.1	CfaGfaGfaCfuGfAfuCfaCfuUfcUfl96	522	1599	A-109391.2	aGfaGfaAfgUfgGfGfUfcUfcUfsc	1073
AD-53730.1	A-110626.1	UfcUfgCfcGfGfCfCfcAfcAfcCfuUfl96	523	1885	A-109407.2	aAfgCfuUfuGfGfGfCfcGfGfGfsc	1074
AD-53731.1	A-110634.1	GfgUfgAfgUfgUfgUfcUfaCfGfCfaAfl96	524	1911	A-109423.2	aAfuGfgCfGfUfgGfaccCfcCfuCfsc	1075
AD-53685.1	A-110548.1	CfcCfcGfGfGfGfAfuAfcCfuCfaAfl96	525	670	A-109251.2	uGfgUfgAfgGfuAfuCfcCfcGfGfsc	1076

AD-53687.1	A-110564.1	CfgAfgGfaGfgAfcUfcCfuGfuCfuUfl96	526	791	A-109283.2	aAfgAfcAfgAfgGfgGfcUfcCfuCfGsAfsu	1077
AD-53688.1	A-110572.1	UfaUfcUfcCfuAfgAfcAfcCfaGfcAfaUfl96	527	909	A-109299.2	uAfuGfcUfgGfuGfucuAfgGfaGfaUfasCfsa	1078
AD-53689.1	A-110580.1	GfgAfaAfuCfgAfgGfgCfaGfgGfuCfaUfl96	528	944	A-109315.2	aUfgAfcCfuUfgCfcuGfgAfuUfcCfsCfsg	1079
AD-53690.1	A-110588.1	UfcCfaCfaGfaCfAfgGfgCfcAfgAfaUfl96	529	1009	A-109331.2	aCfuUfgCfuGfgCfcuGfgUfgUfgGfasAfsG	1080
AD-53732.1	A-110595.1	CfcUfcAfuAfgGfcCfuGfgAfgUfuUfaUfl96	530	1154	A-109345.2	aUfaAfaCfuCfaAfgGfcCfuAfuGfaGfgsGfsu	1081
AD-53733.1	A-110603.1	GfgGfcUfgGfgGfcUfcUfgCfuGfgUfcAfl96	531	1279	A-109361.2	uGfaCfcAfgCfaAfgGfcCfcCfaGfcCfcsUfsc	1082
AD-53734.1	A-110611.1	GfgGfaGfgAfcAfuCfaUfuGfgUfgCfuUfl96	532	1456	A-109377.2	aGfgCfaCfaAfaUfgauGfuCfcUfcCfcsCfsu	1083
AD-53735.1	A-110619.1	AfcUfgAfuCfcAfcUfcUfuCfuGfcCfaAfl96	533	1604	A-109393.2	uUfgGfcAfgAfgAfgGfgAfuCfaGfasCfsu	1084
AD-53736.1	A-110627.1	CfuGfcCfgGfgCfcCfaCfaAfcGfcUfuUfl96	534	1886	A-109409.2	aAfaGfcGfuUfgUfgGfcCfcGfgAfcAfsC	1085
AD-53737.1	A-110635.1	AfgGfgUfgUfcUfAfcUfcAfuUfgCfaAfl96	535	1915	A-109425.2	uGfgCfaAfuGfgCfcuGfaCfaCfcCfcsCfsa	1086
AD-53691.1	A-110549.1	CfcGfcCfgGfgGfaUfaCfcUfcAfaAfl96	536	671	A-109253.2	uUfgGfuGfaGfgUfaucCfcCfcGfgGfgsGfsc	1087
AD-53692.1	A-110557.1	GfuUfgCfcCfaUfcUfgUfgAfcUfaCfaUfl96	537	770	A-109269.2	aUfgUfaGfuCfaAfcUfgGfgCfaAfcUfsu	1088
AD-53693.1	A-110565.1	GfuAfcCfcGfgCfcGfgAfaUfaCfaAfl96	538	857	A-109285.2	uGfgUfaUfuCfaUfcGfcCfcGfgUfaAfcCfsg	1089
AD-53694.1	A-110573.1	UfcUfcCfuAfgAfcAfcCfaAfaAfaAfl96	539	911	A-109301.2	uGfuAfuGfcUfgGfgUfcAfgGfaGfasUfsa	1090
AD-53695.1	A-110581.1	AfaUfcGfaGfgGfcAfgGfgUfcAfuUfl96	540	947	A-109317.2	aCfcUfaGfaCfcCfcGfcUfcUfaUfsUfsc	1091
AD-53738.1	A-110596.1	CfuCfaUfaGfgCfcUfcUfgGfaGfuUfuUfl96	541	1155	A-109347.2	aAfuAfaAfcUfcCfcGfcCfcUfaUfgAfgsGfsg	1092
AD-53739.1	A-110604.1	GfgUfcAfcCfcUfcUfgCfcGfgAfaCfuUfl96	542	1295	A-109363.2	aAfgUfuGfcGfgGfgCfcGfgUfaCfcsAfsG	1093
AD-53740.1	A-110612.1	AfcUfgCfaGfcAfcUfcUfuGfgUfgUfl96	543	1483	A-109379.2	aCfaCfaAfaGfaAfgGfgUfcGfaGfasCfsg	1094
AD-53741.1	A-110620.1	AfuCfaAfcUfcUfcUfcGfcCfaAfaGfaUfl96	544	1608	A-109395.2	aUfcUfuUfgGfgAfgAfaGfuGfgAfcCfsa	1095
AD-53742.1	A-110628.1	GfcCfcAfaCfaCfcGfcUfuUfgGfgGfgUfl96	545	1893	A-109411.2	aCfcCfcCfaAfaAfgGfcUfuGfgGfcCfsc	1096
AD-53743.1	A-110636.1	GfuGfuCfuAfcGfcCfaUfuGfcCfaGfgUfl96	546	1918	A-109427.2	aCfcUfgGfcAfaUfgGfcGfuAfcAfcCfsc	1097
AD-53744.1	A-110644.1	GfgAfaUfgCfaAfaGfgUfcAfaGfaAfl96	547	2180	A-109443.2	uGfcUfcCfuUfgAfcUfcUfcCfcsAfsG	1098
AD-53745.1	A-110652.1	UfgAfuGfgCfcUfcUfaUfcUfcCfaGfcUfl96	548	2906	A-109459.2	aGfcUfgGfaGfaUfgGfgGfgCfaCfasGfsc	1099
AD-53746.1	A-110660.1	CfuGfaAfgCfcAfaGfgCfcUfuUfcUfaAfl96	549	3300	A-109475.2	uAfaGfaAfgAfgGfcUfcUfcAfgsAfsG	1100
AD-53747.1	A-110668.1	AfcUfgUfcCfcUfcCfuUfgAfgCfaCfaAfl96	550	3511	A-109491.2	uGfgUfgCfuCfaAfgGfgGfaCfaGfusUfsg	1101
AD-53748.1	A-110676.1	CfaAfgCfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfl96	551	3540	A-109507.2	aGfaUfaAfaUfgUfcuGfcUfcUfgsGfsg	1102
AD-53790.1	A-110683.1	UfaUfcUfuUfuGfgGfgCfuGfuCfcUfcUfl96	552	3556	A-109521.2	aGfaGfgAfcAfgAfcCfaAfaGfaUfasAfsa	1103
AD-53791.1	A-110691.1	UfgUfcCfuCfuUfcUfgUfgCfuUfuUfl96	553	3569	A-109537.2	aAfaAfaGfgCfaAfcagAfgAfgCfasGfsa	1104
AD-53792.1	A-110699.1	UfuGfuAfaCfuUfgGfaGfaUfaUfuUfl96	554	3620	A-109553.2	aUfaAfaUfaUfcUfcaAfgUfuAfcAfasAfsa	1105
AD-53793.1	A-110707.1	CfuUfuAfcUfcUfcCfuUfuAfgCfaAfl96	555	3055	A-109569.2	uUfgGfcAfuAfgAfgGfaGfaAfgsGfsu	1106
AD-53794.1	A-110715.1	AfgGfgGfaAfaCfaAfcAfcAfcCfaAfaAfl96	556	3370	A-109585.2	uUfuCfcUfgGfuCfuGfuUfcCfcCfcsUfsc	1107
AD-53795.1	A-110723.1	UfuGfgGfuCfuGfuCfcUfcUfcUfgUfl96	557	3562	A-109601.2	aAfaCfaGfaGfaGfgacAfgAfcCfaAfasAfsa	1108
AD-53749.1	A-110637.1	UfgCfaGfcGfuCfcAfcAfcAfcCfuCfaAfl96	558	1962	A-109429.2	uGfgAfgCfuGfuGfgGfcUfcUfcCfasGfsu	1109
AD-53750.1	A-110645.1	AfaUfcCfcGfgCfcCfcUfcAfgGfaGfaAfl96	559	2204	A-109445.2	uGfcUfcCfuGfaGfgGfcCfcGfgGfaUfcsCfsc	1110
AD-53751.1	A-110653.1	UfuUfcUfgGfaUfgGfgAfuCfuAfcAfl96	560	2974	A-109461.2	uGfgCfuAfgAfuGfcUfcCfaGfaAfasGfsc	1111
AD-53752.1	A-110661.1	GfaAfgCfcAfaGfcCfcUfuUfuAfcUfl96	561	3302	A-109477.2	aGfuAfaGfaAfgAfgGfcUfuGfgCfuUfcsAfsG	1112
AD-53753.1	A-110669.1	CfcAfgCfcCfcAfcCfaAfaGfaGfaAfl96	562	3529	A-109493.2	uGfcUfuGfcUfuGfgGfgCfuGfgsUfsg	1113
AD-53754.1	A-110677.1	AfaGfcAfaGfaGfcAfcAfaUfuUfuUfl96	563	3541	A-109509.2	aAfgAfuAfaAfuGfuGfcUfuGfcUfcsGfsg	1114

AD-53796.1	A-110684.1	UfcUfuUfuGfgUfUfcUfuCfcUfcUfuUfl96	564	3558	A-109523.2	aGfaGfaGfgAfcAfgacCfcAfaAfaGfasUfsa	1115
AD-53797.1	A-110692.1	GfuCfcUfcUfcUfGfUfuGfcCfuUfuUfuAfl96	565	3570	A-109539.2	uAfaAfaAfgGfcAfaGfaGfaGfgAfcAfsG	1116
AD-53798.1	A-110700.1	UfgUfaAfcUfuGfAfaGfcAfuUfuUfuUfl96	566	3621	A-109555.2	aAfuAfaAfuUfuCfuUfaAfaGfuUfaCfasAfsa	1117
AD-53799.1	A-110708.1	UfuUfaCfuCfuGfcUfcUfaUfgCfcAfaAfl96	567	3056	A-109571.2	uCfuGfgCfaUfaGfagcAfgAfgUfaAfasGfsg	1118
AD-53800.1	A-110716.1	CfcAfaGfcAfaGfCfAfgAfcAfuUfuUfuUfl96	568	3539	A-109587.2	aAfuAfaAfuGfuCfuUfuGfcUfuGfgsGfsu	1119
AD-53801.1	A-110724.1	UfgGfgUfcUfgUfcCfuCfuGfuUfgAfl96	569	3563	A-109603.2	uCfaAfcAfgAfgAfgAfgAfgAfcCfcAfsa	1120
AD-53755.1	A-110638.1	GfcAfuGfgGfgAfcCfcUfuCfuCfcAfuUfl96	570	1996	A-109431.2	aGfuGfgAfcAfcGfggCfcCfcAfuGfcsUfsg	1121
AD-53757.1	A-110654.1	UfcUfgGfaUfgGfcUfuCfuAfgCfcAfaAfl96	571	2976	A-109463.2	uCfuGfgCfuAfgAfgCfcAfuCfcAfasAfsa	1122
AD-53758.1	A-110662.1	AfaGfcCfaAfgCfcUfuCfuUfaCfuUfl96	572	3303	A-109479.2	aAfgUfaAfgAfaGfaggCfuUfgGfcUfusCfsa	1123
AD-53759.1	A-110670.1	CfcCfcAfcCfcAfaGfcAfaGfcAfaAfl96	573	3533	A-109495.2	uGfuCfuGfcUfuGfcuGfgGfuGfgGfscfsu	1124
AD-53760.1	A-110678.1	AfgCfaAfgCfaGfCfAfuUfaUfuUfuUfl96	574	3542	A-109511.2	aAfaGfaUfaAfaUfgucUfgCfuUfgCfusUfsg	1125
AD-53802.1	A-110685.1	UfuUfuGfgGfuCfuUfgUfcUfcUfuUfl96	575	3560	A-109525.2	aCfaGfaGfaGfcAfgAfcCfcAfaAfasGfsa	1126
AD-53803.1	A-110693.1	UfuUfcUfaGfaCfcUfgUfuUfuGfcUfuUfl96	576	3600	A-109541.2	aAfaGfcAfaAfaCfaggUfcUfaGfaAfasAfsG	1127
AD-53804.1	A-110701.1	AfcCfaAfgGfaGfCfGfcGfuUfuUfuUfl96	577	2815	A-109557.2	aAfaGfaAfuCfcUfgUfcCfuUfgGfusGfsg	1128
AD-53805.1	A-110709.1	UfcAfgCfcAfaCfcCfcUfuCfcAfuUfl96	578	3161	A-109573.2	uUfaGfuGfgAfgCfaggUfuGfgCfuGfasGfsa	1129
AD-53806.1	A-110717.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuUfaUfuUfuUfl96	579	3544	A-109589.2	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfuUfgCfusUfsg	1130
AD-53807.1	A-110725.1	GfgGfuCfuGfuCfcUfcUfuUfgUfcAfl96	580	3564	A-109605.2	uGfcAfaCfaGfaGfaggAfcAfgAfcCfcAfsa	1131
AD-53761.1	A-110639.1	CfcCfaCfaAfgCfcCfcUfuGfuGfcUfgAfl96	581	2080	A-109433.2	uCfaGfcAfcAfgGfgCfuUfgUfgGfgsUfsg	1132
AD-53762.1	A-110647.1	GfcUfgGfgGfcUfgAfgCfuUfaAfaUfl96	582	2481	A-109449.2	aUfuUfaAfaAfgCfuGfcCfcCfaGfcsCfsc	1133
AD-53763.1	A-110655.1	GfcUfcUfaUfgCfcAfgGfcUfgUfcUfl96	583	3064	A-109465.2	uAfgCfaCfaGfcCfcUfaUfaGfaGfcsAfsG	1134
AD-53764.1	A-110663.1	GfuGfaGfgCfuGfgGfaAfgGfgGfaAfl96	584	3358	A-109481.2	uGfuUfcCfcUfuUfccAfgCfcUfcAfcUfsg	1135
AD-53765.1	A-110671.1	CfcCfaCfcCfaAfgCfcAfgCfaCfaUfl96	585	3534	A-109497.2	aUfgUfcUfgCfuUfgcuUfgGfgUfgGfgsGfsc	1136
AD-53766.1	A-110679.1	GfcAfgAfcAfuUfuUfaCfuUfuUfgGfgUfl96	586	3547	A-109513.2	aCfcCfaAfaAfgAfaaaAfuGfuCfuGfcsUfsu	1137
AD-53808.1	A-110686.1	UfuUfgGfgUfcUfgUfcUfuCfuCfuUfl96	587	3561	A-109527.2	aAfcAfgAfgAfgGfagGfaCfcCfaAfasAfsG	1138
AD-53809.1	A-110694.1	UfuCfuAfgAfcCfuUfuUfgCfuUfuUfl96	588	3601	A-109543.2	aAfaAfgCfaAfaAfcagGfuCfuAfgAfasAfsa	1139
AD-53810.1	A-110702.1	GfgAfgGfcAfgGfAfuUfuUfcCfcAfuUfl96	589	2820	A-109559.2	aAfuGfgGfaAfgAfaucCfuGfcCfuCfcsUfsu	1140
AD-53811.1	A-110710.1	CfcUfgCfcAfaGfcUfcAfcAfcAfaAfl96	590	3247	A-109575.2	uUfgCfuGfuGfuGfagcUfuGfgCfaGfcsCfsa	1141
AD-53812.1	A-110718.1	AfaGfcAfgAfcAfuUfuUfuCfuUfuUfl96	591	3545	A-109591.2	uCfaAfaAfgAfuAfaauGfuGfcUfusGfsc	1142
AD-53813.1	A-110726.1	UfcUfaGfaCfcUfgUfuUfuGfcUfuUfl96	592	3602	A-109607.2	aAfaAfaGfcAfaAfaGfgUfcUfaGfasAfsa	1143
AD-53767.1	A-110640.1	GfaGfgCfcAfcGfAfgUfcAfgCfcAfl96	593	2099	A-109435.2	uUfgGfgCfuGfaCfcucGfuGfgCfcUfcsAfsG	1144
AD-53768.1	A-110648.1	GfgAfgGfuGfcCfAfgGfgAfaGfcCfcUfl96	594	2650	A-109451.2	aGfgGfaGfcUfuCfcugGfcAfcCfuCfcsAfsG	1145
AD-53769.1	A-110656.1	CfuCfaGfcCfaAfcCfcGfcUfcCfaCfuAfl96	595	3160	A-109467.2	uAfgUfgGfaGfcGfgguUfgGfcUfgAfgAfsG	1146
AD-53770.1	A-110664.1	GfgCfuGfgGfaAfgGfgGfaAfcAfcAfl96	596	3362	A-109483.2	uCfuGfuGfuUfcCfcUfcCfcAfgCfcsUfsc	1147
AD-53771.1	A-110672.1	CfcAfcCfaAfaGfcAfaGfcAfaAfl96	597	3535	A-109499.2	aAfuGfuCfuGfcUfugCfuUfgGfuGfgsGfsg	1148
AD-53772.1	A-110680.1	AfgAfcAfuUfuUfcUfuUfgGfgUfcUfl96	598	3549	A-109515.2	aGfaCfcCfaAfaAfgauAfaAfuGfuCfusGfsc	1149
AD-53814.1	A-110687.1	GfgUfcUfgUfcUfuUfuUfgCfuUfl96	599	3565	A-109529.2	aGfgCfaAfcAfgAfgGfaCfaGfaCfcsCfsa	1150
AD-53815.1	A-110695.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfl96	600	3603	A-109545.2	aCfaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuAfgsAfsa	1151
AD-53816.1	A-110703.1	GfaGfgCfaGfAfuUfuUfcCfcUfaAfl96	601	2821	A-109561.2	uCfaUfgGfgAfaGfaauCfcUfgCfcUfcsCfsu	1152

AD-53817.1	A-110711.1	CfcAfaGfcUfcAfcAfcAfcGfcAfaAfl96	602	3251	A-109577.2	uUfuCfcUfgCfuGfuguGfaGfcUfuGfscCfsa	1153
AD-53818.1	A-110719.1	AfgCfaGfaCfaUfUfUfaUfcUfuUfgAfl96	603	3546	A-109593.2	uCfcAfaAfaGfaUfaaaUfgUfcUfgCfusUfsg	1154
AD-53819.1	A-110727.1	GfuAfaCfuUfgAfaGfaUfaUfuUfl96	604	3622	A-109609.2	aAfaUfaAfaUfUfuCfaAfgUfuAfcAfsa	1155
AD-53773.1	A-110641.1	CfaCfaGfcUfcAfcAfcCfcAfaCfcAfl96	605	2104	A-109437.2	aCfuGfgUfuGfgGfcAfcUfcUfgUfsc	1156
AD-53774.1	A-110649.1	AfcUfgUfgGfgGfcAfuUfuCfaCfcAfuUfl96	606	2676	A-109453.2	aAfuGfgUfgAfaUfgCfcCfaCfaGfusGfsa	1157
AD-53776.1	A-110665.1	GfaAfgGfgGfaAfcAfcAfcAfcAfl96	607	3368	A-109485.2	uCfcUfgGfuCfuGfuguUfcCfcUfuUfsc	1158
AD-53777.1	A-110673.1	CfaCfcCfaAfcAfcAfcAfcAfaUfuUfl96	608	3536	A-109501.2	aAfaUfgUfcUfgCfuugCfuUfgGfgUfsc	1159
AD-53778.1	A-110681.1	AfcAfuUfuAfuCfuUfuUfgGfgUfcUfl96	609	3551	A-109517.2	aCfaGfaCfcCfaAfaaGfaUfaUfuUfsc	1160
AD-53820.1	A-110688.1	GfuCfuGfcUfcUfcUfgUfcUfcUfl96	610	3566	A-109531.2	aAfgGfcAfaCfaGfaaGfgAfcAfcCfsc	1161
AD-53821.1	A-110696.1	UfaGfaCfcUfgUfuUfuGfcUfuUfl96	611	3604	A-109547.2	uAfcAfaAfaGfaAfaaCfaGfgUfcUfsc	1162
AD-53822.1	A-110704.1	CfuUfuCfuGfgAfuUfgGfgCfaUfcAfl96	612	2973	A-109563.2	uGfcUfaGfaUfgCfcuUfcAfaAfcCfsc	1163
AD-53823.1	A-110712.1	AfaGfcUfcAfcAfcAfcAfcAfaUfl96	613	3253	A-109579.2	aAfgUfcUfcUfgCfuGfuGfaGfcUfsc	1164
AD-53824.1	A-110720.1	GfaCfaUfuUfaUfcUfuUfgGfgCfuUfl96	614	3550	A-109595.2	aAfgAfcCfaAfaAfaUfaUfgUfsc	1165
AD-48400.4	A-98247.3	UfuUfuCfuAfcAfcCfuGfuUfuUfl96	615		A-93455.5	aAfgCfaAfaAfcAfcGfuCfuAfaAfcCfsc	1166
AD-53779.1	A-110642.1	GfgGfaGfgCfcAfcAfcCfaCfcUfl96	616	2137	A-109439.2	aAfgCfuUfgUfgUfgCfcUfcCfsc	1167
AD-53780.1	A-110650.1	CfcAfcCfaAfcAfcAfcCfaGfaUfuUfl96	617	2813	A-109455.2	aGfaAfuCfcUfgCfcuUfuUfgGfgUfsc	1168
AD-53781.1	A-110658.1	GfcCfaAfcCfuAfcAfcCfaGfaAfl96	618	3250	A-109471.2	uUfcCfuGfcUfgUfgUfgAfcUfgCfsc	1169
AD-53782.1	A-110666.1	AfaGfgGfgAfaCfaCfaGfaCfcAfl96	619	3369	A-109487.2	uUfcCfuGfgUfgUfgUfuCfcUfsc	1170
AD-53783.1	A-110674.1	AfcCfaAfaGfcAfcAfcAfcAfuUfl96	620	3537	A-109503.2	uAfaAfuGfuCfuGfcuUfgUfgGfusGfsc	1171
AD-53784.1	A-110682.1	UfuUfaUfcUfuUfgGfgCfuGfuUfl96	621	3554	A-109519.2	aGfgAfcAfcAfcCfaAfaGfaUfaAfcUfsc	1172
AD-53825.1	A-110689.1	UfcUfgUfcCfuUfcUfcUfgCfcUfl96	622	3567	A-109533.2	aAfaGfgCfaAfcAfcAfcAfcCfaGfsc	1173
AD-53826.1	A-110697.1	UfuUfuGfuAfaCfuUfgAfaGfaUfuUfl96	623	3618	A-109549.2	aAfaUfaUfcUfuCfaaGfuUfaAfcGfsc	1174
AD-53827.1	A-110705.1	UfuCfuGfgAfuGfgCfaUfaGfcCfaAfl96	624	2975	A-109565.2	uUfgGfcUfaGfaUfgCfcAfaAfcAfcUfsc	1175
AD-53828.1	A-110713.1	UfgAfaGfcCfaAfcAfcUfcUfuUfl96	625	3301	A-109581.2	uUfaAfgAfaGfaGfgCfuUfcAfcGfsc	1176
AD-53829.1	A-110721.1	UfuAfuCfuUfuUfgGfgUfcUfl96	626	3555	A-109597.2	aAfgGfaCfaGfaCfcAfaAfcAfaAfcUfsc	1177
AD-53830.1	A-110872.1	UfuUfuCfuAfcAfcCfuGfuUfuUfl96	627		A-110873.1	aAfgCfaAfaAfcAfcGfuUfaAfcAfcUfsc	1178
AD-53785.1	A-110643.1	AfuCfcAfcGfcUfUfcUfgCfcUfl96	628	2148	A-109441.2	aUfgGfcAfcCfaGfaaGfcUfgGfgUfsc	1179
AD-53786.1	A-110651.1	CfaCfcAfaGfgAfcAfcAfcGfaUfuUfl96	629	2814	A-109457.2	aAfgAfaUfcUfcGfcuUfuUfgUfsc	1180
AD-53787.1	A-110659.1	CfaAfcCfuCfaAfcAfcAfcAfcUfl96	630	3252	A-109473.2	aGfuUfcCfuGfcUfgUfgAfcUfsc	1181
AD-53788.1	A-110667.1	GfgGfaAfcAfcAfcAfcCfaGfaGfcUfl96	631	3372	A-109489.2	aGfcUfuCfcUfgGfuUfuUfcCfcUfsc	1182
AD-53789.1	A-110675.1	CfcCfaAfcCfaAfcAfcCfaCfaUfuUfl96	632	3538	A-109505.2	aUfaAfaUfgUfcUfgCfuUfgGfgUfsc	1183
AD-53831.1	A-110690.1	CfuGfuCfcUfcUfcUfgUfcUfuUfl96	633	3568	A-109535.2	aAfaAfgGfcAfaCfaaGfaGfgAfcAfcUfsc	1184
AD-53832.1	A-110698.1	UfuUfgUfaAfcUfgAfaAfcAfuUfl96	634	3619	A-109551.2	uAfaAfuUfuUfcUfaaGfuUfaAfcAfcUfsc	1185
AD-53833.1	A-110706.1	CfuGfgAfuGfgCfaUfcUfcAfaAfl96	635	2977	A-109567.2	uUfcUfgGfcUfaGfaaCfcAfcAfcAfcUfsc	1186
AD-53834.1	A-110714.1	AfgUfgAfcGfcUfgGfgAfaGfgAfaAfl96	636	3357	A-109583.2	uUfuCfcCfuUfcCfcAfcCfuCfaAfcUfsc	1187
AD-53835.1	A-110722.1	AfuCfuUfuUfgGfgUfcUfcUfl96	637	3557	A-109599.2	aAfgAfgGfaCfaAfaaCfaAfaAfcUfsc	1188
AD-48399.1	A-100981.1	CfaCfuUfaCfcUfgGfaGfuAfcUfl96	638		A-100982.1	uCfcAfaGfuUfcUfcAfcUfaAfcUfsc	1189
AD-53815.5	A-110695.11	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	639	3603	A-109545.18	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1190
AD-53815.4	A-110695.4	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	640	3603	A-109545.5	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1191
AD-56633.1	A-115520.2	cuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	641	3603	A-109545.6	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1192
AD-56617.1	A-115535.1	CfuagAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	642	3603	A-109545.7	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1193
AD-56623.1	A-115536.1	CfuagAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	643	3603	A-109545.8	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1194
AD-56629.1	A-115537.1	CfuagAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	644	3603	A-109545.9	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1195
AD-56635.1	A-115538.1	CfuagAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	645	3603	A-109545.10	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1196
AD-56641.1	A-115539.1	CfuagAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	646	3603	A-109545.11	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1197
AD-56625.1	A-115542.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	647	3603	A-109545.12	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1198
AD-56631.1	A-115543.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	648	3603	A-109545.13	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1199
AD-56637.1	A-115544.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	649	3603	A-109545.14	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1200
AD-56643.1	A-115545.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	650	3603	A-109545.15	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1201
AD-56649.1	A-115546.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	651	3603	A-109545.16	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1202
AD-56655.1	A-115547.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	652	3603	A-109545.17	aCfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1203
AD-56615.1	A-110695.5	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	653	3603	A-115519.1	acaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1204
AD-56621.1	A-115520.1	cuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	654	3603	A-115519.2	acaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1205
AD-56627.1	A-115521.1	cuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	655	3603	A-115519.3	acaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1206
AD-56639.1	A-115520.3	cuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfl96	656	3603	A-115522.1	ACfaAfaAfcCfaAfaaCfcAfcUfsc	1207

