



УКРАЇНА

(19) UA (11) 92465 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61K 48/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ТЕРАПЕВТИЧНІ ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРІВ RTP801

1

(21) a200701610
(22) 16.08.2005
(24) 10.11.2010
(86) PCT/US2005/029236, 16.08.2005
(31) 04019405.2
(32) 16.08.2004
(33) EP
(31) 60/601,983
(32) 17.08.2004
(33) US
(31) 60/604,668
(32) 25.08.2004
(33) US
(31) 60/609,786
(32) 14.09.2004
(33) US
(31) 60/638,659
(32) 22.12.2004
(33) US
(31) 60/664,236
(32) 22.03.2005
(33) US
(31) 60/688,943
(32) 08.06.2005
(33) US
(46) 10.11.2010, Бюл.№ 21, 2010 р.
(72) ФЕЙНШТЕЙН ЄЛЕНА, ІЛ, ГІЗЕ КЛАУС, ДЕ,
КАУФМАНН ЙОРГ, DE
(73) КВАРК ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ ІНК., US, САЙ-
ЛЕНС ТЕРАПЬЮТИКС АГ., DE
(56) US 6,740,738 B2 25.05.2004
WO 2004/035615 A2 29.04.2004
WO 2004/015107 A2 19.02.2004
(57) 1. Сполука дволанцюгової siРНК, яка має
структуру:
5' (N)_x - Z 3' (антисмисловий ланцюг),
3' Z' - (N')_y 5' (сисловий ланцюг),
де кожний N і N' означає рибонуклеотид, який мо-
же бути модифікованим або немодифікованим у
цукровому залишку і кожний Z (N)_x і (N')_y означає
олігомер, в якому кожний послідовний N або N'
з'єднаний з наступним N або N' ковалентним зв'яз-
ком;
в якому щонайменше 19 рибонуклеотидів (N)_x
комплементарні рибонуклеотидам (N')_y;
де кожний Z і Z' означає ціле число від 19 до 40;
де кожний Z і Z' може бути присутнім або відсут-
нім, але, якщо є присутнім, то означає динуклео-

2

тид dTdT і є ковалентно приєднаним на 3'-кінці
ланцюга, в якому він присутній;
і де послідовність (N)_x містить будь-яку послідов-
ність SEQ ID NO: 66, 74, 75, 77, 79 і 91.

2. Сполука за п. 1, в якій цукровий залишок у що-
найменше одному рибонуклеотиді є модифікова-
ним.

3. Сполука за п. 2, в якій цукровий залишок є мо-
дифікованим шляхом заміни -ОН-групи в 2' поло-
женні на -H, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂
або -F.

4. Сполука за п. 3, в якій -ОН заміщений на -OCH₃.

5. Сполука за будь-яким з пп. 1-4, в якій x=y=19.

6. Сполука за будь-яким з пп. 1-5, яка є фосфори-
лованою або нефосфорилованою.

7. Сполука за будь-яким з пп. 1-6, в якій послідов-
ність (N)_x містить послідовність SEQ ID NO:66.

8. Сполука за будь-яким з пп. 1-7, яка має структу-
ру:

5' AGCUGCAUCAGGUUGGCAC 3'

|||||||

3' UCGACGUAGUCCAACCGUG 5'

антисмисловий ланцюг (SEQ ID NO:66)

сисловий ланцюг (SEQ ID NO:16),

де рибонуклеотиди, що чергуються, в антисмисло-
вому і сисловому ланцюгах містять 2'-OCH₃-
модифікацію в цукровому залишку рибонуклеоти-
дів; де рибонуклеотиди на 5'- і 3'-кінцях антисмис-
лового ланцюга містять 2'-OCH₃-модифікацію; де
рибонуклеотиди на 5'- і 3'-кінцях сислового лан-
цюга є немодифікованими; і де кожний рибонукле-
отид на 5'- і 3'-кінцях кожного антисмислового і
сислового ланцюга є незалежно фосфорилова-
ним або нефосфорилованим; і кожна вертикальна
лінія означає спарювання основ.