AD-56645.1	A-110695.6	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	657	3603	A-115522.2	ACfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1208
AD-56651.1	A-115523.1	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	658	3603	A-115524.1	(iA)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1209
AD-56610.1	A-115523.2	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	659	3603	A-115525.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1210
AD-56616.1	A-115523.3	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	660	3603	A-115526.1	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1211
AD-56622.1	A-115527.1	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	661	3603	A-115526.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1212
AD-56628.1	A-115527.2	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	662	3603	A-115528.1	(iA)caAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1213
AD-56634.1	A-115529.1	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	663	3603	A-115530.1	AbCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1214
AD-56640.1	A-115529.2	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	664	3603	A-115531.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1215
AD-56646.1	A-115529.3	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	665	3603	A-115532.1	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1216
AD-56652.1	A-115533.1	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	666	3603	A-115532.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1217
AD-56611.1	A-115533.2	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	667	3603	A-115534.1	(iA)caAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1218
AD-56647.1	A-110695.7	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	668	3603	A-115540.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1219
AD-56653.1	A-115535.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	669	3603	A-115540.2	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1220
AD-56612.1	A-115536.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	670	3603	A-115540.3	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1221
AD-56618.1	A-115537.2	CfuagAfcuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	671	3603	A-115540.4	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1222
AD-56624.1	A-115538.2	CfuagAfcuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	672	3603	A-115540.5	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1223
AD-56630.1	A-115539.2	CfuagaccuGfUfUfuUfgcuuuuugUfL96	673	3603	A-115540.6	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1224
AD-56636.1	A-110695.8	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	674	3603	A-115541.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1225
AD-56642.1	A-115535.3	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	675	3603	A-115541.2	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1226
AD-56648.1	A-115536.3	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	676	3603	A-115541.3	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1227
AD-56654.1	A-115537.3	CfuagAfcuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	677	3603	A-115541.4	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1228
AD-56613.1	A-115538.3	CfuagAfcuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	678	3603	A-115541.5	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1229
AD-56619.1	A-115539.3	CfuagaccuGfUfUfuUfgcuuuuugUfL96	679	3603	A-115541.6	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1230
AD-56614.1	A-110695.9	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	680	3603	A-115548.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1231
AD-56620.1	A-115542.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	681	3603	A-115548.2	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1232
AD-56626.1	A-115543.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	682	3603	A-115548.3	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1233
AD-56632.1	A-115544.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	683	3603	A-115548.4	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1234
AD-56638.1	A-115545.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	684	3603	A-115548.5	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1235
AD-56644.1	A-115546.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	685	3603	A-115548.6	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1236
AD-56650.1	A-115547.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	686	3603	A-115548.7	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1237
AD-56656.1	A-110695.10	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	687	3603	A-115549.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1238
AD-56662.1	A-115542.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	688	3603	A-115549.2	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1239
AD-56668.1	A-115543.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	689	3603	A-115549.3	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1240
AD-56673.1	A-115544.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	690	3603	A-115549.4	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1241
AD-56678.1	A-115545.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	691	3603	A-115549.5	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1242
AD-56683.1	A-115546.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	692	3603	A-115549.6	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1243
		96					
AD-56688.1	A-115547.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	693	3603	A-115549.7	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1244
AD-56657.1	A-115550.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	694	3603	A-115551.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1245
AD-56663.1	A-115552.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	695	3603	A-115553.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1246
AD-56669.1	A-115554.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	696	3603	A-115555.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1247
AD-56674.1	A-115556.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	697	3603	A-115557.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1248
AD-56679.1	A-115558.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	698	3603	A-115559.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1249
AD-56684.1	A-115560.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	699	3603	A-115561.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1250
AD-56689.1	A-115535.4	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	700	3603	A-115562.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1251
AD-56693.1	A-115520.4	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	701	3603	A-115563.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1252
AD-56658.1	A-115564.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	702	3603	A-115565.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1253
AD-56664.1	A-115566.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	703	3603	A-115567.1	aCfaAfaaagCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1254
AD-56670.1	A-115568.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	704	3603	A-115569.1	aCfaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1255
AD-56680.1	A-115572.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	705	3603	A-115573.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1256
AD-56685.1	A-115574.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	706	3603	A-115575.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1257
AD-56690.1	A-115542.4	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	707	3603	A-115576.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1258
AD-56694.1	A-115577.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	708	3603	A-115578.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1259
AD-56659.1	A-110695.12	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	709	3603	A-115579.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1260

AD-56665.1	A-115580.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	710	3605	A-115581.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1261
AD-56671.1	A-115582.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	711	3605	A-115583.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1262
AD-56676.1	A-115584.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	712	3605	A-115585.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1263
AD-56681.1	A-115586.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	713	3605	A-115587.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1264
AD-56686.1	A-115588.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	714	3605	A-115589.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1265
AD-56691.1	A-115590.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	715	3605	A-115591.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1266
AD-56695.1	A-115592.1	AfgacCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	716	3605	A-115593.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1267
AD-56660.1	A-115594.1	agAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	717	3605	A-115595.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1268
AD-56666.1	A-115596.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	718	3605	A-115597.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1269
AD-56672.1	A-115598.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	719	3605	A-115599.1	aCfaAfaagCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1270
AD-56677.1	A-115600.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	720	3605	A-115601.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1271
AD-56682.1	A-115602.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	721	3605	A-115603.1	aCfaAfaAfgCfaaaacAfgGfuCfusAfsG	1272
AD-56687.1	A-115604.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	722	3605	A-115605.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacagGfuCfusAfsG	1273
AD-56692.1	A-115606.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	723	3605	A-115607.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	1274
AD-56696.1	A-115608.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	724	3605	A-115609.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucusAfsG	1275
AD-56661.1	A-115580.2	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	725	3605	A-115610.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasG	1276
AD-56667.1	A-115611.1	gAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	726	3605	A-115612.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasa	1277
AD-53806.11	A-110717.10	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	727	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1278
AD-53806.13	A-110717.11	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	728	3544	A-109589.10	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1279
AD-53806.12	A-110717.12	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	729	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1280
AD-53806.5	A-110717.4	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	730	3544	A-109589.5	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1281
AD-53806.6	A-110717.5	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	731	3544	A-109589.7	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1282
AD-53806.7	A-110717.6	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	732	3544	A-109589.8	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1283
AD-53806.8	A-110717.7	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	733	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1284
AD-53806.9	A-110717.8	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	734	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1285
AD-53806.10	A-110717.9	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	735	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1286
AD-56979.1	A-116393.1	caAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	736	3544	A-109589.6	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1287
AD-56979.2	A-116393.2	caAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	737	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1288
AD-56975.3	A-116394.1	(i)CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	738	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1289
AD-56975.4	A-116394.2	(i)CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	739	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1290
AD-56975.5	A-116394.3	(i)CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	740	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1291
AD-56975.1	A-116394.4	(i)CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	741	3544	A-109589.5	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1292
AD-56975.2	A-116394.5	(i)CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	742	3544	A-109589.6	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1293
AD-56983.1	A-116400.1	CbaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	743	3544	A-109589.7	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1294
AD-56983.2	A-116400.2	CbaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	744	3544	A-109589.8	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1295
AD-56983.3	A-116400.3	CbaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	745	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1296
AD-56983.4	A-116400.4	CbaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	746	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1297
AD-56983.5	A-116400.5	CbaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	747	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1298

AD-56977.3	A-116406.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	748	3544	A-109589.10	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1299
AD-56977.1	A-116406.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	749	3544	A-109589.11	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1300
AD-56977.2	A-116406.3	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	750	3544	A-109589.18	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1301
AD-56976.1	A-116407.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	751	3544	A-109589.11	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1302
AD-56976.2	A-116407.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	752	3544	A-109589.12	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1303
AD-56980.1	A-116408.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	753	3544	A-109589.12	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1304
AD-56980.2	A-116408.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	754	3544	A-109589.13	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1305
AD-56984.1	A-116409.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfl96	755	3544	A-109589.13	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1306
AD-56984.2	A-116409.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfl96	756	3544	A-109589.14	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1307
AD-56987.1	A-116410.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfl96	757	3544	A-109589.14	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1308
AD-56987.2	A-116410.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfl96	758	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1309
AD-56991.1	A-116415.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaucuuuuUfl96	759	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1310
AD-56993.1	A-116416.1	CfaagcagaCfAfUfuUfaucuuuuUfl96	760	3544	A-109589.16	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1311
AD-56995.1	A-116417.1	CfaagcagaCfAfUfuuuuuuuUfl96	761	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1312
AD-56978.1	A-116418.1	CfaAfgCfcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	762	3544	A-109589.18	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1313
AD-56978.2	A-116418.2	CfaAfgCfcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	763	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1314
AD-56981.1	A-116419.1	CfaAfgCfcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	764	3544	A-109589.19	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1315
AD-56985.1	A-116420.1	CfaAfgCfcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	765	3544	A-109589.20	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1316
AD-56988.1	A-116421.1	CfaAfgCfcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	766	3544	A-109589.21	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1317
AD-56988.2	A-116421.2	CfaAfgCfcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	767	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1318
AD-56988.3	A-116421.3	CfaAfgCfcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	768	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1319
AD-56982.1	A-116426.1	CfaAfgcagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	769	3544	A-109589.19	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1320
AD-56982.2	A-116426.2	CfaAfgcagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	770	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1321
AD-56986.1	A-116428.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	771	3544	A-109589.20	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1322
AD-56986.2	A-116428.2	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	772	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1323
AD-56989.1	A-116430.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	773	3544	A-109589.21	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1324
AD-56990.1	A-116432.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	774	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1325
AD-56992.1	A-116434.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	775	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1326
AD-56992.2	A-116434.2	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	776	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1327
AD-56994.1	A-116436.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfl96	777	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1328
AD-56994.2	A-116436.2	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfl96	778	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1329
AD-56996.1	A-116438.1	caagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	779	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1330
AD-57001.1	A-116440.1	CfaAfgcagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	780	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1331
AD-57007.1	A-116442.1	CfaAfgCfagaCfAfuuuUfcUfuUfuUfl96	781	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1332
AD-57013.1	A-116444.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaucuuUfuUfl96	782	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1333
AD-57019.1	A-116446.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfl96	783	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1334
AD-57022.1	A-116448.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	784	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1335
AD-57025.1	A-116449.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	785	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1336

AD-56997.1	A-116450.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	786	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1337
AD-57002.1	A-116452.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	787	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1338
AD-57008.1	A-116453.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	788	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1339
AD-57014.1	A-116454.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	789	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1340
AD-57020.1	A-116455.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	790	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1341
AD-57020.2	A-116455.2	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	791	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1342
AD-57026.1	A-116457.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	792	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1343
AD-57003.1	A-116460.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	793	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1344
AD-57009.1	A-116462.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	794	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1345
AD-57015.1	A-116464.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	795	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1346
AD-57023.1	A-116467.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	796	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1347
AD-57027.1	A-116469.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	797	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1348
AD-56998.1	A-116471.1	CfaAfgCfagaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	798	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1349
AD-57004.1	A-116473.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	799	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1350
AD-57010.1	A-116475.1	CfaagCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	800	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1351
AD-57016.1	A-116477.1	caAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	801	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1352
AD-56999.2	A-116479.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	802	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1353
AD-56999.1	A-116479.2	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	803	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1354
AD-57021.1	A-116481.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	804	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1355
AD-57024.1	A-116483.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	805	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1356
AD-57005.1	A-116486.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	806	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1357
AD-57011.1	A-116488.1	CfaAfgCfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	807	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1358
AD-57017.1	A-116490.1	CfaAfgCfagaCfAFuFuUfaUfcUfuUfl96	808	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1359
AD-57000.2	A-116492.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUf(Teo)Uf(Teo)Ufl96	809	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1360
AD-57000.3	A-116492.2	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUf(Teo)Uf(Teo)Ufl96	810	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1361
AD-57000.1	A-116492.3	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUf(Teo)Uf(Teo)Ufl96	811	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1362
AD-57006.2	A-116494.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFuFuUf(Aeo)Uf(m5Ce o)Uf(Teo)Uf(Teo)Ufl96	812	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1363
AD-57006.3	A-116494.2	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFuFuUf(Aeo)Uf(m5Ce o)Uf(Teo)Uf(Teo)Ufl96	813	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1364
AD-57006.1	A-116494.3	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFuFuUf(Aeo)Uf(m5Ce o)Uf(Teo)Uf(Teo)Ufl96	814	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1365
AD-57012.1	A-116498.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFuFuUfaUfcUfuUf(Teo)Uf(Teo)Ubl96	815	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1366
AD-57018.1	A-116500.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAFuFuUf(Aeo)Uf(m5Ce o)Uf(Teo)Uf(Teo)Ubl96	816	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1367
AD-53815.1		CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	817	3601		aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1368
AD-57928.40		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	818	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1369
AD-59182.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	819	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1370
AD-59184.3		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	820	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1371
AD-59186.3		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	821	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1372
AD-59171.13		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	822	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1373
AD-59176.7		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	823	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1374
AD-59170.7		CfsusagacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	824	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1375
AD-59175.7		CfsusagacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	825	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1376
AD-59179.7		csusagacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	826	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1377
AD-59218.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	827	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1378
AD-59222.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	828	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1379
AD-59226.1		CfsusagacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	829	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1380
AD-59230.1		CfsusagacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	830	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1381
AD-59235.1		csusagacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	831	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1382
AD-59207.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	832	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1383
AD-59211.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	833	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1384
AD-59215.1		CfsusagacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	834	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1385

AD-59219.1		CfsusagacCfuGfuuuugcuuuuuL96	835	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa	1386
AD-59223.1		csusagacCfuGfuuuugcuuuuuL96	836	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa	1387
AD-59181.5		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	837	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1388
AD-59172.5		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	838	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1389
AD-59177.5		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfusuUfsgsUfl96	839	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1390
AD-59180.5		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfusuUfsgsUfl96	840	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1391
AD-59183.5		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	841	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1392
AD-59185.5		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	842	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1393
AD-59173.5		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	843	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1394
AD-59232.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	844	3600		PasCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1395
AD-59236.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	845	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1396
AD-59216.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	846	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1397
AD-59220.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	847	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1398
AD-59224.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfusuUfsgsUfl96	848	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1399
AD-59228.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfusuUfsgsUfl96	849	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1400
AD-59233.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	850	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1401
AD-59237.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	851	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1402
AD-59209.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	852	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1403
AD-59208.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	853	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1404
AD-59212.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	854	3600		PasCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1405
AD-59210.1		csusAGAccuGuuuuGcuuuuGul96	855	3601		AscsAAAAGcAAAAGGucuuAGsasa	1406
AD-59214.1		AsGsAccuGuuuuGcuuuuGul96	856	3603		AscsAAAAGcAAAAGGucuuAsG	1407
AD-59227.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfusuUfsgsUfl96	857	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1408
AD-59231.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfusuUfsgsUfl96	858	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1409
AD-59198.3		(C3m)usAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	859	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1410
AD-59200.3		(C3m)(U3m)AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	860	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1411
AD-59203.3		(m5Cam)usAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	861	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1412
AD-59204.3		(m5Cam)(Tam)AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	862	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1413
AD-59188.3		(m5Cams)(Tams)AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	863	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1414
AD-59191.3		(m5Cams)usAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	864	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1415
AD-59213.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	865	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m) a	1416
AD-59217.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	866	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)(A 3m)a	1417
AD-59221.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	867	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aam) a	1418
AD-59225.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	868	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Agam)(A am)a	1419
AD-59229.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	869	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aams )a	1420
AD-59234.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	870	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aams)( Aams)a	1421
AD-59238.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	871	3601		(A3m)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1422
AD-59241.1		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfsgsUfl96	872	3601		as(C3m)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1423

AD-59245.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	873	3601	(Aam)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1424
AD-59250.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	874	3601	as(m5Cam)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1425
AD-59246.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	875	3602	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsa	1426
AD-59253.2		usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	876	3602	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsa	1427
AD-59242.1		AfgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	877	3602	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsa	1428
AD-59253.1		usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	878	3602	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsa	1429
AD-59258.1		usagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	879	3602	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsa	1430
AD-59251.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	880	3603	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfg	1431
AD-59256.1		usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	881	3604	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAf	1432
AD-59260.1		AfgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	882	3605	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfusCfsu	1433
AD-59248.1		gsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	883	3605	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfusCfsu	1434
AD-59247.1		gsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	884	3604	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfususa	1435
AD-59252.1		AfgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	885	3604	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfususa	1436
AD-59257.1		usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	886	3604	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfususa	1437
AD-59261.1		AfgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	887	3603	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1438
AD-59262.1		usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	888	3603	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1439
AD-59265.1		csusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	889	3603	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1440
AD-59196.13		usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	890	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1441
AD-59189.11		AfgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	891	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1442
AD-59190.3		usCfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	892	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1443
AD-59192.3		UfsusCfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	893	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1444
AD-59240.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	894	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1445
AD-59244.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	895	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1446
AD-59202.7		(C3m)usagaccuuuuugCfuuuuugL96	896	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1447
AD-59195.5		(C3m)usAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	897	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1448
AD-59249.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	898	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1449
AD-59254.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	899	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1450
AD-59259.1		(C3m)usAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuugL96	900	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1451
AD-59264.1		(C3m)usagaccuuuuugCfuuuuugL96	901	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1452
AD-59264.2		(C3m)usagaccuuuuugCfuuuuugL96	902	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1453
AD-59255.1		CsusaagaccuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	903	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1454
AD-59281.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	904	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1455
AD-58893.1		CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	905	3601	asCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgasa	1456
AD-58894.1		CfusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	906	3601	aCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsaa	1457
AD-58895.1		CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	907	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1458
AD-58896.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	908	3601	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgaa	1459
AD-58897.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	909	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsasa	1460
AD-58898.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	910	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsasa	1461
AD-58899.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	911	3601	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsasa	1462
AD-58900.1		CfsasAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfl96	912	NA	asAfsaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgscsu	1463
AD-58902.1		UfsusUfuCfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	913	3597	asAfgCfaAfaAfcAfgguCfuAfaAfgsu	1464
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	914		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1465
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	915		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1466
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	916		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu(A3mx)g	1467

	(A3mx)gAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	917		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1468
	(A3mx)gAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	918		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1469
	(A3mx)gAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	919		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu(A3mx)g	1470
	(C3mx)(U3mx)AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	920		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1471
	(C3mx)(U3mx)AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	921		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3mx)(A3mx)a	1472
	(C3mx)uAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	922		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1473
	(C3mx)uAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	923		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1474
	(C3mx)uAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	924		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(A3mx)a	1475
	(C3mx)uAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	925		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3mx)(A3mx)a	1476
	(C3mx)uAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	926		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1477
	(Chd)susAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	927		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1478
	(phe)CfsuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	928		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1479
	(phe)CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	929		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1480
	(pshe)CfsuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	930		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1481
	(pshe)CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	931		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1482
	AfsgsAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	932		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1483
	AfsgsAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	933		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu(A3mx)g	1484
	Cfs(Uhd)sAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	934		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1485
	CfsusAfgAf(Chd)CfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	935		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1486
	CfsusAfgAfc(Chd)uGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	936		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1487
	CfsusAfgAfcCf(Uhd)GfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	937		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1488
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	938		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1489
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	939		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1490
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	940		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1491
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	941		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1492
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	942		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1493
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	943		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1494
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	944		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1495
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	945		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1496
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	946		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1497
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	947		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1498
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	948		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1499
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	949		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1500
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	950		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1501
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	951		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1502
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	952		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1503
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	953		(Agn)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1504
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	954		(Agn)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1505
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	955		P(Agn)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1506

	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	956		as(Cgn)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1507
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	957		asCfs(Agn)AfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1508
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	958		asCfsa(Agn)aAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1509
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	959		asCfsaA(Agn)AfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1510
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	960		asCfsaAfa(Agn)gCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1511
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	961		asCfsaAfaAf(Ggn)CfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1512
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	962		asCfsaAfaAfg(Cgn)aAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1513
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	963		asCfsaAfaAfgCf(Agn)AfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1514
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	964		asCfsaAfaAfgCfa(Agn)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1515
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	965		asCfsaAfaAfgCfaAf(Agn)acAfgGfuCfuAfgsas a	1516
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	966		asCfsaAfaAfgCfaAfa(Agn)cAfgGfuCfuAfgsas a	1517
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	967		asCfsaAfaAfgCfaAfaa(Cgn)AfgGfuCfuAfgsas a	1518
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	968		asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfiGfuCfuAfisasa	1519
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	969		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(A3mx) a	1520
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	970		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3mx) a	1521
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	971		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3mx)(A 3mx)a	1522
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	972		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1523
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	973		(A3mx)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1524
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	974		P(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsa sa	1525
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	975		a(C3mx)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1526
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	976		as(C3mx)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas a	1527
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	977		(A3mx)(C3mx)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf gsasa	1528
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	978		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(A3 mx)a	1529
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	979		(A3mx)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A 3mx)a	1530
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	980		(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3 mx)(A3mx)a	1531
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	981		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas(ph e)	1532
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	982		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgaas(ph )	1533
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	983		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgaa(ph e)	1534
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	984		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas(ph )	1535
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	985		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsas(ph e)	1536
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	986		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfga(ph e)	1537
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	987		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGf(Uhd)CfuAfgsas a	1538
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	988		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf(Uhd)Afgsas a	1539
	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	989		asCfsaAfaAfg(Chd)aAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1540

	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	990		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1541
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	991		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1542
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	992		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1543
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	993		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1544
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	994		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1545
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	995		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1546
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	996		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1547
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	997		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1548
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	998		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1549
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	999		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1550
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1000		asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1551
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1001		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1552
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1002		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1553
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1003		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1554
	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1004		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1555
	CfsusAfaAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1005		asCfsaAfaAfcCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1556

Пример 2. Тестирование in vitro и in vivo.