9. Сполука за п. 8, в якій обидва антисмисловий і
сисловий ланцюги є нефосфорилованими на 3'-
кінці.

10. Сполука за п. 8, в якій обидва антисмисловий і
сисловий ланцюги є нефосфорилованими на 3'- і
5'-кінцях.

11. Сполука за п. 8, в якій обидва антисмисловий і
сисловий ланцюги є фосфорилованими на 3'- і 5'-
кінцях.

12. Сполука за будь-яким з пп. 1-11, в якій ковале-
нтний зв'язок є фосфодієфірним зв'язком; x=y,

(13) C2

(11) 92465

(19) UA

переважно, $x=y=19$; обидва Z і Z' відсутні, рибонуклеотиди, що чергуються, в кожному антисмислово-му і смислово-му ланцюгах містять 2'-ОСН₃ модифікацію в цукрових залишках; і рибонуклеотиди на 5'- і 3'-кінцях антисмислового ланцюга модифіковані таким же чином, а рибонуклеотиди на 5'- і 3'-кінцях смислового ланцюга не модифіковані.

13. Сполука за будь-яким з пп. 1-7 і 9-11, в якій динуклеотид dTdT ковалентно приєднаний до 3'-кінця антисмислового ланцюга або смислового ланцюга.

14. Фармацевтична композиція, яка містить сполуку за будь-яким з пп. 1-13 і фармацевтично прийнятний ексципієнт.

15. Сполука за будь-яким з пп. 1-13, що використовується для лікування пацієнта, що страждає респіраторним захворюванням, очною хворобою або мікросудинним порушенням.

16. Сполука за п. 15, де пацієнт страждає очною хворобою.

17. Сполука за п. 16, де очною хворобою є глаукома.

18. Сполука за п. 16, де очною хворобою є дегенерація жовтої плями.

19. Сполука за п. 16, де очною хворобою є вікова дегенерація жовтої плями (AMD).

20. Сполука за п. 16, де очна хвороба є обумовленою діабетом.

21. Сполука за п. 16 або 20, в якій очною хворобою є діабетична ретинопатія.

22. Сполука за п. 16 або 20, де очною хворобою є діабетичний набряк жовтої плями (DME).

23. Сполука за п. 15, де пацієнт страждає мікросудинним порушенням.

24. Сполука за п. 23, де мікросудинним захворюванням є гостра ниркова недостатність (ARF).

25. Сполука за п. 15, де пацієнт страждає респіраторним захворюванням.

26. Сполука за п. 25, де респіраторним захворюванням є хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ) або емфізема.

27. Сполука з п. 19, де AMD є вологою AMD.

По даній заявці заявляється пріоритет ЕР заявки на патент 04019405.2, поданої 16 серпня 2004 року; Попередніх заявок США з номерами 60/601983, поданої 17 серпня 2004 року; 60/604668, поданої 25 серпня 2004 року; 60/609786, поданої 14 вересня 2004 року; 60/638659, поданої 22 грудня 2004 року; 60/664236, поданої 22 березня 2005 року і 60/688943, поданої 8 червня 2005 року, всі з яких включені як посилання в їх повному обсязі.

Галузь винаходу

Даний винахід стосується нових молекул siRNA, які інгібують ген RTP801, і застосування таких молекул для лікування респіраторних порушень всіх типів (в тому числі легеневих порушень), очних хвороб і станів, мікросудинних порушень, станів, пов'язаних з ангиогенезом і апоптозом.

Рівень техніки

Хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ)

Хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ) вражає більше ніж 16 мільйонів американців, і є четвертою найбільш поширеною причиною смерті у Сполучених Штатах. Більшість випадків цього виснажуючого захворювання спричиняє куріння сигарет, але й інші фактори навколишнього середовища не можуть бути виключені (Petty TL. 2003. Definition, epidemiology, course, and prognosis of COPD. Clin. Cornerstone, 5-10).

Емфізема легень є основним проявом ХОХЛ. Перманентна деструкція периферичних повітряних просторів, дистальних відносно термінальних бронхіол, є відмітною ознакою ХОХЛ (Tuder RM. et al., Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. Am J Respir Cell Mol Biol, 29:88-97; 2003). Емфізема характеризується також накопиченням запальних клітин, таких як макрофаги і нейтрофіли, в бронхіолах і альвеолярних структурах (Petty, 2003).

Патогенез емфіземи є складним і багатофакторним. Було показано, що у людей недостатність інгібіторів протеаз, які продукуються запальними клітинами, таких як альфа1-антитрипсин, сприяє порушенню балансу протеаз/антипротеаз, сприяючи тим самим деструкції альвеолярного позаклітинного матриксу в емфіземі, що індукується сигаретним димом (CS) (Eriksson. S. 1964. Pulmonary Emphisea and Alpha1-Antitrypsin Deficiency. Acta Med Scand 175: 197-205. Joss, L., Pare, P.D., and Sandford, A.J. 2002. Genetic risk factors of chronic obstructive pulmonary disease. Swiss Med Wkly 132; 27-37). Металопротеїнази матриксу (MMP) грають центральну роль в експериментальній емфіземі, як документовано резистентністю мишей з нокаутом металоеластази макрофагів проти емфіземи, що викликається хронічною інгаляцією CS (Hautamaki, et al., Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science 277:2002-2004). Крім того, легенева понадекспресія інтерлейкіну-13 у трансгенних мишах приводить до MMP- і катепсин-залежної емфіземи (Zheng, T., et al., 2000. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. J Clin Invest 106:1081-1093). Нещодавні дослідження описують участь апоптозу септальних клітин в деструкції легеневої тканини, що приводить до емфіземи (Rangasami T, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Submitted to Journal of Clinical Investigation; Tuder RM et al. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. Am J Respir cell Mol Biol, 29:88-97; 2003; Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A, Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. Chest. 2004 Feb;125(2):626-32; Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A., Alveolar wall apoptosis causes lung

destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003 May; 28(5):555-62.

Серед механізмів, які лежать в основі обох шляхів деструкції легень при емфіземі, передусім повинно бути згадане надмірне утворення молекулярних частинок активного (реакційноздатного) кисню (ROS). Добре встановлено, що в крові і тканині легень курців існує баланс прооксиданту/антиоксиданту (Hulea SA, et al., *Cigarette Smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stress: a case-control study.* *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1995; 14(3-4): 173-80; Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol.* 1999 Dec; 277(6 Pt 1):L1067-88; MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest.* 2000 May; 117(5 Suppl 1):303S-17S; Marwick JA, Kirkham P, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W, Rahman I. Cigarette smoke-induced oxidative stress and TGF-beta increase p21waf1/cip1 expression in alveolar epithelial cells. *Ann NY Acad Sci.* 2002 Nov; 973:278-83; Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. *Inhal Toxicol.* 2003 Sep; 15(10): 1029-38; Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2004 Apr; 23(4):629-36; Tudor RM, Zhen L, Cho CY, Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Salvemini D, Voelkel NF, and Flores SC. Oxidative stress and apoptosis interact and cause emphysema due to vascular endothelial growth factor blockade. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 29:88-97; 2003). Після однієї години піддавання мишей дії CS спостерігається значне збільшення 8-гідрокси-2'-дезоксигуанозину (8-OHdG) в альвеолярних епітеліальних клітинах, зокрема, типу II (див. *Inhal Toxicol.* 2003 Sep; 15(10):1029-38, вище).