Подгруппу этих дуплексов оценивали на эффективность в анализах со свободным поглощением разовой дозы гепатоцитами макаков-крабоедов. Вкратце, первичные гепатоциты макаков-крабоедов (PCH) обрабатывали конъюгированными модифицированными дуплексами siRNA при трех концентрациях, 500, 100 и 10 нМ. Анализы со свободным поглощением с концентрациями 100 и 10 нМ выполняли дважды и данные представляли как оставшееся среднее количество транскрипта по отношению к контролю  $\pm$  среднее квадратичное отклонение (SD). Тест с 500 нМ выполняли один раз. В табл. 3 показаны результаты этих анализов.

Таблица 3. Тест на эффективность в отношении PCSK9 при помощи свободного поглощения первичными гепатоцитами макаков-крабоедов

ID дуплекса	PCH, 500 нМ	PCH, 100 нМ, средн.	PCH, 10 нМ, средн.	PCH, 100 нМ, SD	PCH, 10 нМ, SD
AD-48399	1,08	1,03	0,98	0,09	0,02
AD-48399	0,97	0,95	1,10	0,03	0,09
AD-48399	0,89	0,98	1,02	0,06	0,06
AD-48399	1,04	1,00	1,01	0,02	0,08
AD-48399	0,92	1,03	0,96	0,02	0,09
AD-48399	1,13	1,03	0,96	0,05	0,01
AD-48400	0,48	0,63	0,90	0,04	0,00
AD-48400.4	0,65	0,78	0,89	0,14	0,13
AD-53649.1	0,96	0,96	1,14	0,02	0,07
AD-53650.1	0,97	0,92	1,15	0,01	0,06
AD-53651.1	1,02	0,98	1,15	0,13	0,10
AD-53652.1	0,83	0,89	1,14	0,20	0,05
AD-53653.1	0,85	0,95	1,26	0,04	0,07
AD-53654.1	0,84	0,93	1,19	0,02	0,13
AD-53656.1	0,92	0,92	1,07	0,05	0,03
AD-53657.1	0,92	0,89	1,02	0,05	0,03
AD-53658.1	0,89	0,83	0,97	0,04	0,14
AD-53659.1	0,79	0,82	1,05	0,06	0,13
AD-53660.1	0,89	0,86	0,98	0,07	0,07
AD-53661.1	0,92	1,03	1,07	0,02	0,04
AD-53663.1	0,88	0,90	1,08	0,03	0,02

## 037110

AD-53664.1	0,95	0,86	1,00	0,09	0,13
AD-53665.1	0,92	0,91	1,05	0,01	0,13
AD-53666.1	0,73	0,80	0,95	0,08	0,02
AD-53667.1	0,95	0,96	1,12	0,06	0,03
AD-53668.1	1,03	0,89	1,17	0,03	0,12
AD-53669.1	1,12	0,90	1,05	0,01	0,15
AD-53670.1	0,85	0,88	1,00	0,06	0,06
AD-53671.1	0,87	0,90	0,93	0,02	0,04
AD-53672.1	0,87	0,86	0,95	0,04	0,16
AD-53674.1	0,69	0,75	0,92	0,08	0,02
AD-53675.1	0,99	0,92	1,17	0,11	0,06
AD-53676.1	0,90	0,87	1,10	0,03	0,08
AD-53677.1	1,22	0,86	1,12	0,10	0,04
AD-53678.1	1,01	0,98	1,03	0,03	0,12
AD-53679.1	0,96	0,85	1,02	0,04	0,11
AD-53680.1	1,21	0,94	0,99	0,03	0,01
AD-53681.1	1,02	0,94	1,01	0,01	0,11
AD-53682.1	0,98	0,90	1,01	0,06	0,11
AD-53683.1	0,95	0,90	1,01	0,02	0,08
AD-53684.1	1,14	1,01	1,01	0,09	0,07
AD-53685.1	0,96	0,92	1,03	0,00	0,07
AD-53687.1	1,31	0,91	1,02	0,02	0,11
AD-53688.1	0,90	0,95	0,96	0,03	0,03
AD-53689.1	0,97	0,95	1,05	0,04	0,07
AD-53690.1	0,82	0,97	0,99	0,13	0,08
AD-53691.1	0,99	1,01	0,97	0,01	0,12
AD-53692.1	1,11	0,91	1,00	0,04	0,03
AD-53693.1	1,02	0,96	1,02	0,04	0,10
AD-53694.1	1,12	0,98	0,97	0,07	0,06
AD-53695.1	0,97	1,04	0,94	0,11	0,08
AD-53696.1	0,85	0,91	1,23	0,10	0,01
AD-53697.1	0,89	0,91	1,06	0,03	0,00
AD-53698.1	0,90	0,86	1,15	0,06	0,01
AD-53699.1	0,84	0,85	1,07	0,00	0,03
AD-53700.1	0,93	1,02	1,21	0,02	0,15

## 037110

AD-53701.1	1,01	0,96	1,12	0,00	0,17
AD-53702.1	0,95	0,94	1,06	0,05	0,15
AD-53703.1	0,82	0,85	1,04	0,07	0,13
AD-53704.1	0,92	0,97	0,94	0,04	0,02
AD-53705.1	0,96	0,98	1,00	0,11	0,15
AD-53706.1	0,90	0,97	1,03	0,01	0,20
AD-53707.1	0,86	0,98	1,11	0,14	0,24
AD-53708.1	1,10	0,94	1,05	0,02	0,15
AD-53709.1	0,79	0,84	1,08	0,01	0,18
AD-53710.1	1,03	0,91	1,06	0,01	0,09
AD-53711.1	0,90	0,90	0,99	0,00	0,28
AD-53712.1	0,97	0,92	0,97	0,00	0,12
AD-53713.1	0,98	0,93	1,07	0,01	0,16
AD-53714.1	1,09	0,86	0,99	0,03	0,09
AD-53715.1	1,04	0,83	0,94	0,06	0,06
AD-53716.1	0,82	0,85	1,02	0,05	0,14
AD-53717.1	0,98	0,94	0,98	0,11	0,12
AD-53718.1	0,89	1,04	1,01	0,18	0,01
AD-53719.1	0,98	1,05	1,05	0,06	0,17
AD-53720.1	1,02	0,88	1,08	0,01	0,15
AD-53721.1	0,88	0,95	1,03	0,07	0,11
AD-53722.1	0,98	0,95	1,01	0,06	0,12
AD-53723.1	0,89	0,89	1,02	0,10	0,06
AD-53724.1	0,98	0,93	1,00	0,13	0,01
AD-53725.1	1,04	1,05	1,09	0,19	0,11
AD-53726.1	0,87	0,88	0,88	0,00	0,02
AD-53727.1	0,82	0,92	1,02	0,05	0,13
AD-53728.1	0,86	0,93	1,06	0,03	0,08
AD-53729.1	0,86	0,81	1,02	0,12	0,03
AD-53730.1	1,01	0,95	1,02	0,07	0,01
AD-53731.1	0,99	0,98	1,00	0,08	0,07
AD-53732.1	0,93	0,86	1,01	0,12	0,11
AD-53733.1	1,06	1,02	1,08	0,05	0,06
AD-53734.1	0,95	0,93	1,04	0,12	0,05
AD-53735.1	1,00	0,93	1,01	0,02	0,06

## 037110

AD-53736.1	0,90	1,09	1,16	0,05	0,01
AD-53737.1	0,94	0,93	1,00	0,02	0,09
AD-53738.1	0,93	0,79	0,93	0,03	0,01
AD-53739.1	1,11	0,90	0,90	0,05	0,00
AD-53740.1	0,86	0,92	0,97	0,08	0,01
AD-53741.1	0,96	0,84	0,92	0,00	0,07
AD-53742.1	1,03	0,93	1,03	0,04	0,06
AD-53743.1	0,92	0,98	1,05	0,08	0,14
AD-53744.1	0,95	1,02	1,03	0,08	0,12
AD-53745.1	0,81	0,99	1,11	0,10	0,18
AD-53746.1	0,65	0,83	1,04	0,07	0,16
AD-53747.1	0,82	0,88	1,02	0,05	0,13
AD-53748.1	0,46	0,59	0,72	0,06	0,07
AD-53749.1	0,93	0,90	1,04	0,12	0,16
AD-53750.1	0,90	1,02	0,97	0,02	0,10
AD-53751.1	0,92	0,87	1,02	0,19	0,16
AD-53752.1	0,73	0,88	0,99	0,06	0,18
AD-53753.1	0,87	0,97	1,06	0,07	0,19
AD-53754.1	0,43	0,58	0,72	0,10	0,05
AD-53755.1	1,01	0,99	1,03	0,03	0,02
AD-53757.1	0,98	0,91	1,07	0,05	0,13
AD-53758.1	0,63	0,73	0,92	0,05	0,00
AD-53759.1	0,91	0,92	0,99	0,02	0,08
AD-53760.1	0,51	0,67	0,80	0,03	0,12
AD-53761.1	0,89	1,07	1,10	0,11	0,18
AD-53762.1	1,06	1,00	0,96	0,12	0,10
AD-53763.1	0,95	1,10	1,00	0,07	0,09
AD-53764.1	0,99	0,94	0,99	0,05	0,16
AD-53765.1	0,92	0,87	0,86	0,09	0,11
AD-53766.1	0,75	0,78	0,86	0,09	0,14
AD-53767.1	1,01	1,02	0,97	0,05	0,18
AD-53768.1	0,89	1,07	0,97	0,09	0,15
AD-53769.1	0,89	1,11	0,95	0,05	0,11
AD-53770.1	0,76	1,01	0,98	0,01	0,12
AD-53771.1	0,70	0,74	0,84	0,06	0,12

## 037110

AD-53772.1	0,72	0,83	0,85	0,04	0,11
AD-53773.1	0,96	1,00	0,98	0,05	0,07
AD-53774.1	0,75	0,92	1,01	0,06	0,14
AD-53776.1	0,78	0,94	0,97	0,11	0,08
AD-53777.1	0,67	0,68	0,74	0,11	0,01
AD-53778.1	0,74	0,73	0,92	0,13	0,14
AD-53779.1	1,00	0,98	0,95	0,14	0,04
AD-53780.1	0,90	0,92	0,98	0,12	0,05
AD-53781.1	0,84	0,95	1,00	0,17	0,06
AD-53782.1	0,87	0,92	0,90	0,11	0,02
AD-53783.1	0,71	0,79	0,78	0,14	0,03
AD-53784.1	0,68	0,82	0,86	0,10	0,10
AD-53785.1	1,10	0,96	0,96	0,09	0,07
AD-53786.1	0,98	0,89	0,95	0,20	0,14
AD-53787.1	1,23	0,93	1,00	0,11	0,21
AD-53788.1	0,95	0,90	0,94	0,17	0,08
AD-53789.1	0,55	0,60	0,78	0,09	0,08
AD-53790.1	0,70	0,91	1,04	0,08	0,16
AD-53791.1	0,47	0,67	0,92	0,12	0,09
AD-53792.1	0,52	0,75	0,89	0,06	0,04
AD-53793.1	0,88	1,03	1,07	0,20	0,09
AD-53794.1	0,85	1,00	1,09	0,17	0,22
AD-53795.1	0,58	0,71	1,00	0,10	0,12
AD-53796.1	0,62	0,78	0,96	0,07	0,12
AD-53797.1	0,72	0,78	0,93	0,12	0,10
AD-53798.1	0,50	0,55	0,76	0,08	0,03
AD-53799.1	0,98	0,92	1,10	0,11	0,21
AD-53800.1	0,59	0,65	0,87	0,15	0,14
AD-53801.1	0,81	0,84	1,05	0,14	0,18
AD-53802.1	0,68	0,79	1,03	0,13	0,13
AD-53803.1	0,51	0,53	0,77	0,09	0,05
AD-53804.1	0,94	0,86	1,05	0,15	0,15
AD-53805.1	0,95	0,93	1,03	0,12	0,19
AD-53806.1	0,38	0,45	0,78	0,05	0,12
AD-53807.1	0,85	0,95	1,15	0,09	0,24

AD-53808.1	0,81	0,85	0,93	0,08	0,11
AD-53809.1	0,50	0,62	0,77	0,00	0,12
AD-53810.1	0,84	0,82	0,98	0,16	0,22
AD-53811.1	0,94	0,95	1,00	0,10	0,11
AD-53812.1	0,61	0,76	0,97	0,14	0,22
AD-53813.1	0,67	0,76	0,94	0,01	0,15
AD-53814.1	0,58	0,67	0,84	0,11	0,19
AD-53815.1	0,49	0,50	0,72	0,09	0,17
AD-53816.1	0,82	0,91	0,93	0,08	0,10
AD-53817.1	0,92	0,94	1,07	0,13	0,36
AD-53818.1	0,83	0,99	0,99	0,07	0,41
AD-53819.1	0,61	0,75	0,88	0,24	0,16
AD-53820.1	0,71	0,81	0,92	0,17	0,04
AD-53821.1	0,56	0,54	0,68	0,13	0,05
AD-53822.1	1,24	0,88	1,05	0,12	0,17
AD-53823.1	1,03	0,86	0,99	0,11	0,18
AD-53824.1	0,76	0,73	0,93	0,16	0,11
AD-53825.1	0,57	0,63	0,82	0,18	0,04
AD-53826.1	0,54	0,51	0,78	0,08	0,07
AD-53827.1	0,99	0,91	1,05	0,12	0,08
AD-53828.1	0,69	0,77	0,87	0,09	0,16
AD-53829.1	0,72	0,91	0,95	0,11	0,16
AD-53830.1	0,48	0,73	0,76	0,11	0,01
AD-53831.1	0,97	0,92	1,00	0,22	0,25
AD-53832.1	0,68	0,63	0,81	0,15	0,02
AD-53833.1	0,92	0,90	0,84	0,20	0,03
AD-53834.1	1,15	0,93	0,86	0,16	0,02
AD-53835.1	0,88	0,79	0,81	0,18	0,03
PBS	0,90	1,02	0,99	0,04	0,15

Модифицированные и конъюгированные дуплексы siRNA к PCSK9 также оценивали на эффективность с помощью анализов с трансфекцией на трех клеточных линиях человека. siRNA к PCSK9 трансфицировали три различные клеточные линии, HeLa, Hep3В и HepG2, в двух дозах, 10 и 0,1 нМ. Результаты этих анализов показаны в табл. 4, и данные выражены как доля оставшегося количества транскрипта по отношению к контролю.

На фиг. 1 показано, что существует общая воспроизводимость активности в отношении сайленсинга дуплексов к PCSK9 между анализами со свободным поглощением и анализами с трансфекцией.

Значения IC<sub>50</sub> для выбранных дуплексов при свободном поглощении клетками яванского макака и при трансфекции клеток Hep3В показаны в табл. 5.

Таблица 4. Тест на эффективность в отношении PCSK9 при помощи трансфекции клеточных линий человека

ID дуплекса	Hela, 10 нМ	Hela, 0,1 нМ	Hep3b, 10 нМ	Hep3b, 0,1 нМ	HepG2, 10 нМ	HepG2, 0,1 нМ
AD-48399	0,94	0,90	1,18	1,03	1,34	1,05
AD-48399	0,90	1,03	0,87	0,88	0,84	0,91
AD-48399	0,88	1,14	0,90	0,99	0,92	1,04
AD-48399	1,22	0,97	0,95	0,98	0,81	0,92
AD-48399	1,04	0,81	1,01	1,10	1,03	1,09
AD-48399	1,06	1,20	1,14	1,04	1,16	1,01
AD-48400	0,05	0,63	0,10	0,51	0,17	0,69
AD-48400,4	0,06	0,28	0,14	0,31	0,13	0,32
AD-53649,1	0,84	1,05	1,07	0,94	0,97	1,11
AD-53650,1	0,16	0,87	0,41	0,87	0,52	1,12
AD-53651,1	0,47	0,86	0,49	0,92	0,71	1,08
AD-53652,1	0,34	0,93	0,50	0,96	0,40	1,21
AD-53653,1	0,36	0,99	0,43	1,01	0,52	1,13
AD-53654,1	0,85	1,06	0,99	0,92	0,95	1,06
AD-53656,1	0,46	0,92	0,78	0,98	0,80	0,74
AD-53657,1	0,71	0,97	0,75	1,01	0,81	0,94
AD-53658,1	0,32	0,97	0,50	0,91	0,58	1,05
AD-53659,1	0,11	0,86	0,24	0,93	0,22	0,94
AD-53660,1	0,35	1,12	0,43	0,99	0,44	1,31
AD-53661,1	0,94	1,07	0,85	0,95	0,88	0,92
AD-53663,1	0,82	1,03	0,74	1,06	1,04	1,04
AD-53664,1	0,60	0,94	0,61	1,06	0,85	1,28
AD-53665,1	0,33	1,00	0,55	1,01	0,45	1,12

## 037110

AD-53666,1	0,09	0,98	0,22	0,97	0,21	1,08
AD-53667,1	0,94	1,07	0,95	0,96	0,95	1,02
AD-53668,1	0,27	0,88	0,36	1,07	0,35	1,13
AD-53669,1	0,81	1,02	0,93	1,08	1,35	1,24
AD-53670,1	0,55	0,94	0,52	0,48	0,45	1,13
AD-53671,1	0,68	1,07	0,78	1,02	0,82	1,27
AD-53672,1	0,22	1,04	0,38	1,06	0,34	1,15
AD-53674,1	0,08	0,67	0,15	0,85	0,15	0,80
AD-53675,1	0,25	1,04	0,43	0,95	0,38	1,04
AD-53676,1	0,81	0,94	0,90	1,14	0,98	1,06
AD-53677,1	0,45	0,90	0,70	0,98	0,70	1,14
AD-53678,1	0,41	1,02	0,72	1,04	0,70	1,15
AD-53679,1	0,44	0,93	0,58	0,88	0,50	0,95
AD-53680,1	0,36	0,99	0,55	0,98	0,52	0,96
AD-53681,1	0,33	0,93	0,57	1,12	0,54	1,11
AD-53682,1	0,84	0,94	0,85	1,06	0,93	1,13
AD-53683,1	0,65	0,78	0,95	1,05	0,73	1,06
AD-53684,1	0,57	0,98	0,79	0,92	0,62	1,08
AD-53685,1	0,85	0,90	0,94	0,95	0,69	0,98
AD-53687,1	0,15	0,83	0,39	1,09	0,34	1,23
AD-53688,1	0,45	0,89	0,72	1,01	0,57	1,19
AD-53689,1	0,56	0,93	1,04	1,14	0,59	1,24
AD-53690,1	0,45	0,79	0,53	1,26	0,41	1,22
AD-53691,1	0,82	1,03	0,91	1,22	0,57	1,05
AD-53692,1	0,68	0,81	0,81	0,89	0,82	1,05
AD-53693,1	0,61	0,92	0,85	0,81	0,53	1,03
AD-53694,1	0,59	0,87	0,58	1,01	0,53	0,82
AD-53695,1	0,91	0,78	1,02	1,23	1,14	1,11
AD-53696,1	0,57	0,98	0,82	1,01	0,68	1,05
AD-53697,1	0,31	1,04	0,40	0,95	0,24	0,90
AD-53698,1	0,17	0,97	0,31	0,92	0,32	0,84
AD-53699,1	0,29	1,00	0,47	0,90	0,47	1,23
AD-53700,1	0,81	1,07	0,94	0,99	0,97	1,08
AD-53701,1	0,89	1,07	0,96	0,84	0,65	0,93
AD-53702,1	0,45	1,03	0,84	1,08	0,72	0,99