Понадпродуковані молекулярні частинки активного (реакційноздатного) кисню відомі внаслідок їх цитотоксичної активності, яка відбувається з прямої руйнуючої дії на ДНК і з активації шляхів трансдукції апоптотичного сигналу (Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull.* 2004 Feb 15;62(6):497-504; Taniyama Y, Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003 Dec;42(6): 1075-81. Epub 2003 Oct 27; Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 2003 Oct 15;66(8): 1527-35; Punj V, Chakrabarty AM. Redox proteins in mammalian cell death: an evolutionary conserved function in mitochondria and prokaryotes. *Cell Microbiol.* 2003 Apr;5(4):225-31; Ueda S, Masutani II, Nakamura H, Tanaka T, Ueno M, Yodoi J. Redox control of cell death. *Antioxid Redox Signal.* 2002 Jun;4(3):405-14).

Молекулярні частинки активного (реакційноздатного) кисню (ROS) не тільки є цитотоксичними per se, але також є прозапальними стимулами, будучи сильними активаторами редокс-чутливих

факторів транскрипції NFκB і AP-1 (що обговорюються в Rahman I. Oxidative stress and gene transcription in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: antioxidant therapeutic targets. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002 Sep;1(3):291-315). В свою чергу, обидва фактори транскрипції, як передбачається, беруть участь у стимуляції транскрипції прозапальних цитокінів (що обговорюються в Renard P, Raes M. The proinflammatory transcription factor NFκB: a potential target for novel therapeutic strategies. *Cell Biol Toxicol.* 1999;15(6):341-4; Lentsch AB, Ward PA. The NFκB/IκB system in acute inflammation. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2000;48(2):59-63) і деградує матрикс протеїназ (Andela VB, Gordon AH, Zotalis G, Rosier RN, Goater JJ, Lewis GD, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ. NFκB: a pivotal transcription factor in prostate cancer metastasis to bone. *Clin Orthop.* 2003 Oct;415 Suppl):S75-85.; Fleenor DL, Pang IH, Clark AF. Involvement of AP-1 in interleukin-1α-stimulated MMP-3 expression in human trabecular meshwork 5 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Aug;44(8):3494-501.; Ruhul Amin AR, Senga T, Oo ML, Thant A A, Hamaguchi M. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1β: a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk. *Genes Cells.* 2003 Jun;8(6):515-23). Прозапальні цитокіни, в свою чергу, служать атрактантами запальних клітин, які також секретують деградує матрикс ферменти, цитокіни і молекулярні частинки активного кисню. Таким чином, мабуть, патогенний фактор, такий як, наприклад, CS, запускає патологічну сітку, в якій молекулярні частинки активного кисню діють як головні медіатори деструкції легень.

Молекулярні частинки активного кисню (ROS) як з вдихуваного сигаретного диму, так і що утворюються ендогенно запальними клітинами, сприяють збільшеному навантаженню внутрішньолегового оксиданту.

Одним додатковим патогенним фактором, що стосується патогенезу ХОХЛ, є зменшена експресія VEGF і VEGFR2, що спостерігається, в легенях пацієнтів з емфіземою (Yasunori Kasahara, Rubin M, Tudor, Carlyne D, Cool, David A, Lynch, Sonia C, Flores, and Norbert F. Voelkel. Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 163. pp 737-744. 2001). Крім того, інгібування передачі сигналу VEGF з використанням хімічного інгібітору VEGFR приводить до апоптозу альвеолярних септальних ендотеліальних і потім епітеліальних клітин, можливо, внаслідок руйнування тісного структурного/функціонального зв'язку обох типів клітин в альвеолах (Yasunori Kasahara, Rubin M, Tudor, Laimute Taraseviciene-Stewart, Timothy D. Le Cras, Steven Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger, and Norbert F. Voelkel. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. *J. Clin. Invest.* 106:1311-1319 (2000).; Voelkel NF, Cool CD. Pulmonary vascular involvement in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl.* 2003 Nov;46:28s-32s).