## 037110

AD-53703,1	0,18	0,79	0,28	0,97	0,29	0,90
AD-53704,1	0,77	0,80	0,88	1,06	0,91	0,95
AD-53705,1	0,63	0,89	0,81	1,06	0,76	0,97
AD-53706,1	0,39	0,82	0,41	1,00	0,48	0,88
AD-53707,1	0,42	0,97	0,60	0,83	0,54	0,80
AD-53708,1	0,49	0,95	0,82	0,96	1,07	1,09
AD-53709,1	0,19	0,90	0,43	0,85	0,38	1,05
AD-53710,1	0,66	1,00	0,82	0,85	0,69	1,08
AD-53711,1	0,40	0,90	0,45	0,95	0,23	1,03
AD-53712,1	0,47	0,99	0,51	0,94	0,62	0,97
AD-53713,1	0,52	1,05	0,69	0,83	0,79	0,94
AD-53714,1	0,43	1,01	0,71	1,11	0,75	1,12
AD-53715,1	0,23	0,99	0,58	1,24	0,58	1,09
AD-53716,1	0,39	1,00	0,52	0,98	0,51	0,80
AD-53717,1	0,20	0,84	0,33	1,02	0,41	1,09
AD-53718,1	0,35	1,08	0,33	1,02	0,45	0,97
AD-53719,1	0,58	0,96	0,74	0,84	0,79	1,01
AD-53720,1	0,31	1,00	0,55	1,09	0,48	1,24
AD-53721,1	0,26	1,02	0,62	0,92	0,49	0,94
AD-53722,1	0,50	0,99	0,86	0,99	0,87	1,26
AD-53723,1	0,28	0,86	0,37	0,92	0,54	1,11
AD-53724,1	0,18	1,11	0,20	0,98	0,36	1,05
AD-53725,1	0,47	1,00	0,63	0,95	0,60	1,04
AD-53726,1	0,19	1,01	0,42	0,96	0,41	1,21
AD-53727,1	0,55	0,82	0,77	1,08	0,68	1,35
AD-53728,1	0,44	0,92	0,65	1,11	0,68	1,44
AD-53729,1	0,11	0,92	0,25	0,94	0,11	1,01
AD-53730,1	0,31	0,91	0,51	1,05	0,59	1,34
AD-53731,1	0,26	0,63	0,42	0,95	0,44	1,07
AD-53732,1	0,17	0,87	0,29	0,99	0,36	0,98
AD-53733,1	1,06	0,72	1,21	1,14	1,07	1,28
AD-53734,1	0,79	0,92	0,93	0,98	0,90	1,33
AD-53735,1	0,54	0,87	0,83	1,12	0,66	1,24
AD-53736,1	0,40	0,69	0,76	1,09	0,76	1,11
AD-53737,1	0,29	0,82	0,41	1,04	0,39	0,96

## 037110

AD-53738,1	0,19	0,70	0,24	1,09	0,28	1,10
AD-53739,1	0,91	0,94	0,72	1,07	0,78	1,09
AD-53740,1	0,17	1,06	0,42	1,07	0,32	1,05
AD-53741,1	0,17	0,91	0,32	0,99	0,41	1,05
AD-53742,1	0,55	1,07	0,69	0,97	0,72	1,08
AD-53743,1	0,71	0,99	0,75	0,76	0,58	1,08
AD-53744,1	0,13	0,86	0,50	0,69	0,36	0,87
AD-53745,1	0,46	0,91	0,78	0,72	0,87	0,94
AD-53746,1	0,13	0,82	0,23	0,50	0,28	0,90
AD-53747,1	0,29	1,08	0,54	0,77	0,50	1,07
AD-53748,1	0,04	0,22	0,12	0,21	0,20	0,32
AD-53749,1	0,56	0,76	0,48	0,81	0,53	0,85
AD-53750,1	0,61	0,75	0,69	0,81	0,81	1,07
AD-53751,1	0,25	0,69	0,37	0,72	0,26	0,77
AD-53752,1	0,11	0,43	0,13	0,40	0,16	0,61
AD-53753,1	0,70	0,76	0,75	0,92	0,63	1,09
AD-53754,1	0,06	0,31	0,10	0,34	0,12	0,40
AD-53755,1	0,46	0,91	0,66	0,84	0,56	0,79
AD-53757,1	0,61	0,90	0,50	0,89	0,44	0,91
AD-53758,1	0,11	0,31	0,11	0,29	0,11	0,60
AD-53759,1	0,61	0,87	0,57	0,84	0,56	0,98
AD-53760,1	0,05	0,36	0,14	0,42	0,12	0,53
AD-53761,1	0,95	0,99	0,76	0,72	0,55	0,61
AD-53762,1	0,58	1,18	0,74	0,88	0,69	0,88
AD-53763,1	0,16	0,86	0,19	0,64	0,21	0,75
AD-53764,1	0,70	0,91	0,54	0,85	0,59	0,94
AD-53765,1	0,16	0,63	0,38	0,64	0,30	0,87
AD-53766,1	0,09	0,72	0,16	0,67	0,18	0,63
AD-53767,1	0,30	1,14	0,69	0,83	0,71	0,83
AD-53768,1	0,50	0,98	0,75	0,98	0,52	1,06
AD-53769,1	0,36	1,07	0,26	0,62	0,39	0,83
AD-53770,1	0,27	1,08	0,45	1,00	0,44	1,25
AD-53771,1	0,18	0,62	0,19	0,44	0,21	0,65
AD-53772,1	0,12	0,75	0,30	0,66	0,18	0,85
AD-53773,1	0,39	0,98	0,60	0,84	0,19	1,00

## 037110

AD-53774,1	0,07	0,54	0,25	0,40	0,20	0,71
AD-53776,1	0,33	0,97	0,45	0,94	0,34	0,95
AD-53777,1	0,06	0,39	0,18	0,30	0,11	0,41
AD-53778,1	0,09	0,72	0,24	0,69	0,23	0,78
AD-53779,1	0,47	0,66	0,68	0,67	0,57	0,81
AD-53780,1	0,29	0,93	0,61	0,71	0,42	0,92
AD-53781,1	0,41	0,99	0,38	0,87	0,28	1,09
AD-53782,1	0,56	0,47	0,56	0,89	0,41	1,16
AD-53783,1	0,16	0,68	0,32	0,46	0,34	0,61
AD-53784,1	0,15	0,71	0,27	0,72	0,25	0,80
AD-53785,1	0,17	0,90	0,57	0,71	0,29	0,64
AD-53786,1	0,11	0,78	0,28	0,48	0,24	0,74
AD-53787,1	0,34	0,72	0,56	1,04	0,46	0,81
AD-53788,1	0,36	0,83	0,46	0,95	0,32	0,65
AD-53789,1	0,09	0,43	0,18	0,42	0,12	0,47
AD-53790,1	0,10	0,74	0,30	0,65	0,31	0,81
AD-53791,1	0,07	0,51	0,20	0,30	0,16	0,58
AD-53792,1	0,05	0,40	0,11	0,30	0,17	0,64
AD-53793,1	0,23	1,19	0,42	0,84	0,45	1,12
AD-53794,1	0,43	1,15	0,65	0,67	0,42	0,95
AD-53795,1	0,08	0,37	0,15	0,34	0,12	0,48
AD-53796,1	0,07	0,33	0,19	0,49	0,15	0,58
AD-53797,1	0,10	0,43	0,16	0,39	0,20	0,62
AD-53798,1	0,04	0,31	0,09	0,29	0,16	0,60
AD-53799,1	0,22	0,71	0,30	0,85	0,27	0,85
AD-53800,1	0,09	0,34	0,16	0,35	0,14	0,51
AD-53801,1	0,09	0,28	0,25	0,55	0,20	0,54
AD-53802,1	0,10	0,31	0,20	0,40	0,15	0,72
AD-53803,1	0,07	0,27	0,08	0,21	0,14	0,29
AD-53804,1	0,18	0,57	0,29	0,47	0,27	0,79
AD-53805,1	0,69	0,85	0,68	0,85	0,48	1,01
AD-53806,1	0,07	0,38	0,18	0,43	0,13	0,50
AD-53807,1	0,29	0,61	0,26	0,71	0,28	0,68
AD-53808,1	0,15	0,68	0,26	0,50	0,28	0,72
AD-53809,1	0,04	0,23	0,17	0,22	0,12	0,31

AD-53810,1	0,31	0,88	0,30	0,55	0,36	0,85
AD-53811,1	0,28	0,77	0,33	0,57	0,39	0,87
AD-53812,1	0,12	0,69	0,16	0,62	0,22	0,79
AD-53813,1	0,11	0,33	0,18	0,26	0,17	0,40
AD-53814,1	0,12	0,59	0,57	0,60	0,29	0,57
AD-53815,1	0,03	0,27	0,11	0,18	0,18	0,33
AD-53816,1	0,16	0,89	0,24	0,62	0,32	0,75
AD-53817,1	0,26	0,98	0,44	0,69	0,44	1,18
AD-53818,1	0,12	0,71	0,21	0,55	0,21	0,70
AD-53819,1	0,09	0,52	0,12	0,45	0,12	0,46
AD-53820,1	0,20	0,96	0,27	0,67	0,34	0,74
AD-53821,1	0,04	0,29	0,10	0,23	0,13	0,29
AD-53822,1	0,54	1,05	0,60	0,91	0,48	0,96
AD-53823,1	0,21	0,76	0,41	0,59	0,33	0,85
AD-53824,1	0,16	0,78	0,40	0,51	0,36	0,70
AD-53825,1	0,05	0,40	0,12	0,31	0,24	0,73
AD-53826,1	0,04	0,34	0,10	0,21	0,20	0,34
AD-53827,1	0,40	1,11	0,40	0,84	0,31	1,15
AD-53828,1	0,17	0,51	0,23	0,55	0,17	1,14
AD-53829,1	0,06	0,71	0,21	0,58	0,24	1,21
AD-53830,1	0,07	0,27	0,06	0,30	0,15	0,43
AD-53831,1	0,09	0,56	0,21	0,39	0,16	0,95
AD-53832,1	0,08	0,52	0,26	0,31	0,11	0,76
AD-53833,1	1,04	1,05	0,74	1,24	0,60	1,58
AD-53834,1	0,70	1,14	0,71	0,85	0,38	1,47
AD-53835,1	0,11	0,43	0,33	0,35	0,09	0,53
PBS	0,67	1,13	0,90	0,90	0,99	0,99

Таблица 5. Значения  $IC_{50}$  для PCSK9 для выбранных дуплексов при свободном поглощении клетками макаков-крабоедов и при трансфекции в клеточной линии НерЗВ человека

	Трансфекция	Свободное поглощение
Дуплекс	$IC_{50}$ , нМ	$IC_{50}$ , нМ
AD-53806.1	0,07	18,00
AD-53748.1	0,06	16,88
AD-53815.1	0,05	39,21
AD-53809.1	0,05	571,00
AD-53821.1	0,05	55,41
AD-53830.1	0,08	не определено
AD-53754.1	0,25	67,42
AD-53800.1	0,30	не определено
AD-53798.1	0,04	не определено
AD-53789.1	0,37	не определено
AD-48400.4	0,23	не определено

AD-48400 также оценивали в отношении эффективности *in vivo* на самках мышей, несущих трансген PCSK9 человека, произвольно вставленный в геном без нарушения эндогенного гена PCSK9. Вкратце, мышам вводили инъекцией подкожно разовую дозу 20 мг/кг в 0 день, разовую дозу 100 мг/кг в 0 день

и пять доз 20 мг/кг в 0, 1, 2, 3, 4 и 5 дни. Сыворотку собирали в -6, -3, 0, 1, 2, 3, 4 и 7 дни и количество белка PCSK9 определяли при помощи анализа ELISA. Результаты этих анализов показаны на фиг. 2, и по ним видно, что для AD-48400, конъюгированного с GalNAc, при всех трех исследованных дозах существует дозозависимый эффект.

Шесть наиболее эффективных дуплексов, определенных при помощи тестов *in vitro*, описанных выше, оценивали в отношении эффективности и длительности ответа *in vivo*. Трансгенным по PCSK9 мышам вводили инъекцией в 0, 1, 2, 3 и 4 дни либо 5 мг/кг, либо 25 мг/кг AD-48400, AD-53830, AD-53806, AD-53815, AD-53748 или AD-53798. Уровни белка PCSK9 в сыворотке определяли при помощи ELISA в -3, 0, 1, 2, 3, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 26, 31 и 36 дни. Результаты показаны на фиг. 3А и 3В.

Пример 3. Оптимизация прототипа.

Исходя из анализов на эффективность, описанных в примере 2 выше, siRNA к PCSK9, основанные на исходных последовательностях AD-53815 и AD-53806, с рядом химических модификаций, оценивали на эффективность в анализах со свободным поглощением первичными гепатоцитами макаков-крабоедов (PCH) при 200, 20, 2 и 0,2 нМ. Для всех доз, за исключением дозы 0,2 нМ, анализы выполняли дважды и данные выражали как среднюю долю оставшегося количества транскрипта по отношению к контролю. Дозу 0,2 нМ оценивали один раз. Результаты этих анализов показаны в табл. 6.

Таблица 6. Тесты на эффективность для оптимизации прототипа AD-53815 и AD-53806 при помощи свободного поглощения гепатоцитами макаков-крабоедов

Исходный дуплекс	ID дуплекса	200 нМ, средн.	20 нМ, средн.	2 нМ, средн.	0,2 нМ-384	200 нМ, SD	20 нМ, SD	2 нМ, SD
AD-53815	AD-53815,5	0,45	0,48	0,74	0,95	0,05	0,00	0,05
AD-53815	AD-53815,4	0,43	0,54	0,84	0,83	0,00	0,04	0,10
AD-53815	AD-56633,1	0,33	0,52	0,82	0,88	0,04	0,01	0,10
AD-53815	AD-56617,1	0,40	0,65	0,91	1,06	0,03	0,02	0,03
AD-53815	AD-56623,1	0,52	0,61	0,87	1,05	0,03	0,04	0,21
AD-53815	AD-56629,1	0,50	0,62	0,87	1,05	0,04	0,13	0,17
AD-53815	AD-56635,1	0,45	0,71	0,92	1,03	0,03	0,02	0,03
AD-53815	AD-56641,1	0,47	0,73	0,84	1,04	0,04	0,00	0,17
AD-53815	AD-56625,1	0,49	0,55	0,82	1,12	0,01	0,16	0,16
AD-53815	AD-56631,1	0,48	0,57	0,82	1,05	0,04	0,11	0,06
AD-53815	AD-56637,1	0,48	0,58	0,76	1,01	0,01	0,14	0,13
AD-53815	AD-56643,1	0,59	0,77	0,93	1,04	0,05	0,01	0,04
AD-53815	AD-56649,1	0,76	0,87	0,95	1,06	0,02	0,07	0,14
AD-53815	AD-56655,1	0,73	0,86	0,85	0,96	0,01	0,04	0,11
AD-53815	AD-56615,1	0,58	0,70	0,92	0,98	0,00	0,02	0,03
AD-53815	AD-56621,1	0,71	0,76	0,93	0,95	0,18	0,07	0,07
AD-53815	AD-56627,1	0,58	0,72	0,93	0,94	0,01	0,08	0,02
AD-53815	AD-56639,1	0,52	0,57	0,72	0,94	0,16	0,00	0,04
AD-53815	AD-56645,1	0,32	0,49	0,74	0,88	0,03	0,03	0,14
AD-53815	AD-56651,1	0,71	0,94	0,88	0,88	0,08	0,29	0,12
AD-53815	AD-56610,1	0,31	0,57	0,82	0,93	0,02	0,01	0,04
AD-53815	AD-56616,1	0,47	0,68	0,70	1,01	0,06	0,08	0,34
AD-53815	AD-56622,1	0,47	0,66	0,88	0,95	0,06	0,10	0,10
AD-53815	AD-56628,1	1,02	1,15	1,04	0,99	0,00	0,12	0,02
AD-53815	AD-56634,1	0,75	0,90	0,97	1,03	0,11	0,04	0,07
AD-53815	AD-56640,1	0,58	0,76	0,81	1,01	0,10	0,05	0,12
AD-53815	AD-56646,1	0,77	0,94	0,82	0,99	0,09	0,12	0,14
AD-53815	AD-56652,1	0,61	0,74	0,78	0,89	0,00	0,00	0,03

## 037110

AD-53815	AD-56611,1	0,93	1,02	1,16	0,89	0,05	0,15	0,05
AD-53815	AD-56647,1	0,38	0,58	0,79	0,94	0,05	0,08	0,00
AD-53815	AD-56653,1	0,47	0,46	0,63	0,84	0,12	0,04	0,04
AD-53815	AD-56612,1	0,41	0,61	0,88	0,85	0,03	0,09	0,09
AD-53815	AD-56618,1	0,64	0,60	1,03	1,08	0,21	0,09	0,01
AD-53815	AD-56624,1	0,46	0,61	0,85	1,05	0,04	0,17	0,15
AD-53815	AD-56630,1	0,49	0,69	0,87	1,01	0,01	0,00	0,15
AD-53815	AD-56636,1	0,49	0,57	0,82	1,13	0,01	0,05	0,03
AD-53815	AD-56642,1	0,43	0,55	0,82	1,09	0,00	0,08	0,03
AD-53815	AD-56648,1	0,48	0,66	0,80	0,96	0,00	0,04	0,08
AD-53815	AD-56654,1	0,43	0,53	0,72	0,84	0,01	0,00	0,07
AD-53815	AD-56613,1	0,54	0,61	0,81	0,91	0,16	0,08	0,19
AD-53815	AD-56619,1	0,55	0,67	1,02	1,06	0,04	0,07	0,07
AD-53815	AD-56614,1	0,42	0,56	0,86	0,90	0,05	0,04	0,10
AD-53815	AD-56620,1	0,41	0,52	0,85	0,84	0,01	0,12	0,08
AD-53815	AD-56626,1	0,59	0,68	0,90	1,12	0,01	0,03	0,10
AD-53815	AD-56632,1	0,60	0,73	0,91	1,05	0,04	0,09	0,10
AD-53815	AD-56638,1	0,68	0,89	0,94	1,19	0,03	0,03	0,18
AD-53815	AD-56644,1	0,84	0,89	1,09	1,09	0,08	0,08	0,06
AD-53815	AD-56650,1	0,86	0,95	1,05	1,05	0,10	0,01	0,10
AD-53815	AD-56656,1	0,53	0,64	0,92	0,88	0,09	0,04	0,14
AD-53815	AD-56662,1	0,55	0,61	0,96	1,03	0,02	0,09	0,01
AD-53815	AD-56668,1	0,76	0,79	0,99	1,10	0,07	0,11	0,06
AD-53815	AD-56673,1	0,81	0,87	1,12	1,09	0,01	0,15	0,13
AD-53815	AD-56678,1	0,84	0,76	1,12	1,05	0,04	0,24	0,05
AD-53815	AD-56683,1	0,88	0,93	1,08	1,06	0,05	0,10	0,06
AD-53815	AD-56688,1	0,80	0,86	0,93	0,99	0,10	0,11	0,19
AD-53815	AD-56657,1	0,45	0,63	0,84	0,88	0,20	0,04	0,09
AD-53815	AD-56663,1	0,35	0,49	0,77	1,03	0,00	0,07	0,04
AD-53815	AD-56669,1	0,53	0,68	0,99	1,11	0,00	0,18	0,03
AD-53815	AD-56674,1	0,44	0,64	0,84	1,03	0,06	0,01	0,17
AD-53815	AD-56679,1	0,52	0,67	0,77	1,01	0,01	0,06	0,14
AD-53815	AD-56684,1	0,43	0,59	0,84	1,08	0,01	0,03	0,04
AD-53815	AD-56689,1	0,55	0,57	0,73	0,95	0,09	0,01	0,11
AD-53815	AD-56693,1	0,45	0,48	0,65	0,84	0,04	0,02	0,11

## 037110

AD-53815	AD-56658,1	0,46	0,55	0,85	0,84	0,21	0,09	0,07
AD-53815	AD-56664,1	0,35	0,60	0,80	0,91	0,13	0,03	0,14
AD-53815	AD-56670,1	0,62	0,61	0,90	1,11	0,17	0,06	0,00
AD-53815	AD-56680,1	0,74	0,90	1,00	0,91	0,05	0,01	0,05
AD-53815	AD-56685,1	0,64	0,64	0,77	1,07	0,15	0,01	0,15
AD-53815	AD-56690,1	0,39	0,61	0,75	0,97	0,13	0,03	0,08
AD-53815	AD-56694,1	0,41	0,53	0,67	0,94	0,01	0,00	0,04
AD-53815	AD-56659,1	0,57	0,58	0,84	0,95	0,25	0,09	0,05
AD-53815	AD-56665,1	0,38	0,51	0,78	1,01	0,05	0,07	0,17
AD-53815	AD-56671,1	0,32	0,45	0,78	0,94	0,03	0,05	0,01
AD-53815	AD-56676,1	0,31	0,55	0,81	1,02	0,03	0,13	0,02
AD-53815	AD-56681,1	0,54	0,75	0,88	1,02	0,02	0,07	0,11
AD-53815	AD-56686,1	0,50	0,74	0,86	1,03	0,01	0,10	0,10
AD-53815	AD-56691,1	0,44	0,56	0,79	1,03	0,01	0,00	0,05
AD-53815	AD-56695,1	0,37	0,70	0,67	0,89	0,01	0,29	0,11
AD-53815	AD-56660,1	0,36	0,73	0,83	0,93	0,02	0,22	0,10
AD-53815	AD-56666,1	0,39	0,47	0,74	0,94	0,02	0,05	0,13
AD-53815	AD-56672,1	0,63	0,55	0,87	1,03	0,25	0,10	0,04
AD-53815	AD-56677,1	0,54	0,70	0,85	0,99	0,24	0,11	0,00
AD-53815	AD-56682,1	0,48	0,57	0,90	0,96	0,11	0,09	0,05
AD-53815	AD-56687,1	0,81	0,94	1,06	1,08	0,07	0,02	0,05
AD-53815	AD-56692,1	0,45	0,64	0,73	0,95	0,03	0,13	0,05
AD-53815	AD-56696,1	0,40	0,48	0,66	0,95	0,01	0,04	0,06
AD-53815	AD-56661,1	0,52	0,54	0,75	0,98	0,22	0,06	0,04
AD-53815	AD-56667,1	0,40	0,68	0,87	1,03	0,03	0,03	0,11
AD-53806	AD-53806,11	0,28	0,44	0,74	0,98	0,05	0,01	0,13
AD-53806	AD-53806,13	0,31	0,36	0,65	0,92	0,01	0,08	0,06
AD-53806	AD-53806,12	0,53	0,56	0,70	1,04	0,00	0,01	0,15
AD-53806	AD-53806,5	0,34	0,54	0,85	0,87	0,01	0,00	0,10
AD-53806	AD-53806,6	0,41	0,51	0,77	0,91	0,05	0,04	0,08
AD-53806	AD-53806,7	0,39	0,58	0,75	0,97	0,02	0,16	0,14
AD-53806	AD-53806,8	0,35	0,49	0,69	0,91	0,06	0,03	0,09
AD-53806	AD-53806,9	0,36	0,55	0,77	1,01	0,04	0,07	0,13
AD-53806	AD-53806,10	0,29	0,44	0,73	0,93	0,04	0,10	0,14
AD-53806	AD-56979,1	0,43	0,50	0,78	0,96	0,01	0,03	0,11

## 037110

AD-53806	AD-56979,2	0,32	0,47	0,65	1,02	0,02	0,11	0,05
AD-53806	AD-56975,3	0,27	0,57	0,72	0,83	0,01	0,16	0,08
AD-53806	AD-56975,4	0,55	0,67	0,81	0,92	0,11	0,10	0,04
AD-53806	AD-56975,5	0,34	0,54	0,71	0,94	0,04	0,22	0,10
AD-53806	AD-56975,1	0,38	0,53	0,74	0,93	0,13	0,14	0,02
AD-53806	AD-56975,2	0,50	0,62	0,82	0,98	0,09	0,16	0,11
AD-53806	AD-56983,1	0,49	0,72	0,89	1,11	0,10	0,09	0,21
AD-53806	AD-56983,2	0,74	0,89	1,14	1,16	0,10	0,06	0,02
AD-53806	AD-56983,3	0,91	1,05	1,02	1,04	0,09	0,10	0,08
AD-53806	AD-56983,4	0,40	0,57	0,83	1,05	0,03	0,02	0,08
AD-53806	AD-56983,5	0,33	0,51	0,83	0,90	0,03	0,04	0,03
AD-53806	AD-56977,3	0,44	0,49	0,62	0,95	0,17	0,16	0,06
AD-53806	AD-56977,1	0,27	0,58	0,81	0,88	0,06	0,07	0,08
AD-53806	AD-56977,2	0,41	0,60	0,81	0,90	0,01	0,07	0,12
AD-53806	AD-56976,1	0,40	0,64	0,85	0,90	0,14	0,21	0,01
AD-53806	AD-56976,2	0,37	0,47	0,70	1,01	0,09	0,10	0,13
AD-53806	AD-56980,1	0,47	0,54	0,83	0,97	0,12	0,02	0,14
AD-53806	AD-56980,2	0,44	0,55	0,81	1,08	0,15	0,11	0,08
AD-53806	AD-56984,1	0,41	0,63	0,81	1,08	0,04	0,07	0,14
AD-53806	AD-56984,2	0,32	0,58	0,86	1,04	0,02	0,17	0,07
AD-53806	AD-56987,1	0,37	0,63	0,82	1,11	0,08	0,08	0,05
AD-53806	AD-56987,2	0,33	0,59	0,79	1,02	0,05	0,05	0,13
AD-53806	AD-56991,1	0,36	0,57	0,73	1,08	0,01	0,07	0,18
AD-53806	AD-56993,1	0,41	0,54	0,75	0,99	0,12	0,09	0,06
AD-53806	AD-56995,1	0,35	0,45	0,67	1,00	0,07	0,02	0,12
AD-53806	AD-56978,1	0,35	0,67	0,88	0,91	0,04	0,22	0,05
AD-53806	AD-56978,2	0,47	0,55	0,78	1,12	0,03	0,01	0,07
AD-53806	AD-56981,1	0,45	0,65	0,86	1,08	0,01	0,16	0,15
AD-53806	AD-56985,1	0,53	0,61	1,08	1,14	0,02	0,09	0,07
AD-53806	AD-56988,1	0,62	0,81	0,91	1,13	0,01	0,05	0,20
AD-53806	AD-56988,2	0,76	0,94	0,85	1,14	0,17	0,10	0,11
AD-53806	AD-56988,3	0,55	0,79	0,86	1,19	0,04	0,05	0,16
AD-53806	AD-56982,1	0,40	0,65	0,84	1,07	0,04	0,10	0,09
AD-53806	AD-56982,2	0,38	0,50	0,70	1,01	0,03	0,03	0,08
AD-53806	AD-56986,1	0,45	0,57	0,80	1,12	0,02	0,11	0,15

## 037110

AD-53806	AD-56986,2	0,49	0,59	0,79	1,04	0,01	0,05	0,17
AD-53806	AD-56989,1	0,69	0,84	0,95	1,12	0,08	0,06	0,12
AD-53806	AD-56990,1	0,49	0,56	0,79	1,08	0,03	0,02	0,13
AD-53806	AD-56992,1	0,61	0,70	0,90	1,14	0,01	0,04	0,14
AD-53806	AD-56992,2	0,48	0,63	0,87	0,99	0,05	0,10	0,07
AD-53806	AD-56994,1	0,88	0,89	0,97	1,11	0,02	0,06	0,13
AD-53806	AD-56994,2	0,34	0,42	0,73	0,98	0,01	0,05	0,05
AD-53806	AD-56996,1	0,50	0,59	0,77	0,95	0,07	0,12	0,10
AD-53806	AD-57001,1	0,44	0,54	0,77	1,08	0,01	0,05	0,12
AD-53806	AD-57007,1	0,62	0,68	0,91	1,11	0,04	0,02	0,19
AD-53806	AD-57013,1	0,65	0,78	0,94	1,17	0,05	0,04	0,22
AD-53806	AD-57019,1	0,57	0,74	0,87	1,14	0,01	0,09	0,13
AD-53806	AD-57022,1	0,46	0,48	0,72	0,98	0,14	0,01	0,17
AD-53806	AD-57025,1	0,37	0,47	0,68	0,92	0,04	0,11	0,06
AD-53806	AD-56997,1	0,41	0,56	0,77	0,88	0,00	0,10	0,09
AD-53806	AD-57002,1	0,46	0,58	0,81	1,04	0,03	0,03	0,08
AD-53806	AD-57008,1	0,68	0,75	0,91	1,13	0,02	0,03	0,15
AD-53806	AD-57014,1	0,80	0,82	0,99	1,17	0,02	0,01	0,12
AD-53806	AD-57020,1	0,51	0,53	0,81	1,07	0,17	0,03	0,07
AD-53806	AD-57020,2	0,37	0,46	0,68	1,02	0,04	0,07	0,13
AD-53806	AD-57026,1	0,34	0,51	0,68	0,97	0,01	0,08	0,06
AD-53806	AD-57003,1	0,76	0,90	0,94	1,11	0,02	0,16	0,11
AD-53806	AD-57009,1	0,81	0,88	0,93	0,98	0,01	0,03	0,10
AD-53806	AD-57015,1	0,72	0,92	0,90	1,04	0,01	0,05	0,15
AD-53806	AD-57023,1	0,41	0,50	0,75	1,00	0,08	0,07	0,06
AD-53806	AD-57027,1	0,38	0,46	0,68	0,93	0,11	0,00	0,07
AD-53806	AD-56998,1	0,45	0,57	0,94	0,98	0,01	0,06	0,11
AD-53806	AD-57004,1	0,39	0,61	0,80	1,13	0,03	0,04	0,13
AD-53806	AD-57010,1	0,43	0,64	0,81	1,00	0,01	0,07	0,15
AD-53806	AD-57016,1	0,44	0,71	0,80	0,97	0,01	0,25	0,05
AD-53806	AD-56999,2	0,49	0,60	0,69	1,04	0,04	0,02	0,16
AD-53806	AD-56999,1	0,39	0,55	0,68	0,96	0,01	0,09	0,10
AD-53806	AD-57021,1	0,40	0,58	0,71	1,02	0,03	0,03	0,11
AD-53806	AD-57024,1	0,41	0,49	0,68	1,02	0,14	0,00	0,10
AD-53806	AD-57005,1	0,45	0,56	0,87	1,06	0,03	0,03	0,20
AD-53806	AD-57011,1	0,53	0,63	0,92	1,02	0,02	0,07	0,10
AD-53806	AD-57017,1	0,48	0,60	0,81	1,07	0,00	0,01	0,12
AD-53806	AD-57000,2	0,50	0,60	0,74	0,93	0,04	0,01	0,02
AD-53806	AD-57000,3	0,54	0,49	0,72	0,97	0,22	0,08	0,00
AD-53806	AD-57000,1	0,70	0,76	0,80	0,95	0,02	0,05	0,04
AD-53806	AD-57006,2	0,48	0,75	0,76	0,94	0,00	0,31	0,12
AD-53806	AD-57006,3	0,45	0,57	0,71	0,98	0,08	0,09	0,12
AD-53806	AD-57006,1	0,64	0,76	0,84	0,97	0,00	0,11	0,10
AD-53806	AD-57012,1	0,53	0,83	0,79	0,93	0,04	0,42	0,02
AD-53806	AD-57018,1	0,67	0,73	0,72	0,93	0,07	0,04	0,03

siRNA с рядом химических модификаций, основанные на исходных последовательностях AD-53815 и AD-53806, также подвергали отбору в отношении эффективности *in vitro* при помощи трансфекции клеток Hep3B при 10 и 0,1 нМ. Результаты этого теста на структурно-функциональную взаимосвязь показаны в табл. 7, и они выражены как средняя доля оставшегося количества транскрипта по отношению к контролю  $\pm$  SD.

Таблица 7. Тесты на эффективность для оптимизации прототипа AD-53815 и AD-53806 при помощи трансфекции клеток человека

Исходный дуплекс	ID дуплекса	Транс., 10 нМ, средн.	Транс., 10 нМ, SD	Транс., 0,1 нМ, средн.	Транс., 0,1 нМ, SD
AD-53815	AD-53815,5	0,14	0,05	0,24	не определено
AD-53815	AD-53815,4	0,18	0,07	0,38	не определено
AD-53815	AD-56633,1	0,18	0,10	0,24	не определено
AD-53815	AD-56617,1	0,13	0,06	0,25	не определено
AD-53815	AD-56623,1	0,14	0,05	0,24	не определено
AD-53815	AD-56629,1	0,14	0,02	0,17	не определено
AD-53815	AD-56635,1	0,12	0,02	0,22	не определено
AD-53815	AD-56641,1	0,15	0,01	0,16	не определено
AD-53815	AD-56625,1	0,12	0,03	0,29	не определено
AD-53815	AD-56631,1	0,13	0,01	0,20	не определено
AD-53815	AD-56637,1	0,22	0,14	0,16	не определено

## 037110

AD-53815	AD-56643,1	0,18	0,08	0,16	не определено
AD-53815	AD-56649,1	0,16	0,00	0,19	не определено
AD-53815	AD-56655,1	0,24	0,11	0,24	не определено
AD-53815	AD-56615,1	0,15	0,00	0,32	не определено
AD-53815	AD-56621,1	0,20	0,07	0,41	не определено
AD-53815	AD-56627,1	0,17	0,04	0,31	не определено
AD-53815	AD-56639,1	0,19	0,08	0,24	не определено
AD-53815	AD-56645,1	0,19	0,09	0,27	не определено
AD-53815	AD-56651,1	0,29	0,09	0,68	не определено
AD-53815	AD-56610,1	0,21	0,11	0,23	не определено
AD-53815	AD-56616,1	0,16	0,04	0,29	не определено
AD-53815	AD-56622,1	0,18	0,07	0,36	не определено
AD-53815	AD-56628,1	0,28	0,07	0,60	не определено
AD-53815	AD-56634,1	0,16	0,04	0,29	не определено
AD-53815	AD-56640,1	0,21	0,09	0,26	не определено
AD-53815	AD-56646,1	0,27	0,21	0,37	не определено
AD-53815	AD-56652,1	0,26	0,08	0,29	не определено
AD-53815	AD-56611,1	0,35	0,11	0,96	не определено
AD-53815	AD-56647,1	0,17	0,09	0,13	не определено
AD-53815	AD-56653,1	0,17	0,09	0,28	не определено
AD-53815	AD-56612,1	0,17	0,07	0,24	не определено
AD-53815	AD-56618,1	0,14	0,00	0,26	не определено
AD-53815	AD-56624,1	0,15	0,02	0,27	не определено
AD-53815	AD-56630,1	0,13	0,01	0,24	не определено
AD-53815	AD-56636,1	0,17	0,08	0,22	не определено
AD-53815	AD-56642,1	0,12	0,03	0,13	не определено
AD-53815	AD-56648,1	0,15	0,05	0,21	не определено
AD-53815	AD-56654,1	0,22	0,10	0,24	не определено
AD-53815	AD-56613,1	0,17	0,07	0,40	не определено
AD-53815	AD-56619,1	0,21	0,12	0,30	не определено
AD-53815	AD-56614,1	0,12	0,01	0,23	не определено
AD-53815	AD-56620,1	0,12	0,02	0,15	не определено
AD-53815	AD-56626,1	0,14	0,03	0,20	не определено
AD-53815	AD-56632,1	0,12	0,02	0,21	не определено
AD-53815	AD-56638,1	0,15	0,10	0,23	не определено

## 037110

AD-53815	AD-56644,1	0,23	0,11	0,17	не определено
AD-53815	AD-56650,1	0,13	0,03	0,20	не определено
AD-53815	AD-56656,1	0,26	0,03	0,27	не определено
AD-53815	AD-56662,1	0,13	0,06	0,18	не определено
AD-53815	AD-56668,1	0,19	0,05	0,20	не определено
AD-53815	AD-56673,1	0,18	0,05	0,21	не определено
AD-53815	AD-56678,1	0,17	0,00	0,20	не определено
AD-53815	AD-56683,1	0,29	0,22	0,27	не определено
AD-53815	AD-56688,1	0,19	0,02	0,18	не определено
AD-53815	AD-56657,1	0,18	0,14	0,34	не определено
AD-53815	AD-56663,1	0,11	0,04	0,18	не определено
AD-53815	AD-56669,1	0,11	0,02	0,31	не определено
AD-53815	AD-56674,1	0,14	0,00	0,21	не определено
AD-53815	AD-56679,1	0,14	0,05	0,19	не определено
AD-53815	AD-56684,1	0,14	0,03	0,19	не определено
AD-53815	AD-56689,1	0,18	0,09	0,18	не определено
AD-53815	AD-56693,1	0,19	0,11	0,21	не определено
AD-53815	AD-56658,1	0,19	0,13	0,30	не определено
AD-53815	AD-56664,1	0,15	0,07	0,20	не определено
AD-53815	AD-56670,1	0,18	0,10	0,26	не определено
AD-53815	AD-56680,1	0,27	0,05	0,31	не определено
AD-53815	AD-56685,1	0,14	0,02	0,28	не определено
AD-53815	AD-56690,1	0,10	0,03	0,18	не определено
AD-53815	AD-56694,1	0,15	0,06	0,17	не определено
AD-53815	AD-56659,1	0,16	0,04	0,27	не определено
AD-53815	AD-56665,1	0,14	0,06	0,26	не определено
AD-53815	AD-56671,1	0,11	0,01	0,29	не определено
AD-53815	AD-56676,1	0,14	0,06	0,20	не определено
AD-53815	AD-56681,1	0,15	0,03	0,30	не определено
AD-53815	AD-56686,1	0,15	0,03	0,26	не определено
AD-53815	AD-56691,1	0,11	0,02	0,16	не определено
AD-53815	AD-56695,1	0,14	0,06	0,24	не определено
AD-53815	AD-56660,1	0,10	0,03	0,37	не определено
AD-53815	AD-56666,1	0,18	0,13	0,22	не определено
AD-53815	AD-56672,1	0,14	0,02	0,35	не определено

## 037110

AD-53815	AD-56677,1	0,15	0,04	0,23	не определено
AD-53815	AD-56682,1	0,14	0,06	0,28	не определено
AD-53815	AD-56687,1	0,24	0,01	0,53	не определено
AD-53815	AD-56692,1	0,09	0,01	0,36	не определено
AD-53815	AD-56696,1	0,16	0,09	0,26	не определено
AD-53815	AD-56661,1	0,21	0,15	0,48	не определено
AD-53815	AD-56667,1	0,22	0,16	0,26	не определено
AD-53806	AD-53806,11	0,19	0,05	0,25	0,06
AD-53806	AD-53806,13	0,21	0,07	0,21	0,16
AD-53806	AD-53806,12	0,21	0,08	0,21	0,02
AD-53806	AD-53806,5	0,22	0,01	0,29	0,06
AD-53806	AD-53806,6	0,24	0,07	0,33	0,12
AD-53806	AD-53806,7	0,19	0,02	0,24	0,11
AD-53806	AD-53806,8	0,20	0,01	0,23	0,05
AD-53806	AD-53806,9	0,22	0,01	0,19	0,06
AD-53806	AD-53806,10	0,17	0,01	0,21	0,07
AD-53806	AD-56979,1	0,18	0,00	0,29	0,14
AD-53806	AD-56979,2	0,24	0,11	0,24	0,12
AD-53806	AD-56975,3	0,26	0,09	0,28	0,18
AD-53806	AD-56975,4	0,35	0,02	0,50	0,23
AD-53806	AD-56975,5	0,17	0,01	0,21	0,18
AD-53806	AD-56975,1	0,24	0,09	0,32	0,12
AD-53806	AD-56975,2	0,19	0,04	0,16	0,02
AD-53806	AD-56983,1	0,17	0,01	0,32	0,18
AD-53806	AD-56983,2	0,28	0,07	0,63	0,15
AD-53806	AD-56983,3	1,22	0,61	0,83	0,02
AD-53806	AD-56983,4	0,25	0,10	0,24	0,10
AD-53806	AD-56983,5	0,17	0,01	0,26	0,15
AD-53806	AD-56977,3	0,31	0,11	0,28	0,23
AD-53806	AD-56977,1	0,22	0,04	0,34	0,12
AD-53806	AD-56977,2	0,22	0,05	0,29	0,16
AD-53806	AD-56976,1	0,21	0,09	0,34	0,20
AD-53806	AD-56976,2	0,17	0,03	0,25	0,04
AD-53806	AD-56980,1	0,22	0,04	0,20	0,02
AD-53806	AD-56980,2	0,19	0,01	0,20	0,06

## 037110

AD-53806	AD-56984,1	0,24	0,11	0,22	0,10
AD-53806	AD-56984,2	0,19	0,01	0,21	0,10
AD-53806	AD-56987,1	0,19	0,05	0,29	0,19
AD-53806	AD-56987,2	0,24	0,03	0,24	0,09
AD-53806	AD-56991,1	0,17	0,01	0,17	0,08
AD-53806	AD-56993,1	0,14	0,09	0,22	0,06
AD-53806	AD-56995,1	0,19	0,07	0,27	0,13
AD-53806	AD-56978,1	0,27	0,12	0,36	0,12
AD-53806	AD-56978,2	0,24	0,03	0,20	0,01
AD-53806	AD-56981,1	0,22	0,03	0,28	0,17
AD-53806	AD-56985,1	0,21	0,00	0,28	0,04
AD-53806	AD-56988,1	0,20	0,02	0,24	0,02
AD-53806	AD-56988,2	0,20	0,03	0,27	0,13
AD-53806	AD-56988,3	0,23	0,03	0,27	0,01
AD-53806	AD-56982,1	0,23	0,06	0,24	0,00
AD-53806	AD-56982,2	0,21	0,06	0,18	0,07
AD-53806	AD-56986,1	0,23	0,05	0,20	0,06
AD-53806	AD-56986,2	0,24	0,04	0,25	0,13
AD-53806	AD-56989,1	0,31	0,02	0,43	0,00
AD-53806	AD-56990,1	0,27	0,00	0,28	0,10
AD-53806	AD-56992,1	0,27	0,06	0,31	0,01
AD-53806	AD-56992,2	0,22	0,10	0,30	0,14
AD-53806	AD-56994,1	0,97	0,05	0,85	0,09
AD-53806	AD-56994,2	0,22	0,09	0,26	0,01
AD-53806	AD-56996,1	0,18	0,04	0,31	0,08
AD-53806	AD-57001,1	0,24	0,09	0,23	0,08
AD-53806	AD-57007,1	0,25	0,01	0,27	0,03
AD-53806	AD-57013,1	0,30	0,08	0,33	0,02
AD-53806	AD-57019,1	0,29	0,03	0,28	0,02
AD-53806	AD-57022,1	0,20	0,06	0,21	0,05
AD-53806	AD-57025,1	0,23	0,12	0,25	0,15
AD-53806	AD-56997,1	0,20	0,05	0,25	0,11
AD-53806	AD-57002,1	0,21	0,07	0,28	0,01
AD-53806	AD-57008,1	0,26	0,01	0,31	0,01
AD-53806	AD-57014,1	0,32	0,03	0,43	0,05

AD-53806	AD-57020,1	0,19	0,00	0,23	0,01
AD-53806	AD-57020,2	0,20	0,08	0,28	0,22
AD-53806	AD-57026,1	0,34	0,24	0,37	0,24
AD-53806	AD-57003,1	0,34	0,04	0,45	0,15
AD-53806	AD-57009,1	0,30	0,07	0,40	0,02
AD-53806	AD-57015,1	0,32	0,01	0,47	0,04
AD-53806	AD-57023,1	0,17	0,06	0,27	0,13
AD-53806	AD-57027,1	0,20	0,03	0,19	0,11
AD-53806	AD-56998,1	0,23	0,09	0,29	0,24
AD-53806	AD-57004,1	0,24	0,13	0,30	0,12
AD-53806	AD-57010,1	0,23	0,09	0,23	0,11
AD-53806	AD-57016,1	0,21	0,03	0,23	0,06
AD-53806	AD-56999,2	0,25	0,10	0,35	0,05
AD-53806	AD-56999,1	0,24	0,08	0,28	0,21
AD-53806	AD-57021,1	0,18	0,04	0,29	0,17
AD-53806	AD-57024,1	0,20	0,09	0,28	0,11
AD-53806	AD-57005,1	0,18	0,10	0,29	0,17
AD-53806	AD-57011,1	0,21	0,07	0,26	0,12
AD-53806	AD-57017,1	0,20	0,07	0,29	0,21
AD-53806	AD-57000,2	0,20	0,04	0,29	0,21
AD-53806	AD-57000,3	0,22	0,11	0,30	0,16
AD-53806	AD-57000,1	0,25	0,14	0,38	0,33
AD-53806	AD-57006,2	0,22	0,14	0,31	0,18
AD-53806	AD-57006,3	0,19	0,09	0,31	0,25
AD-53806	AD-57006,1	0,20	0,12	0,41	0,29
AD-53806	AD-57012,1	0,16	0,05	0,36	0,17
AD-53806	AD-57018,1	0,20	0,37	0,10	0,14

Для того чтобы определить, является ли любая из siRNA из *in vitro* SAR-теста более эффективной в отношении сайленсинга PCSK9, чем исходная siRNA (AD-53815) к PCSK9, транс генным мышам вводили разовую дозу siRNA 3 мг/кг, как показано на фиг. 4, и через 72 ч после введения дозы уровни белка PCSK9 определяли при помощи анализа ELISA. Результаты, показанные на фиг. 5, свидетельствуют о том, что AD-57928 неожиданно эффективно в отношении сайленсинга PCSK9. На фиг. 6 показано, что не только разовая доза AD-57928 эффективно осуществляла "нокдаун" экспрессии белка PCSK9, но также имел место дозозависимый эффект при применении AD-57928.

Пример 4. Исследование с дробной дозой с применением AD-57928.

Способность AD-57928 подавлять экспрессию белка PCSK9 оценивали путем измерения уровней белка PCSK9 человека (hPCSK9) в сыворотке трансгенных по hPCSK9 мышей после введения AD-57928. AD-57928 вводили подкожно, используя шесть различных схем дозирования, которые включали "фазу насыщения" в течение первой недели (одна доза 0,5, 1 или 2 мг/кг ежедневно на протяжении 5 последовательных дней) с последующей "фазой поддержания" (один или два раза в неделю вводили дозу либо 0,5, 1 либо в 2 мг/кг на протяжении 5 недель), которые описаны в табл. 8 ниже. Последнюю дозу вводили на 38 день. Каждую схему дозирования исследовали, используя группу из 3 мышей, которая включала двух самцов и одну самку. Контрольная группа получала инъекции с PBS.

Таблица 8. Схемы дозирования для введения AD-57928

Исследуемый объект	1 неделя		2-6 недели	
	Доза насыщения (мг/кг)	Общая доза (мг/кг)	Поддерживающая доза (мг/кг)	Общая недельная доза (мг/кг)
PBS	5x	0	2x	0
AD-57928	5x2	10	2x2	4
AD-57928	5x2	10	1x2	2
AD-57928	5x1	5	2x1	2
AD-57928	5x1	5	1x1	1
AD-57928	5x0,5	2,5	2x0,5	1
AD-57928	5x0,5	2,5	1x0,5	0,5

Сыворотку собирали за 3 дня до введения первой дозы и в 1, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 52, 59 и 65 день после первой дозы. Уровни белка PCSK9 в сыворотке оценивали при помощи анализа ELISA. Результаты показаны на фиг. 6, 7 и 8.