Дегенерація жовтої плями сітківки

Найбільш звичайною причиною зниженого бачення, яке краще за все коригується, у індивідуумів старше 65 років у Сполучених Штатах є порушення сітківки, відоме як пов'язана зі старінням дегенерація жовтої плями (сітківки) (AMD). По мірі прогресування AMD це захворювання характеризується втратою гострого, центрального зору. Зонаю ока, що вражається AMD, є жовта пляма - невелика зона в центрі сітківки, що складається в основному з фоторецепторних клітин. Так звана «суха» AMD, що спостерігається у приблизно 85-90% пацієнтів з AMD, включає зміни в розподілі пігменту ока, втрату фоторецепторів і знижену ретинальну функцію внаслідок загальної атрофії клітин. Так звана «волога» AMD включає проліферацію аномальних хороїдальних судин, що приводить до згустків крові або рубців в субретинальному просторі. Таким чином, виникнення вологої AMD відбувається внаслідок утворення аномальної хороїдальної неоваскулярної сітки (хороїдальної неоваскуляризації, CNV) під нейроретиною. Заново утворені судини є надмірно негерметичними. Це приводить до накопичення субретинальної рідини і крові, що приводить до втрати гостроти зору. Згодом відбувається повна втрата функціональної сітківки в залучений в дегенерацію ділянці, оскільки утворюється великий дископодібний рубець, що охоплює судинну оболонку ока і сітківку. У той час як пацієнти з сухою AMD можуть зберігати зір зниженої якості, волога AMD часто веде до сліпоти (Hamdi & Kenney, Age-related Macular degeneration a new viewpoint, *Frontiers in Bioscience*, e305-314. May 2003). CNV має місце не тільки у вологої AMD, але також в інших очних патологіях, таких як синдром очного гістоплазмозу, ангіодні смуги сітківки, розриви в базальній пластинці (оболонці Бруха), міопічна дегенерація, очні пухлини і деякі дегенеративні захворювання сітківки.

Різні проведені дослідження визначили декілька факторів ризику для AMD, таких як куріння, старіння, сімейний анамнез (Milton. *Am J Ophthalmol* 88. 269 (1979); Mitchell et al., *Ophthalmology* 102. 1450-1460 (1995); Smith et al., *Ophthalmology* 108. 697-704 (2001)), стать (в 7 разів більш високий ризик у жінок: Klein et al., *Ophthalmology* 99. 933-943 (1992)) і раса (представники білої раси є найбільш сприйнятливими). Додаткові фактори ризику можуть включати характеристики очей, такі як далекозорість (гіперметропія) і світлі очі, також як серцево-судинне захворювання і гіпертензія. Був також задокументований доказ генетичної участі у виникненні прогресування захворювання (див. Hamdi & Kenney вище).

Дві компанії, Acuity Pharmaceutical і Sirna Therapeutics нещодавно зареєстрували IND (Industrial Property) відносно молекул siRNA, які інгібують VEGF і VEGF-R1 (Flt-1), відповідно, для лікування AMD. Ці молекули позначені Cand5-інгібітором і 027-інгібітором, відповідно.

Мікросудинні порушення

Мікросудинні порушення складаються з широкої групи станів, які передусім вражають мікроскопічні капіляри і лімфатичні судини і, отже, знаходяться поза сферою прямого хірургічного втручання.

Мікросудинне захворювання може бути в широкому значенні поділено на вазоспастичне, васкулітне і лімфатичне оклюзивне захворювання. Крім того, багато які з відомих судинних станів мають мікросудинний елемент.

- Вазоспастичне захворювання - Вазоспастичні захворювання є групою звичайних станів, в яких, з невідомих причин, периферичні вазоконстрикторні рефлексії є гіперчутливими. Це приводить до недоречної вазоконстрикції та ішемії тканин, аж до втрати тканини. Вазоспастичні симптоми звичайно пов'язані з температурою або з використанням віброуючих апаратів, але можуть бути вторинними відносно інших станів.