Снижение уровней сывороточного белка hPCSK9 наблюдали через 72 ч после первой дозы, и оно продержалось до 38 дня. Введение AD-57928 на уровне доз насыщения 5x2, 5x1 и 5x0,5 мг/кг приводило к ~90, ~70 и ~60% снижению уровней сывороточного белка hPCSK9 соответственно (см. фиг. 6-8). В группе, которой вводили дозы используя 2x схему дозирования для поддержания, сниженные уровни hPCSK9 продержались на 1 неделю дольше, чем в группе, которой вводили дозы, используя 1x схему дозирования для поддержания, и вернулись к исходному уровню через 4 недели после последней дозы (см. фиг. 6-8).

Пример 5. Фосфотиоатное титрование.

Для того чтобы определить эффект количества и положения фосфотиоатных модификаций на способность dsRNA ингибировать экспрессию PCSK9, было получено и исследовано некоторое количество siRNA, основанных на исходных последовательностях AD-57928, AD-53806 и AD-53830, которые показаны в табл. 9. Для того чтобы определить, является ли любая из siRNA более эффективной в отношении сайленсинга PCSK9, чем AD-57928, трансгенным по PCSK9 мышам вводили разовую дозу 0,3 мг/кг siRNA из табл. 9 и через 72 ч после введения дозы уровни белка PCSK9 определяли при помощи анализа ELISA. Результаты, показанные на фиг. 9, свидетельствуют о том, что AD-57928 неожиданно эффективно в отношении сайленсинга PCSK9. AD-58893, AD-58894, AD-58896, AD-58897, AD-58898 и AD-58899 также были способны осуществлять сайленсинг PCSK9 по сравнению с контролем.

Таблица 9. Используемые в эксперименте с фосфотиоатным титрованием siRNA

ID дуплекса	Смысловая последовательность	SEQ ID NO:	Антисмысловая последовательность	SEQ ID NO:	Химическая структура
AD-57928	CfsusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgU fL96	1557	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs asa	1567	TOFFEE с 6 PS и 3OMe на 3'-конце AS
AD-58893	CfsuAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUf L96	1558	asCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgas a	1568	TOFFEE с 3 внешними PS
AD-	CfusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUf	1559	aCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsa	1569	TOFFEE с 3

58894	L96		a		внутренними PS
AD-58895	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL 96	1560	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs asa	1570	TOFFEE только с 4 PS в антисмысловой нити
AD-58896	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgU fl96	1561	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgaa	1571	TOFFEE только с 2 PS в смысловой нити
AD-58897	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfg UfL96	1562	asCfsasAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs sasa	1572	TOFFEE с 9 PS
AD-58898	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfg UfL96	1563	asCfsaAfaAfgCfsaAfaacAfgGfuCfuAfs gsasa	1573	TOFFEE с 10 PS
AD-58899	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsg UfL96	1564	asCfsaAfaAfgCfsaAfaacAfgGfuCfuAfs gsasa	1574	TOFFEE с 11 PS
AD-58900	CfsasAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuU fl96	1565	asAfsaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfsg csu	1575	6PS-версия AD- 53806
AD-58902	UfsusUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuU fl96	1566	asAfgCfaAfaAfcAfgguCfuAfgAfaAfas gsu	1576	6PS-версия AD- 53830

Пример 6. Уровни лекарственного средства в печени AD-57928 и AD-58895.

Задачей данного исследования было количественно измерить уровни siRNA в печени мышей дико-го типа для того, чтобы определить соответствующие условия для тестирования в отношении уровней лекарственного средства. Использованными в эксперименте siRNA были AD-57928 и AD-58895 (которые не вызвали снижение уровня белка PCSK9 в примере 5). AD-58895 использовали в качестве препарата сравнения для определения моментов времени, при которых наблюдается различие в уровне лекарственного средства, отражающем эффективность.

Всего 33 самки мышей C57B6 использовали в эксперименте (3 мыши в группе). Этим мышам вводили разовую подкожную дозу либо AD-57928, AD-58895, либо PBS в качестве контроля. Печени собирали через 4, 24, 48, 72, 96 и 168 ч после введения дозы. Собирали два экземпляра аликвотных проб тканей на образец и концентрацию siRNA в печени измеряли с использованием специфичного к вновь сконструированной антисмысловой последовательности анализа qRT-PCR. Измеренное количество AD-57928 и AD-58895 на грамм печени в динамике показано на фиг. 10, и количество AD-57928 и AD-58895, выраженное как процент от общей теоретической дозы, показано на фиг. 11. Предел обнаружения (LOD) анализа qRT-PCR составлял ~1 нг/г печени, и анализ показал хорошую продуктивность и точную воспроизводимость дубликатов. Из результатов видно, что AD-57928 более стабильно в печени, а AD-58895 менее стабильно, и оба можно обнаружить во все моменты времени. На 7 день после введения дозы уровень AD-57928 в >100 раз превышал LOD анализа qRT-PCR, а уровень AD-58895 в >10 раз превышал LOD. В среднем имеет место >10-кратное различие концентраций AD-57928 и AD-58895 согласно их предсказанной стабильности и наблюдаемой эффективности. Моменты времени от 72 до 120 ч после введения дозы могут подходить для тестов, основанных на концентрации siRNA.

Пример 7. Оптимизация AD-57928.

Для повышения активности и стабильности AD-57928 *in vivo* получали дополнительные средства, представляющие собой иРНК, основанные на исходных последовательностях AD-57928, и исследовали их (табл. 10; "смысловые" последовательности в табл. 10 раскрыты как SEQ ID NO: 1653-1658, соответственно, в порядке встречаемости, а "антисмысловые" последовательности раскрыты как SEQ ID NO: 1659-1664, соответственно, в порядке встречаемости; те же смысловые и антисмысловые последовательности, раскрыты в табл. 10, также раскрыты на фиг. 12A).

Немодифицированные смысловые и антисмысловые последовательности для AD-60212 представляют собой следующие:

смысловая – 5'- CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU – 3' (A-122088.3; SEQ ID NO:1665); и

антисмысловая – 5'- ACAAAAGCAAAACAGGUCUAGAA - 3'(A-120190,19; SEQ ID NO:1666).

В общем, эти соединения содержали меньшее количество 2'-фтор-модификаций, и фтор-модифицированные уридины были удалены. Действенность *in vitro* этих дуплексов исследовали при помощи трансфекции клеток HeLa и Hep3b. Как показано на фиг. 12B, AD-59849, AD-59228 и AD-60212

имели значения IC<sub>50</sub>, сравнимые с исходными (AD-57928).

Способность этих дуплексов сохраняться *in vivo* в печени также определяли путем введения 1 мг/кг каждого дуплекса мышам дикого типа и определения уровня siRNA при помощи количественной PCR. Как показано на фиг. 13, все дуплексы демонстрировали большую стабильность в печени, чем исходный дуплекс, начиная с момента времени 120 ч после введения.

Способность этих дуплексов подавлять экспрессию белка PCSK9 также оценивали *in vivo* путем измерения уровней белка PCSK9, LDL, HDL, общего холестерина (Тс), триглицеридов (Тг), аланин-трансаминазы (ALT), аспаргатамино-трансферазы (AST) и щелочной фосфатазы (ALP) в сыворотке низших приматов (NHP). Также контролировали наличие реакции в месте инъекции. Дуплексы вводили, используя схему дозирования, которая включала "фазу насыщения" в течение первой недели (одна доза 2 мг/кг ежедневно на протяжении 5 последовательных дней, qdx5) с последующей "фазой поддержания" (три еженедельные дозы 2 мг/кг на протяжении 3 недель, qwx3), которые описаны в табл. 11 ниже.

Таблица 10. Дополнительные средства, представляющие собой иРНК

Дуплекс	ID смысловой	Смысловая	ID антисмысловой	Антисмысловая
AD-57928 (parent)	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-117429	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59849	A-121244	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgcuuuuguL96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-60688	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-59223	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	A-120190	asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-60212	A-122088	csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96	A-120190	asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-59228	A-120197	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfsL96	A-120202	asCfsaAfaAfsGcfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa

Таблица 11. Схемы дозирования

Исследуемый объект	Номер группы	N	Уровень дозы (мг/кг)	Частота введения дозы	Кумулятивная доза (мг/кг)
AD-57928	1	3 самки	2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-59849	2		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-60688	3		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-59223	4		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-60212	5		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
AD-59228	6		2	qdx5+qwx3, 8 доз	16
Кровь: дни: -9, -6, -3, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 42, 49, 56, 63 (первая доза, 1 день) Наблюдение за местом инъекции: Да Показатели: белок PCSK9, LDL, HDL, Тс, Trig, ALT, AST, ALP					

Как показано на фиг. 14А и 14В, для всех соединений, за исключением AD-60688, сайленсинг PCSK9 достигал более 80%, и у отдельных животных в группе с AD-60212 сайленсинг PCSK9 достигал более 90%. На фиг. 15 показано, что при отсутствии статина для всех соединений, за исключением AD-60688, снижение уровня холестерина LDL достигало 60%, а у отдельных животных в группе с AD-59223 снижение уровня холестерина LDL достигало вплоть до 77%. На удивление, и как показано на фиг. 18, указанные средства продолжали снижать уровень холестерина в течение 46 дней после последней дозы указанных средств. Даже более удивительно, и как показано на фиг. 19, AD-60212 и AD-59849 продол-

жали снижать уровень холестерина LDL вплоть до 60%, по меньшей мере до 120 дней (93 дней после последней дозы) дольше, чем любое действие, наблюдаемое для средства для RNAi *in vivo*, что указывает на то, что после фазы насыщения эти соединения можно вводить с частотой один раз в месяц, один раз каждые два месяца, один раз каждые три месяца, один раз каждые четыре месяца, один раз каждые пять месяцев или один раз каждые шесть месяцев на протяжении фазы поддержания.

Пример 8. Получение дополнительных основанных на AD-57928 последовательностей к PCSK9.

Получали дополнительные средства, представляющие собой иРНК, основанные на исходных последовательностях AD-57928 (см. табл. 12 ниже), и исследовали *in vitro* на действенность при помощи трансфекции клеток HeLa и Hep3В этими средствами. Значения IC<sub>50</sub> для этих средств показаны в табл. 13.

Таблица 12. Последовательности к PCSK9

ID	Смыслова	Смысловая (от 5' к 3')	SEQ ID	Антисмыс	Антисмысловая (от 5' к 3')	SEQ ID
дуплекса	я нить		NO:	ловая		NO:
AD-						
57928.45	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1577	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1605
AD-60928.1	A-122701.2	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgAfl96	1578	A-122702.2	usCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1606
AD-60929.1	A-122703.2	GfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1579	A-122704.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfcusu	1607
AD-60930.1	A-122705.2	GfsasAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1580	A-122706.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuUfcsusu	1608
AD-60931.1	A-122707.3	GfsasUfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1581	A-122708.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfaUfcsusu	1609
AD-60932.1	A-122707.4	GfsasUfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1582	A-122709.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfaUfcsasa	1610
AD-60933.1	A-122710.2	CfsusUfcAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1583	A-122711.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuGfaUfcsasa	1611
AD-60934.1	A-122712.2	CfsusUfcUfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1584	A-122713.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfaGfaAfgsasa	1612
AD-60927.1	A-122714.2	CfsusAfcUfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1585	A-122715.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgCfaGfaAfgsasa	1613
AD-60906.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1587	A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1615
AD-60907.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1588	A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1616
AD-60908.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1589	A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)acAfgGfuCfuAfgsasa	1617
AD-60909.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	1590	A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAf(Gyh)GfuCf(Uyh)Afg	1618
AD-60910.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96 Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1591	A-122313.1	sasa	1619
AD-60911.1	A-122307.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96 (Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1592	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1620
AD-60912.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96 Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1593	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1621
AD-60913.1	A-122307.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96	1594	A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1622
AD-60914.1	A-122307.1	Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh) Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96 Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1595	A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1623
AD-60915.1	A-122307.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96	1596	A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)jacAfgGfuCfuAfgsasa	1624
AD-						
57928.45	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96 Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1597	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1625
AD-60916.1	A-122307.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96 (Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1598	A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa	1626
AD-60918.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96	1600	A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1628
AD-60919.1		(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh) Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96 (Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1601	A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1629
AD-60920.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96 (Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1602	A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)jacAfgGfuCfuAfgsasa	1630
AD-60921.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96 (Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)	1603	A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAf(Gyh)GfuCf(Uyh)Afg	1631
AD-60922.1	A-122308.1	Uf(Uyh)Uf(Gyh)Ufl96	1604	A-122313.1	sasa	1632

Таблица 13. Значения IC<sub>50</sub> для средств, представляющих собой иРНК, определенных в табл. 12

ID дуплекса	HeLa, IC <sub>50</sub> (нМ)	НерЗв, IC <sub>50</sub> (нМ)
AD-57928,47	0,0026	0,0005
AD-60928,1	0,0000	0,0009
AD-60929,1	0,0010	0,0027
AD-60930,1	0,0055	0,0019
AD-60931,1	0,0028	0,0019
AD-60932,1	0,0039	0,0036
AD-60933,1	0,0349	0,1518
AD-60934,1	0,2115	0,5420
AD-60927,1	>10	-
AD-57928,45	<3,57225e-005	0,0007
AD-60906,1	0,0048	0,0007
AD-60907,1	0,0001	<3,57225e-005
AD-60908,1	0,0003	0,0072
AD-60909,1	-	0,0142
AD-60910,1	0,0001	0,0030
AD-60911,1	0,0955	0,1935
AD-60912,1	0,1834	0,4106
AD-60913,1	0,2693	0,5715
AD-60914,1	0,2292	0,4319
AD-60915,1	0,2069	0,3185
AD-57928,45	0,0057	0,0027
AD-60916,1	0,0802	0,2040
AD-60917,1	0,1420	0,0976
AD-60918,1	0,4101	0,3268
AD-60919,1	0,3202	0,5143
AD-60920,1	0,5199	0,5978
AD-60921,1	0,7969	2,0875
AD-60922,1	1,1078	1,0307

Пример 9. Эффективность повторной дозы AD-57928.

Эффективность повторной дозы AD-57928 в подавлении экспрессии белка PCSK9 оценивали *in vivo* путем измерения уровней белка PCSK9, LDL, HDL, общего холестерина (Тс), триглицеридов (Тг), аланин-трансаминазы (ALT), аспаргатаминотрансферазы (AST) и щелочной фосфатазы (ALP) в сыворотке низших приматов (NHP). Также контролировали наличие реакции в месте инъекции. Дуплексы AD-57928 вводили подкожно с применением схем дозирования, описанных в табл. 14 ниже. Группам из 5 животных повторно вводили разовую дозу 25 мг/кг на 92 день. Одной дополнительной группе животных вводили разовую дозу 25 мг/кг. "2xw" означает два раза в неделю; "q2w" означает один раз каждые две недели; и "q1w" означает один раз в неделю.

Таблица 14. Схемы дозирования

Исследуемый объект	Номер группы	N	Уровень дозы (мг/кг)	Частота введения дозы	Кумулятивная доза (мг)
AD-57928	1	3 самки	1	2хw, 12 доз	12
	2		2	2хw, 12 доз	24
	3		1	q2w, 6 доз	6
	4		2	q2w, 6 доз	12
	5		0,5	q1w, 6 доз	3
	6		1	q1w, 10 доз	10
	7		2	q1w, 10 доз	20

Кровь: дни -9, -6, -3, 1 (предварительно отобранная кровь), 3-129 (эффективность в образцах крови)  
 Наблюдение за местом инъекции: да  
 Показатели: белок PCSK9, LDL, HDL, Tc, Trig, ALT, AST, ALP

Как показано на фиг. 14А и 14В, для всех соединений, за исключением AD-60688, сайленсинг PCSK9 достигал более 80%, и у отдельных животных в группе с AD-60212 сайленсинг PCSK9 достигал более 90%. На фиг. 15 показано, что при отсутствии статина для всех соединений, за исключением AD-60688, снижение уровня холестерина LDL достигало 60%, а у отдельных животных в группе с AD-59223 снижение уровня холестерина LDL достигало вплоть до 77%.

Как показано на фиг. 16А, наиболее эффективным режимом для снижения LDL был режим с введением два раза в неделю (2хw), при котором снижение уровней LDL достигало примерно 60%. Та же кумулятивная доза, вводимая реже, была менее эффективной, чем режим с введением два раза в неделю. На фиг. 16В показано, что при режиме 2хw сайленсинг PCSK9 достигал более 80%.

На фиг. 17А и 17В показано, что разовая доза AD-57928 25 мг/кг характеризуется таким же началом снижения уровня LDL и PCSK9, таким же самым низким уровнем при снижении уровня PCSK9 и LDL и эквивалентной скоростью снижения уровня LDL, что и более низкая многократная доза AD-57928 2 мг/кг, вводимая два раза в неделю (2хw). Из этих графиков также видно, что существует тенденция к более быстрому снижению уровня PCSK9 при разовой дозе 25 мг/кг, и что для разовой дозы 25 мг/кг восстановление как уровней PCSK9, так и уровней LDL начинается примерно через 20 дней после достижения самого низкого уровня (7 день). Самый низкий уровень для разовой дозы 25 мг/кг наблюдали на 7 день.

Пример 10. Переносимость оптимизированных средств, представляющих собой иРНК, AD-57928.

Дополнительные средства, представляющие собой иРНК, полученные на основании исходных последовательностей AD-57928, описанные на фиг. 12А (и в табл. 10), оценивали на переносимость на крысах. Самцам крыс подкожно вводили 225 мг/кг указанных средств, представляющих собой иРНК, на 1, 8 и 15 дни и их умерщвляли и проводили им вскрытие на 16 день (см. табл. 15). Животных каждый день наблюдали в отношении любых клинических симптомов и вес тела животных определяли перед исследованием и каждую неделю на протяжении исследования. На 16 день кровь животных оценивали гематологически на свертываемость и проводили биохимический анализ сыворотки, метаболизм лекарственного средства и фармакокинетику средств определяли с использованием образцов печени животных; и сердце, легкие (инсуфлированные), почки, печень, селезенку, яички и первое и последнее места инъекции анализировали на предмет любых изменений. Не было никаких изменений в клинических признаках, данных визуального наблюдения места инъекции, биохимическом анализе сыворотки, свертываемости или микроскопической патологической анатомии печени, селезенки, легкого, сердца или яичек. В табл. 16 представлены обобщенные данные по массе печени, конечной массе тела, результаты гематологических анализов и оценка тяжести патологии для мест последней инъекции и почек для каждого исследованного средства.

Таблица 15. Схемы дозирования

Группа дозы	ТА	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг г)	Кол-во самцов	Схема дозирования	День Nx
1	PBS	0	5	3	SC в 1, 8 и 15 дни	16 день
2	AD-57928 (исходное)	225		3		
3	AD-59849	225		3		
4	AD-59223	225		3		
5	AD-59228	225		3		
6	AD-60688	225		3		
7	AD-60212	225		3		

Таблица 16. Обобщенные данные по переносимости

	<u>AD-57928</u> (исходное)	<u>AD-59849</u>	<u>AD-59223</u>	<u>AD-59228</u>	<u>AD-60688</u>	<u>AD-60212</u>
Кол-во PS	6	6	6	13	6	6
Кол-во 2'F	21	15	12	21	9	12

Кол-во dT	0	0	0	0	0	1
[печень] (мкг/г)	907±62	1139±160	1277±231	1999±424	1624±147	1258±286
Конечная BW (% от контроля)	-2,1%	-4,6%	-2,1%	-6,8%	-0,5%	-2,9%
16 день Общий анализ крови	Без изменени й	Без изменений	↑WBC, ↑LYM, гемолиз	Без изменений	Без изменений	Без изменений
16 день, воспаление в месте последней инъекции	3/3 (1,7)	3/3 (1,3)	2/3 (1,5)	3/3 (2,3)	2/3 (1,0)	3/3 (1,3)
16 день, базофильны е гранулы, почка	3/3 (2,0)	3/3 (2,3)	3/3 (1,0)	3/3 (2,0)	3/3 (1,3)	3/3 (1,3)

Оценка тяжести патологии: 1 - минимальная; 2 - слабая; 3 - умеренная;  
BW - масса тела;  
WBC - белая кровяная клетка;  
LYM - лимфоциты.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечный РНКi-агент, который ингибирует экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке,

где указанный двухцепочечный РНКi-агент содержит смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, образуя двухцепочечный участок;

где указанная антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей PCSK9;

где длина каждой цепи независимо составляет от 19 до 30 нуклеотидов;

где указанная антисмысловая цепь содержит по крайней мере 19 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности



где указанный двухцепочечный РНКi-агент содержит по крайней мере один модифицированный нуклеотид, выбранный из группы, состоящей из 2'-О-метила, 2'-фтора и 2'-дезокситимидина (dT);

где антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя нуклеотидами на 3'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя нуклеотидами на 5'-конце; и

где смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя нуклеотидами на 5'-конце; и

где по меньшей мере одна смысловая цепь конъюгирована с лигандом, содержащим одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

2. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором длина двухцепочечной области составляет 19-25 пар нуклеотидов.

3. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором длина двухцепочечной области составляет 19-23 пар нуклеотидов.

4. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором длина двухцепочечной области составляет 21-25 пар нуклеотидов.

5. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором длина двухцепочечной области составляет 23-27 пар нуклеотидов.

6. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором длина двухцепочечной области составляет 19-21 пар нуклеотидов.

7. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором длина двухцепочечной области составляет 21-23 пар нуклеотидов.

8. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором каждая цепь состоит из 19-25 нуклеотидов.

9. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором смысловая цепь имеет всего 21 нуклеотид и антисмысловая цепь имеет всего 23 нуклеотида.

10. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором область, комплементарная части мРНК, кодирующей PCSK9, содержит нуклеотидную последовательность

5' - ACAAAGCAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO:1666) .

11. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

5' - CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO:1665)

и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

5' - ACAAAGCAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO:1666) .

12. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

5' - ACAAAGCAAACAGGUCUAG-3' (SEQ ID NO:412)

и смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

5' - AGACCUGUUUUGCUUUUUGU-3' (SEQ ID NO:191) .

13. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

5' - ACAAAGCAAACAGGUCUAGAA-3' (SEQ ID NO:1666)

и смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

5' - CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU-3' (SEQ ID NO:1665) .

14. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

5' - csusaqacCfuGfudTuuqcuuuuqu-3' (SEQ ID NO:1657)

и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

5' - asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO:1663) ,

где а, с, g и u представляют собой 2'-О-метил (2'-ОМе) А, С, G и U соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор А, С, G и U соответственно; dT представляет собой 2'-дезокситимидин; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

15. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором двухцепочечный РНКi-агент содержит

(а) антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa-3' (SEQ ID NO:1151) ,

и смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUf-3' (SEQ ID NO:600) ;

(b) антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa-3' (SEQ ID NO:1246) ,

и смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUf-3' (SEQ ID NO:695) ;

(c) антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa-3' (SEQ ID NO:1253) ,

и смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUf-3' (SEQ ID NO:702) ;

(d) антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsa-3' (SEQ ID NO:1263) ,

и смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUf-3' (SEQ ID NO:712) ;

(e) антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsa-3' (SEQ ID NO:1269) ,

и смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5' - AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUf-3' (SEQ ID NO:718) ;

(f) антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5'-asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa-3' (SEQ ID NO:1369),  
и смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5'-CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUf-3' (SEQ ID NO: 818);

(g) антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5'-asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa-3' (SEQ ID NO:1660),

и смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5'-CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuugu-3' (SEQ ID NO:1654); или

(h) антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5'-asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa-3' (SEQ ID NO:1400),

и смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности

5'-CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfs-3' (SEQ ID NO:849);

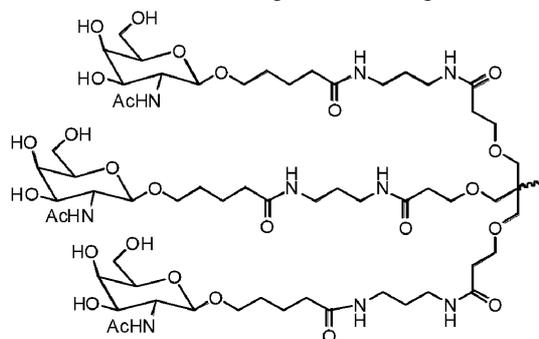
где a, g, c и u представляют собой модифицированные 2'-O-метилом (2'-OMe) A, C, G и U; Af, Gf, Cf и Uf представляют собой модифицированные 2'-фтором A, C, G и U нуклеотиды; dT представляет собой 2'-дезокситимидиновый нуклеотид; и s представляет собой фосфоротиоатную связь.

16. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором производное GalNAc присоединено к смысловой цепи.

17. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором практически все нуклеотиды смысловой цепи и практически все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами.

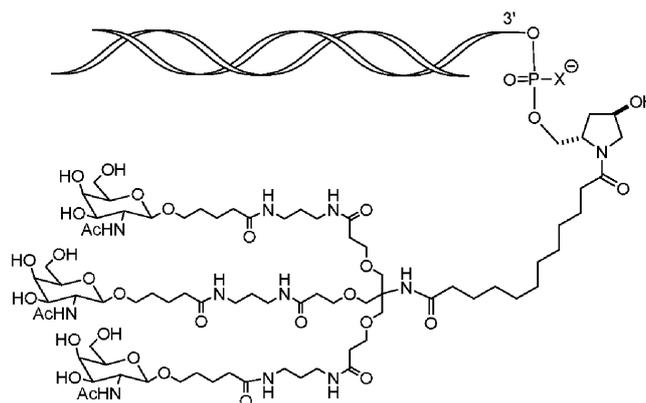
18. РНКi-агент по п.1, в котором все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи модифицированы.

19. Двухцепочечный РНКi-агент по п.1, в котором лиганд представляет собой



20. Двухцепочечный РНКi-агент по п.19, в котором лиганд присоединен к смысловой цепи на 3-конце.

21. Двухцепочечный РНКi-агент по п.20, который конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O или S.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая двухцепочечный РНКi-агент по п.1, для лечения индивида с расстройством, опосредованным экспрессией PCSK9.

23. Двухцепочечный РНКi-агент, который ингибирует экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кксин 9 (PCSK9) в клетке, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

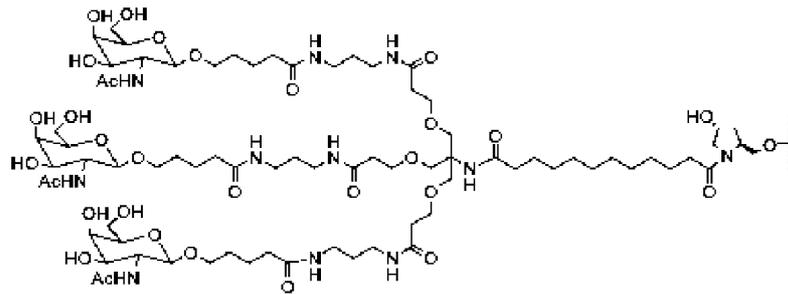
5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96-3' (SEQ ID NO:1657)

и антисмысловая цепь содержит нуклеотидную последовательность

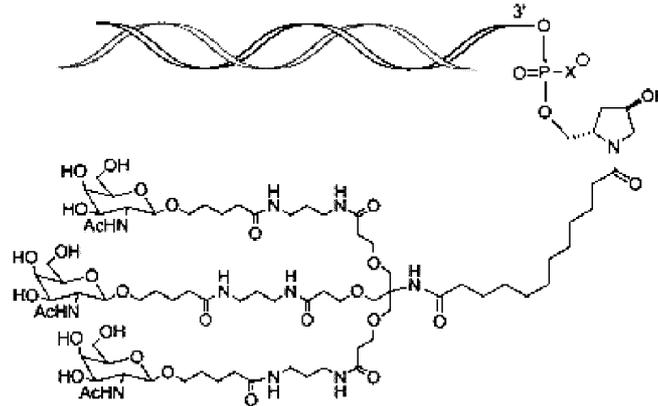
5'-asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO:1663),

где a, c, g и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, C, G и U соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор A, C, G и U соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь;

dT представляет собой 2'-дезокситимидин, где L96 представляет собой



где L96 конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи, как показано ниже на схеме:



где X представляет собой O.

24. Фармацевтическая композиция, содержащая двухцепочечный РНКi-агент по п.23, используемая в способе для лечения индивида с расстройством, опосредованным экспрессией PCSK9.

25. Фармацевтическая композиция по п.24, дополнительно содержащая незабуференный раствор.

26. Фармацевтическая композиция по п.25, в которой незабуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

27. Фармацевтическая композиция по п.24, дополнительно содержащая буферный раствор.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, в которой буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

29. Двухцепочечный РНКi-агент, который ингибирует экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, содержащий смысловую цепь и антисмысловую цепь,

где смысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

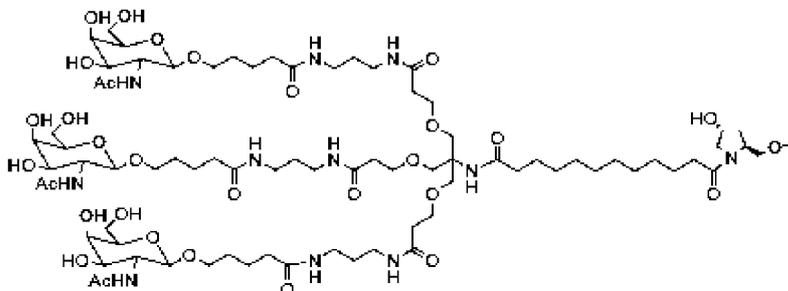
5' - csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96-3' (SEQ ID NO:1657)

и антисмысловая цепь состоит из нуклеотидной последовательности

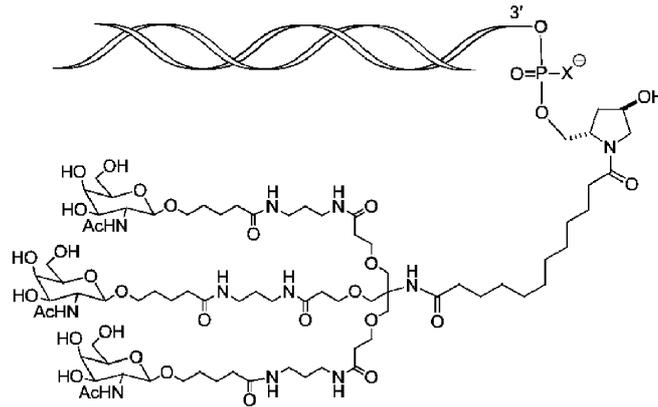
5' - asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO:1663),

где a, c, g и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, C, G и U соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор A, C, G и U соответственно; s представляет собой фосфоритоатную связь; dT представляет собой 2'-дезокситимидин, и

где L96 представляет собой



где L96 конъюгирован с 3-концом смысловой цепи, как показано ниже на схеме:



где X представляет собой O.

30. Фармацевтическая композиция, содержащая двухцепочечный РНКi-агент по п.29, используемая в способе для лечения индивида с расстройством, опосредованным экспрессией PCSK9.

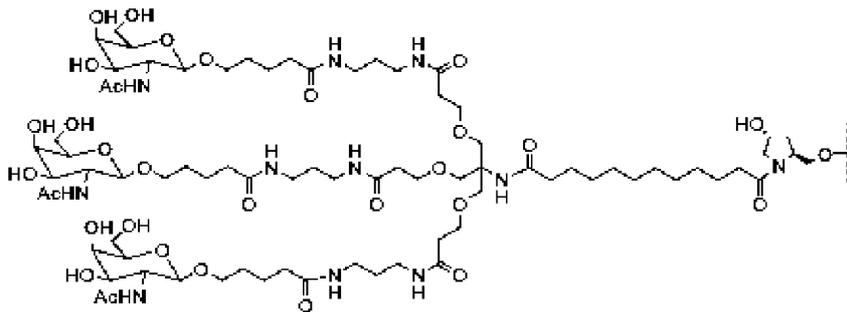
31. Двухцепочечный РНКi-агент, который ингибирует экспрессию пропротеин конвертазы субтилизин/кексин 9 (PCSK9) в клетке, содержащий антисмысловую цепь, которая отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности

5' - asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO:1663),

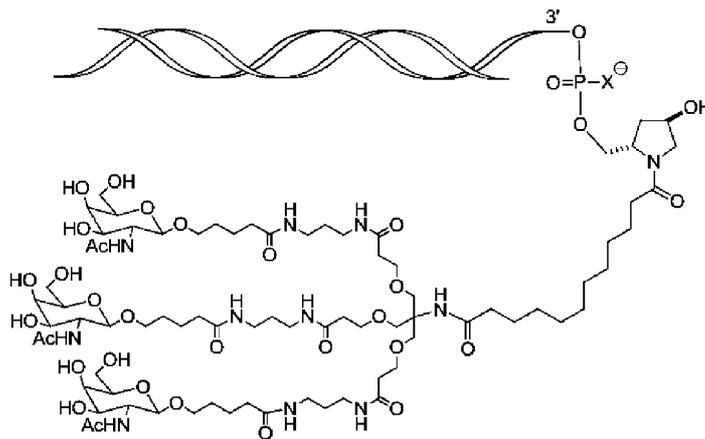
и смысловую цепь, которая отличается не более чем 4 основаниями от нуклеотидной последовательности

5' - csusagacCfuGfudTuugcuuuuuguL96- 3' (SEQ ID NO:1657),

где a, c, g и u представляют собой 2'-O-метил (2'-OMe) A, C, G и U соответственно; Af, Cf, Gf и Uf представляют собой 2'-фтор A, C, G и U соответственно; s представляет собой фосфоротиоатную связь; dT представляет собой 2'-дезокситимидин; и L96 представляет собой



и где L96 конъюгирован на 3'-конце смысловой цепи, как показано на следующей схеме:



где X представляет собой O.

32. Двухцепочечный РНКi-агент по по п.31, где антисмысловая цепь отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности

5' - asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO:1663),

и смысловая цепь отличается не более чем 3 основаниями от нуклеотидной последовательности

5' - csusagacCfuGfudTuugcuuuuuguL96-3' (SEQ ID NO:1657).

33. Двухцепочечный РНКi-агент по п.31, где антисмысловая цепь отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности

5'-asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa-3' (SEQ ID NO:1663),

и смысловая цепь отличается не более чем 2 основаниями от нуклеотидной последовательности

5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96-3' (SEQ ID NO:1657).

34. Фармацевтическая композиция, содержащая двухцепочечный РНКi-агент по п.61, используемая в способе для лечения индивида с расстройством, опосредованным экспрессией PCSK9.

35. Способ ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке, включающий:

(а) приведение клетки в контакт с двухцепочечным РНКi-агентом по любому из пп.1, 29 или 31 или с фармацевтической композицией по любому из пп.22, 30 или 34; и

(б) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в период времени, достаточный для получения деградации транскрипта мРНК гена PCSK9, тем самым ингибируя экспрессию гена PCSK9 в клетке.

36. Применение терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКi-агента по любому из пп.1, 29 или 31 или фармацевтической композиции по любому из пп.22, 30 или 34 для лечения индивида с липидемией, опосредованной экспрессией PCSK9.

37. Применение по п.36, при котором индивидом является человек.

38. Применение по п.37, при котором у человека имеется гиперхолестеринемия.

39. Применение по п.36, где двухцепочечный РНКi-агент предназначен для введения в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

40. Применение по п.36, при котором двухцепочечный РНКi-агент предназначен для введения в двух или более дозах.

41. Применение по п.40, при котором двухцепочечный РНКi-агент предназначен для введения в режиме дозирования, который включает фазу загрузки с последующей стадией поддержания.

42. Применение по п.41, при котором фаза поддержания включает дозу двухцепочечного РНКi-агента для введения индивиду один раз в три месяца.

43. Применение по п.41, при котором фаза поддержания включает введение дозы двухцепочечного РНКi-агента индивиду один раз в шесть месяцев.

44. Применение по п.36, при котором двухцепочечный РНКi-агент или фармацевтическая композиция предназначены для введения индивиду подкожно или внутривенно.

45. Способ ингибирования экспрессии PCSK9 в клетке, включающий:

(а) приведение клетки в контакт с двухцепочечным РНКi-агентом по п.23 или с фармацевтической композицией по п.24; и

(б) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение периода времени, достаточного для получения деградации транскрипта мРНК гена PCSK9, тем самым ингибируя экспрессию гена PCSK9 в клетке.

46. Применение терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКi-агента по п.23 или фармацевтической композиции по п.24 для лечения индивида с липидемией, опосредованной экспрессией PCSK9.

47. Применение по п.46, при котором индивидом является человек.

48. Применение по п.47, при котором у человека имеется гиперхолестеринемия.

49. Применение по п.46, при котором двухцепочечный РНКi-агент или фармацевтическая композиция предназначены для введения индивиду подкожно или внутривенно.

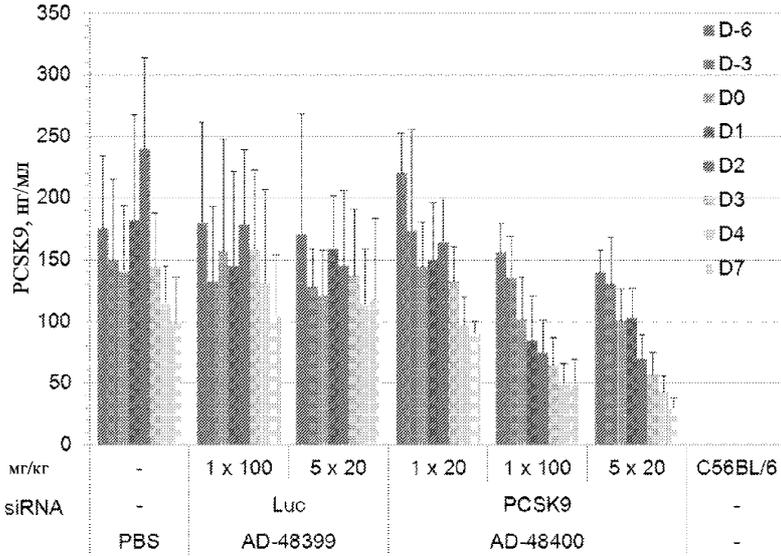
50. Применение по п.46, где двухцепочечный РНКi-агент предназначен для введения в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

51. Применение по п.46, при котором двухцепочечный РНКi-агент предназначен для введения в двух или более дозах.

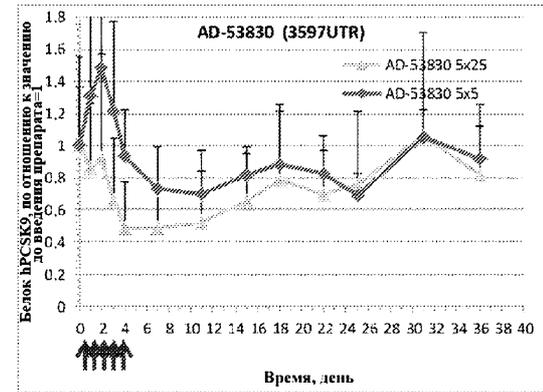
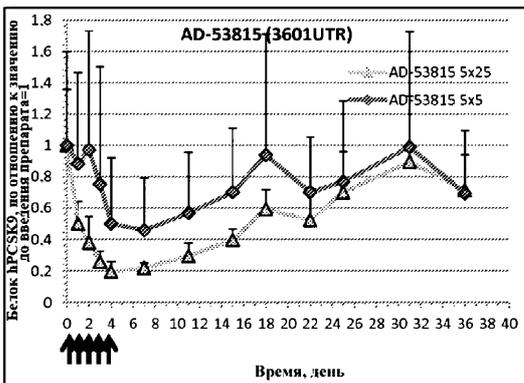
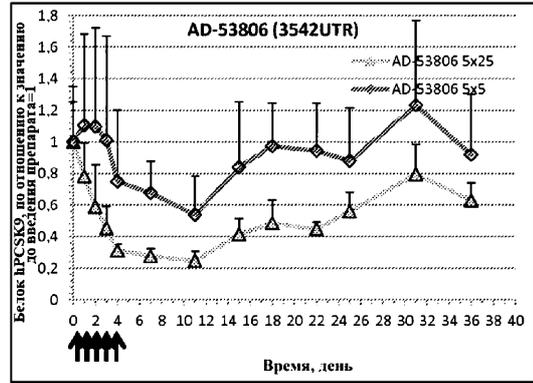
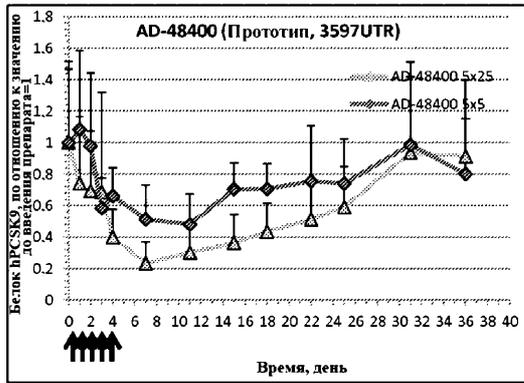
52. Применение по п.46, при котором двухцепочечный РНКi-агент предназначен для введения в режиме дозирования, который включает фазу загрузки с последующей стадией поддержания.

53. Применение по п.52, при котором фаза поддержания включает дозу двухцепочечного РНКi-агента для введения индивиду один раз в три месяца.

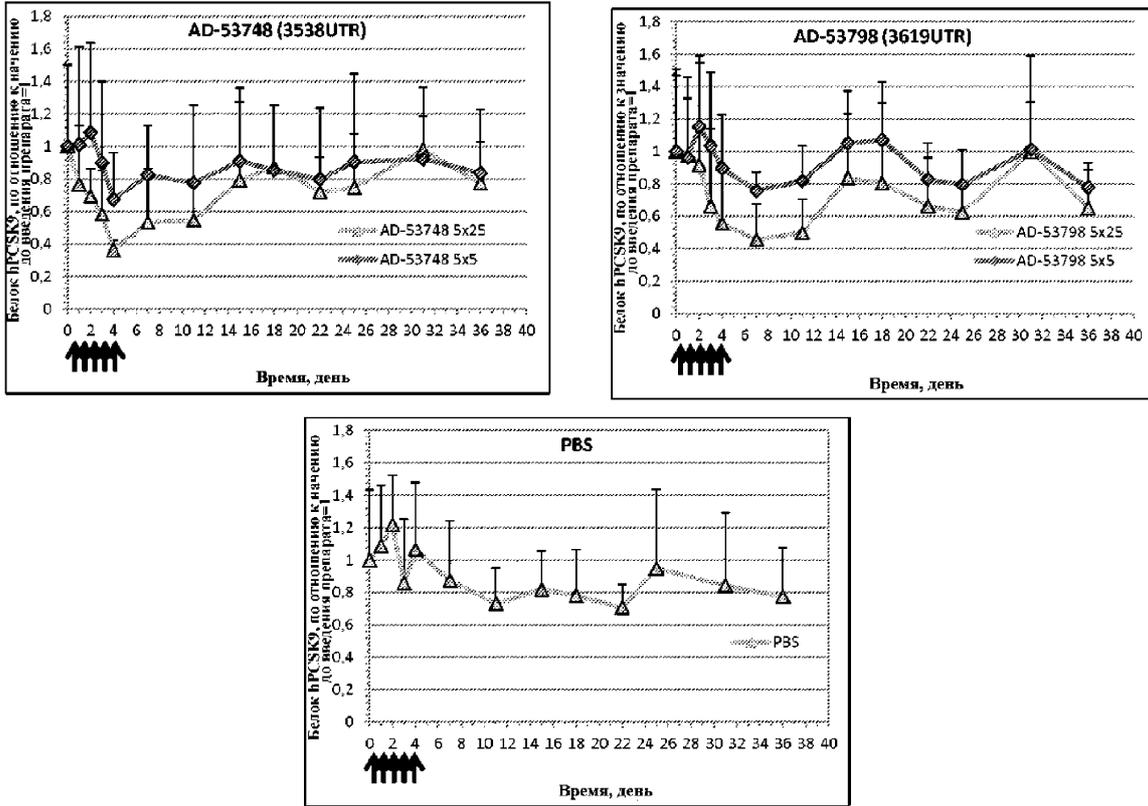
54. Применение по п.52, при котором фаза поддержания включает дозу двухцепочечного РНКi-агента для введения индивиду один раз в шесть месяцев.