- Васкулітне захворювання - Васкулітні захворювання є захворюваннями, які беруть участь у первинному запальному процесі в мікроциркуляції. Васкуліт є звичайно компонентом аутоімунного або пов'язаного зі з'єднувальною тканиною порушення і звичайно не піддається хірургічному лікуванню, а вимагає імуносупресивного лікування у випадку наявності важких симптомів.

- Лімфатичне оклюзивне захворювання - Хронічне опухання нижньої або верхньої кінцівки (лімфатичний набряк) є результатом периферичної лімфатичної оклюзії. Це відносно рідкий стан, який має велику кількість причин, деякі з них є спадковими, деякі є набутими. Основними способами лікування є правильно підібрані стискаючі предмети одягу і застосування пристроїв з переривчастим стискуванням.

Мікросудинні патології, пов'язані з діабетом

Діабет є основною причиною сліпоты, причиною номер один ампутацій та імпотенції і одним з хронічних дитячих захворювань, що найчастіше зустрічаються. Діабет є також основною причиною ниркового захворювання термінальної стадії у Сполучених Штатах з частотою поширеності 31% у порівнянні з іншими нирковими захворюваннями. Діабет є також найбільш частим показанням для трансплантації нирки, що складає 22% всіх операцій з трансплантації.

Звичайно, діабетичні ускладнення можуть в широкому значенні класифікуватись як мікросудинні або макросудинні захворювання. Мікросудинні ускладнення включають невропатію (пошкодження нервів), нефропатію (захворювання нирок) і порушення зору (наприклад, ретинопатію, глаукому, катаракту і корнеальне захворювання (захворювання рогівки)). В сітківці, нирковому клубочку і vasa nervorum подібні патофізіологічні ознаки характеризують діабет-специфічне мікросудинне захворювання.

Мікросудинні патології, асоційовані з діабетом, визначають як захворювання найменших кровоносних судин (капілярів), яке може мати місце, наприклад, у людей, які мали діабет протягом тривалого часу. Стінки цих судин стають ненормально товстими, але слабкими. Таким чином, вони кровоточать, втрачають білок і уповільнюють кровотік по тілу.

Клінічні дані і дані на моделях тварин показують, що хронічна гіперглікемія є центральним ініціюючим фактором для всіх типів діабетичного мікросудинного захворювання. Тривалість і величина гіперглікемії значною мірою корелюють з мі-

рою і швидко прогресування діабетичного мікросудинного захворювання. Хоча всі діабетичні клітини зазнають дії підвищених рівнів глюкози в плазмі, гіперглікемічне пошкодження обмежується тільки тими типами клітин (наприклад, ендотеліальними клітинами), які розвивають внутрішньоклітинну гіперлікемію. Ендотеліальні клітини розвивають внутрішньоклітинну гіперглікемію, оскільки, на відміну від багатьох інших клітин, вони не можуть придушувати транспорт глюкози при піддаванні дії позаклітинної гіперглікемії. Те, що внутрішньоклітинна гіперглікемія є необхідною і достатньою для розвитку діабетичної патології, додатково демонструється фактом, що понадекспресія транспортера глюкози GLUT1 в мезангіальних клітинах, що культивуються в середовищі з нормальною глюкозою, імітує діабетичний фенотип, індукуючи такі ж збільшення в експресії генів колагену типу IV, колагену типу I і фібронектину, що і діабетична гіперглікемія.

Атипична функція ендотеліальних клітин

На ранніх стадіях цукрового діабету, до того як стають очевидними структурні зміни, гіперглікемія викликає аномалії в кровообігу і судинній проникності в сітківці, ниркових клубочках і периферичному нерві *vasa nervorum*. Вважають, що збільшення тиску в кровотоці і внутрішньокapілярного тиску відображає індуковану гіперглікемією зменшене продукування оксиду азоту (NO) на ефіерентній стороні капілярного ложа і, можливо, збільшену чутливість до ангіотензину II. Як наслідок збільшеного внутрішньокapілярного тиску і дисфункції ендотеліальних клітин, капіляри сітківки проявляють збільшений витік флуоресцеїну, а гломерулярні капіляри мають підвищену швидкість екскреції альбуміну (AER). Порівнювані зміни мають місце в *vasa vasorum* периферичного нерва. На ранній стадії діабету збільшена проникність є оборотною: однак по мірі прогресування у часі вона стає безповоротною.