Фиг. 1



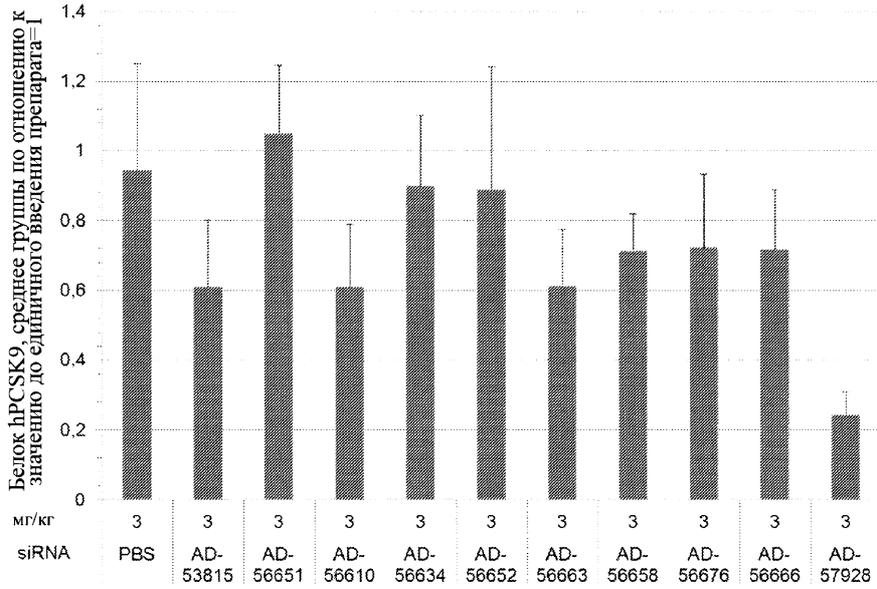
Фиг. 2А



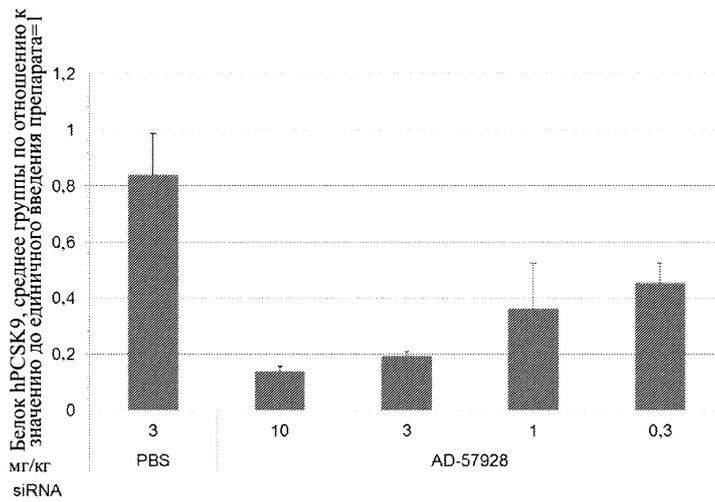
Фиг. 2В

Дуплекс	Смысловая		АС		Химическая структура
AD-53815.5	A-110695.11	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-109545.18	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23 (исходный)
AD-56651.1	A-115523.1	(iC)uAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-115524.1	(iA)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	21/23 + инвертированное основание
AD-56610.1	A-115523.2	(iC)uAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-115525.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	21/23 + инвертированное основание
AD-56634.1	A-115529.1	CbuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-115530.1	AbCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	21/23 + L-сахар
AD-56652.1	A-115533.1	CbuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuugUfl96	A-115532.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	21/23 + L-сахар
AD-56663.1	A-115552.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuuuUfgUfl96	A-115553.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23
AD-56658.1	A-115564.1	CfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-115565.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23
AD-56676.1	A-115584.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuuuUfgUfl96	A-115585.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	19/21
AD-56666.1	A-115596.1	AfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-115597.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsG	19/21
AD-57928	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	A-117429	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	6 PS вариант исходного

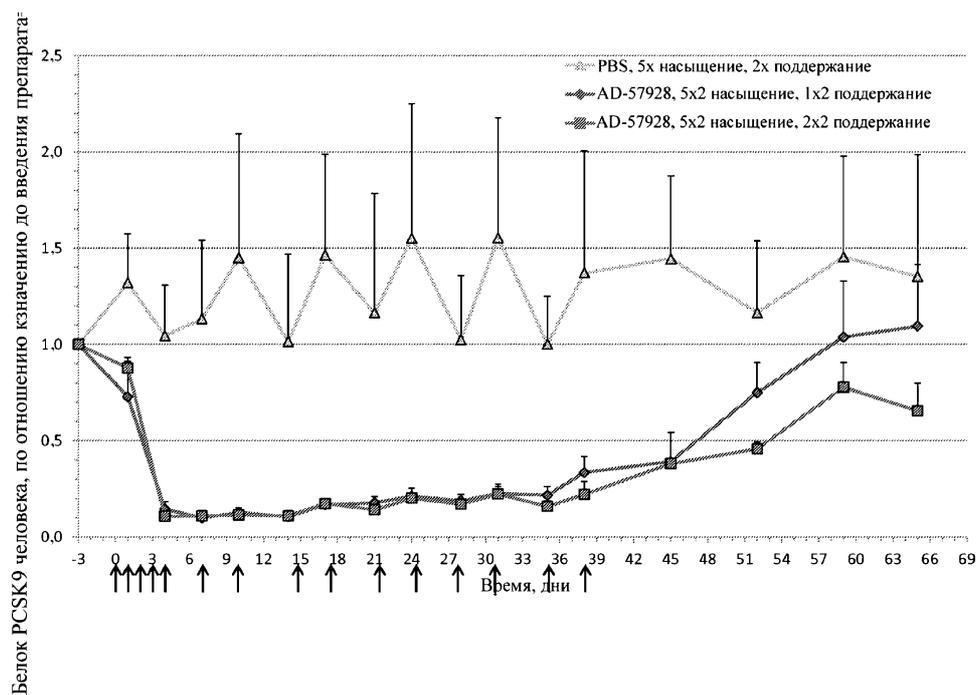
Фиг. 3



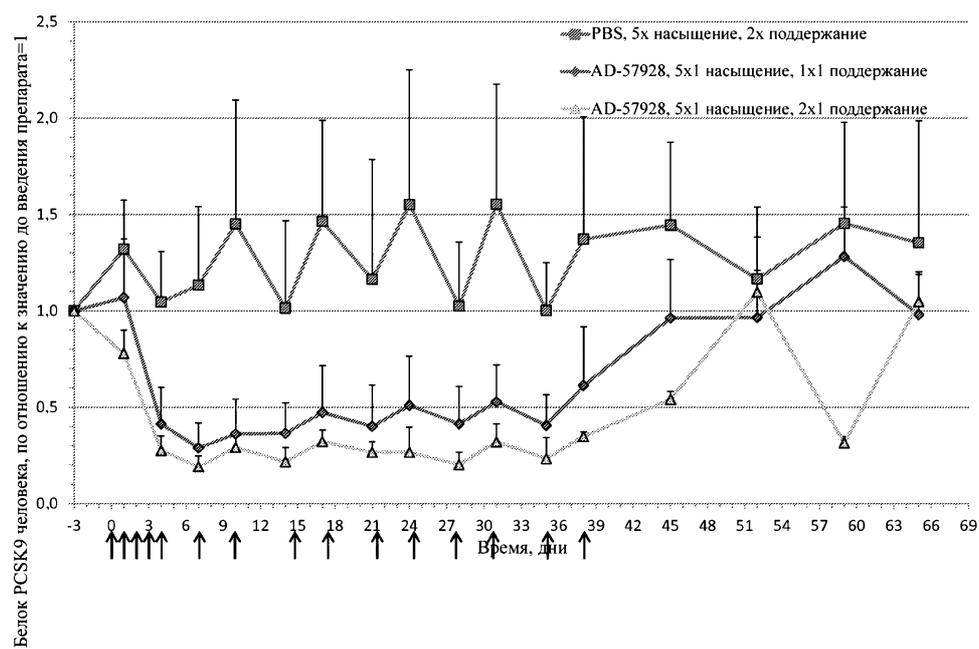
Фиг. 4



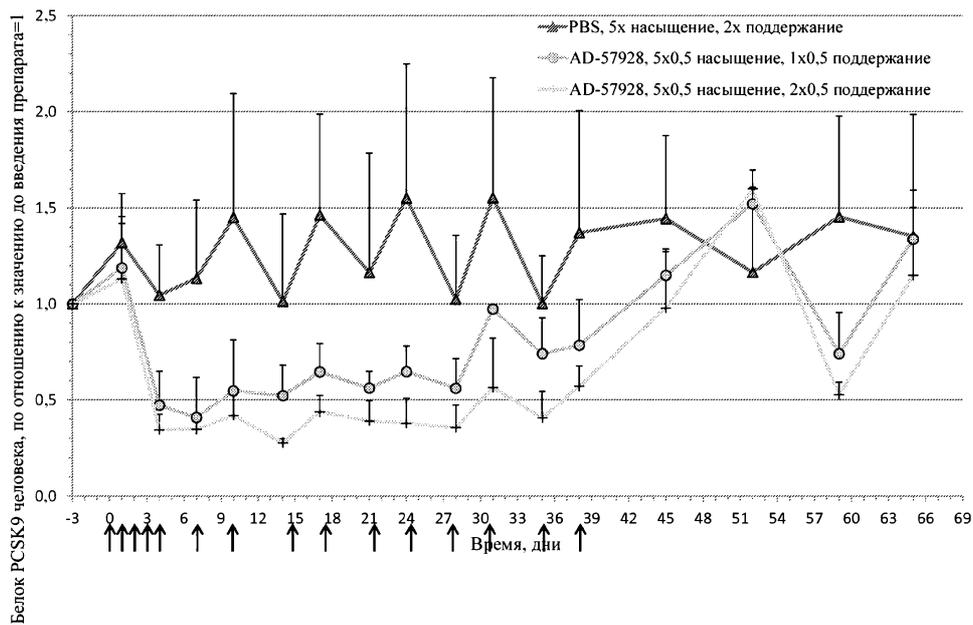
Фиг. 5



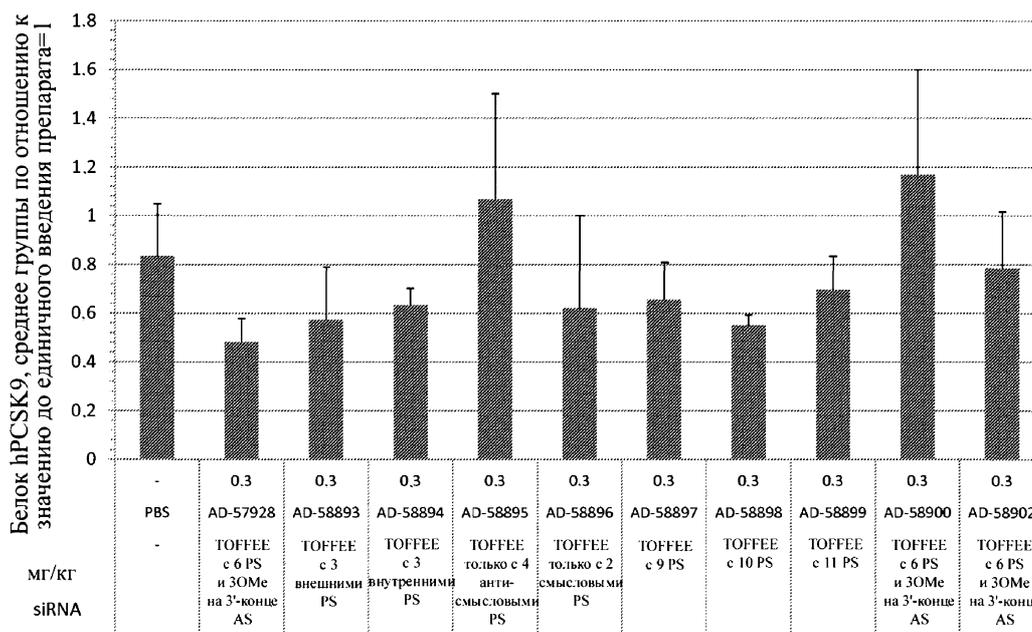
Фиг. 6



Фиг. 7

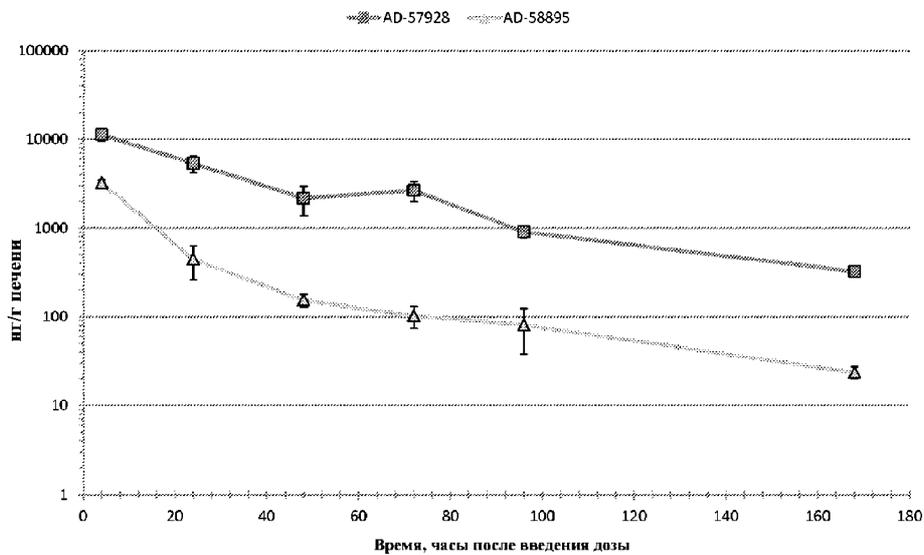


Фиг. 8

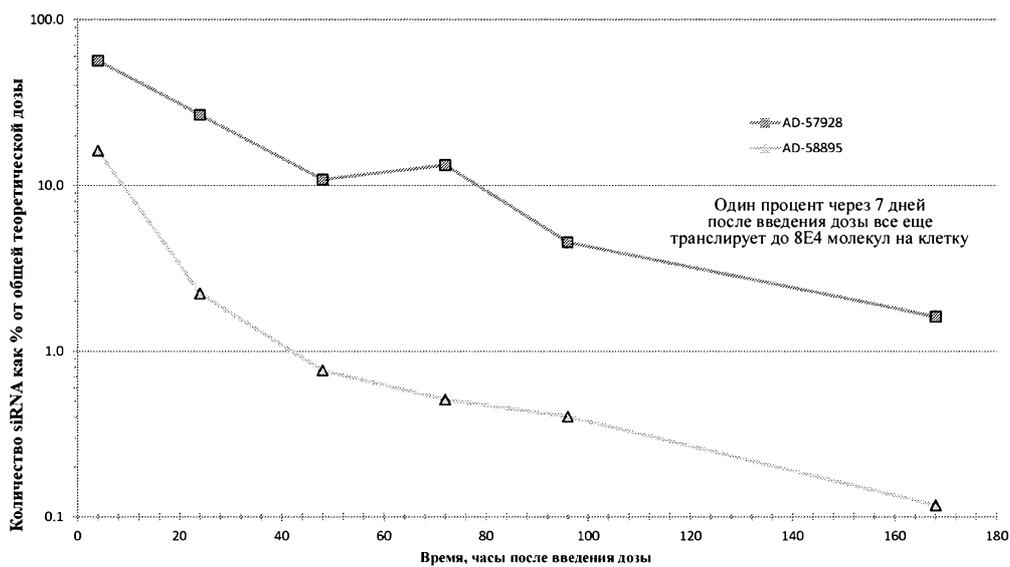


Фиг. 9

### Концентрация siRNA в печени (среднее группы)



Фиг. 10

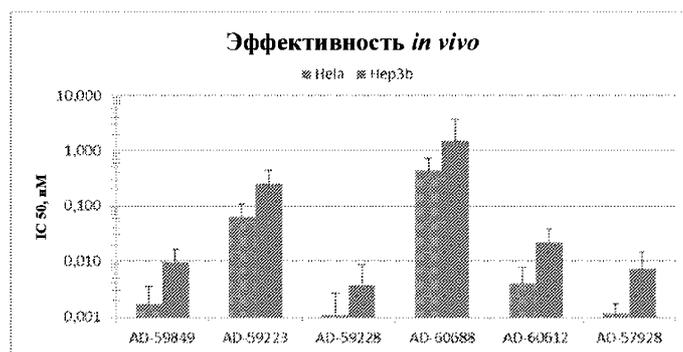


Фиг. 11

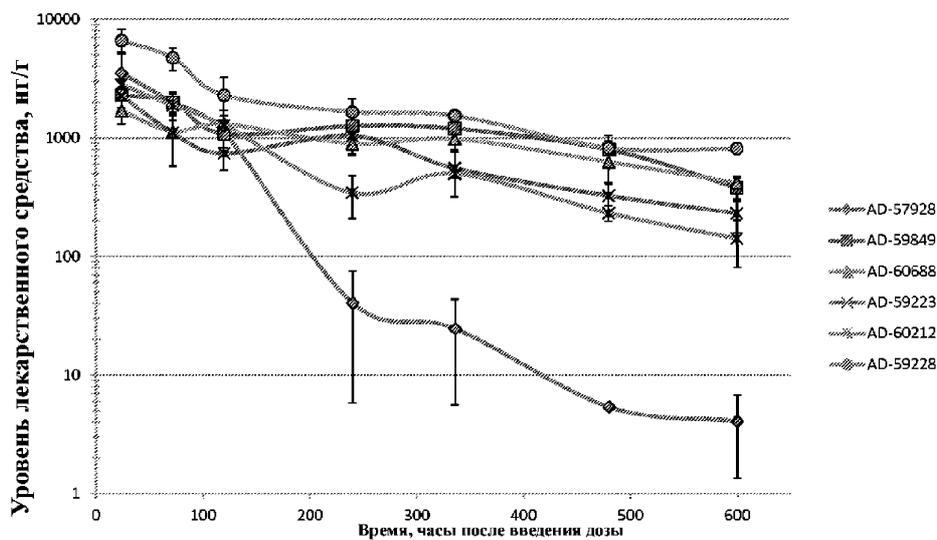
A.

Дуплекс	ID смысловой	Смысловая	ID AC	Антисмысловая
AD-57928 (исходная)	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-117429	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59849	A-121244	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgcuuuuguL96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-60688	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-59223	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	A-120190	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-60212	A-122088	csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96	A-120190	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-59228	A-120197	CfsusAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfL96	A-120202	asCfsaAfaAfsGcfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa

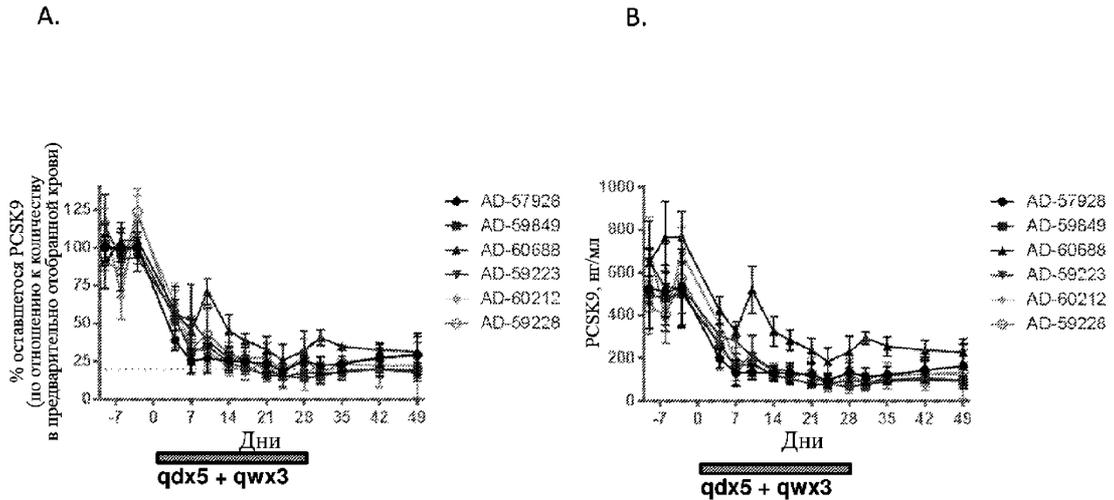
B.



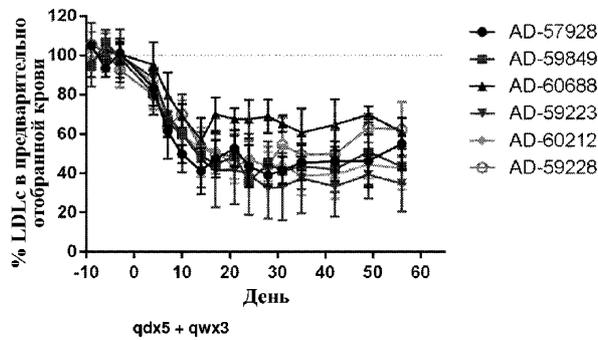
Фиг. 12



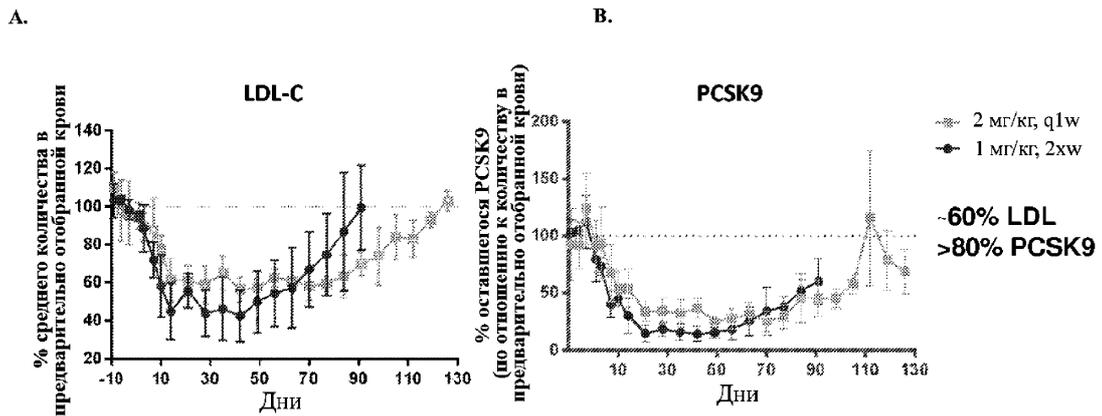
Фиг. 13



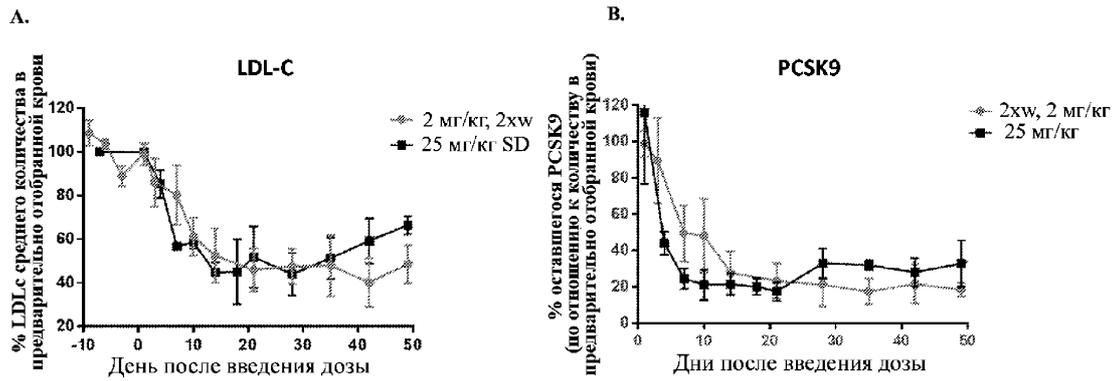
Фиг. 14



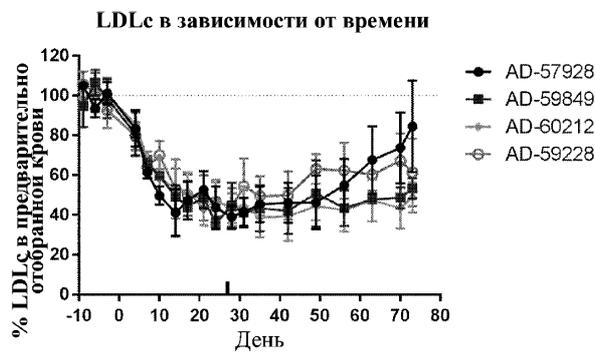
Фиг. 15



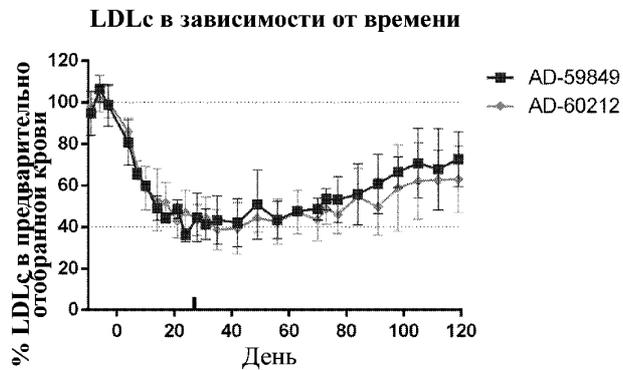
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