Збільшене накопичення білка в стінці судин

Загальною патофізіологічною ознакою діабетичного мікросудинного захворювання є прогресуючі звуження і поступова оклюзія просвітів судин, що приводить до неадекватної перфузії і функції уражених тканин. Рання індукована гіперглікемією мікросудинна гіпертензія і збільшена судинна проникність сприяють безповоротній оклюзії мікросудин за допомогою трьох процесів:

- Першим процесом є аномальний витік періодна кислота-Шифф (PAS)-позитивних, вуглеводмісних білків плазми, які депонуються в стінці капілярів і які можуть стимулювати періваскулярні клітини, такі як періцити і мезангіальні клітини, для вивільнення факторів росту і позаклітинного матриксу.

- Другим процесом є екстравазація факторів росту, таких як трансформуючий фактор росту $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), який безпосередньо стимулює надпродукцію компонентів позаклітинного матриксу і може індукувати апоптоз у деяких пов'язаних з ускладненням типах клітин.

- Третім процесом є індукована гіпертензією стимуляція експресії патологічного гена ендотеліальними клітинами і підтримуючими клітинами, які кодують транспортери глюкози *glut-1*, фактори

росту, рецептори факторів росту, компоненти позаклітинного матриксу і молекули адгезії, які активують циркулюючі лейкоцити. З цієї концепцією узгоджується спостереження, що одностороннє зменшення тяжкості діабетичного мікросудинного захворювання має місце на стороні зі стенозом очної або ниркової артерії.

Втрата мікросудинних клітин і оклюзія судин

Прогресуючі звуження і оклюзія просвітів діабетичних мікросудин супроводжуються також втратою мікросудинних клітин. У сітківці, цукровий діабет індукує запрограмовану загибель клітин Мюллера і клітин гангліїв, періцитів та ендотеліальних клітин. У нирковому клубочку зниження функції нирок асоціюється з оклюзією капілярів, що широко розповсюдилась, і втратою подоцитів, але механізми, які лежать в основі втрати гломерулярних клітин ще не відомі. У *vasa nervorum* має місце дегенерація ендотеліальних клітин і періцитів, і ці мікросудинні зміни, мабуть, передують розвитку діабетичної периферичної невропатії. Багатоосередковий розподіл дегенерації аксонів при діабеті підтверджує причинну роль мікросудинної оклюзії, але індуковані гіперглікемією зменшення нейротрофінів можуть сприяти запобіганню нормальної репарації і регенерації аксонів.

Інша звичайна ознака діабетичного мікросудинного захворювання була названа гіперглікемічною пам'яттю або персистенцією або прогресуванням індукованих гіперглікемією мікросудинних змін під час подальших періодів нормального гомеостазу глюкози. Найбільш яскравим прикладом цього феномену є розвиток важкої ретинопатії в гістологічно нормальних очах діабетичних собак, який зустрічається повністю під час періоду 2,5 років нормалізованої глюкози крові, за яким слідує період 2,5 років гіперглікемії. Індуковані гіперглікемією збільшення транскрипції вибраних генів матриксу також зберігається протягом тижнів після відновлення нормоглікемії *in vivo*, і менш виражене, але кількісно схоже, пролонгування індукованого гіперглікемією збільшення транскрипції вибраних генів матриксу відбувається в ендотеліальних клітинах, що культивуються.

Відносно додаткової інформації див. "Shared pathophysiologic features of microvascular complications of diabetes" (Larsen: Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed., Copyright © 2003 Elsevier).

Мікросудинні ускладнення зустрічаються не тільки в явному діабеті, але також внаслідок порушеної толерантності до глюкози (IGT). Мікросудинні ускладнення IGT: невропатія, ретинопатія і ниркова мікропротеїнурія.

Діабетична невропатія

Діабетичні невропатії є невропатичними порушеннями (пошкодженням периферичних нервів), які асоційовані з цукровим діабетом. Ці стани звичайно відбуваються з діабетичного мікросудинного пошкодження, що включає малі кровоносні судини, які забезпечують кровопостачання нервів (*vasa nervorum*). Відносно звичайні стани, які можуть бути асоційовані з діабетичною невропатією, включають параліч третього нерва: мононевропатію; множинну мононевропатію: діабетичну аміотрофію; хворобливу поліневропатію; автономну нев-

ропатію і торако-абдомінальну невропатію і найбільш звичайну форму, периферичну невропатію, яка вражає в основному стопи і ноги. У розвитку діабетичної невропатії беруть участь чотири фактори: мікросудинне захворювання, просунуті глікозильовані кінцеві продукти, протеїнказа С і шлях поліолів.

Мікросудинне захворювання в діабетичній невропатії

Судинні і невральні захворювання є тісно пов'язаними і переплетеними одне з одним. Кровоносні судини залежать від нормальної функції нервів, а нерви залежать від достатнього кровопостачання. Першою патологічною зміною в мікросудинній сітці є вазоконстрикція (звуження кровоносних судин). По мірі прогресування захворювання дисфункція нервових клітин тісно корелює з розвитком судинних патологій, таких як потовщення базальної мембрани капілярів і гіперплазія ендотелію, які сприяють зменшенню кисневого потенціалу і гіпоксії. Нейронна ішемія є добре встановленою характеристикою діабетичної невропатії. Судинорозширювальні агенти (вазодилататори) (наприклад, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту, альфа1-антагоністи) можуть приводити до суттєвих поліпшень в кровопостачанні нервових клітин, з відповідними поліпшеннями швидкості провідності нервів. Таким чином, мікросудинна дисфункція відбувається в ранній стадії діабету, слідує паралельно з прогресуванням нейронної дисфункції і може бути достатньою для підтримання тяжкості структурних, функціональних і клінічних змін, що спостерігаються в діабетичній невропатії. Периферична невропатія (ноги), сенсорно-рухова невропатія є істотним компонентом в патогенезі виразок ніг в діабеті.

Невропатія є звичайним ускладненням діабету, що зустрічається згодом у більше половини пацієнтів з діабетом типу 2. Дослідження провідності нервів демонструють, що невропатія вже присутня у 10-18% пацієнтів на момент діагностики діабету, що передбачає, що пошкодження периферичного нерва відбувається на ранніх стадіях захворювання і з більш слабким порушенням глікемічної регуляції. Концепція, що невропатія є ранньою клінічною ознакою діабету, була запропонована >40 років тому, і більшість досліджень повідомляють зв'язок між IGT і невропатією. Більшість пацієнтів з IGT і асоційованою невропатією мають симетричну дистальну сенсорну поліневропатію з сильно вираженим невропатичним болем. IGT-невропатія (Microvascular complications of impaired glucose tolerance Perspectives in Diabetes. J. Robinson Singleton, in Diabetes December 1, 2003) є фенотипічно схожою з ранньою діабетичною невропатією, яка також викликає сенсорні симптоми, в тому числі біль, і автономну дисфункцію. У дослідженні 669 пацієнтів з ранньою діабетичною невропатією сенсорні симптоми були присутніми у >60%, імпотенція майже у 40% та інша автономна участь у 33%, але доказ рухової участі спостерігали тільки у 12%. Ці клінічні результати передбачають ранню участь малих немієлінованих нервових волокон, які приносять біль, температуру і автономні сигнали. Пряме кількісне визначення

немієлінованих інтраепідермальних нервових волокон з шкірних біопсій показує схожу втрату волокон і змінену морфологію у пацієнтів з невропатією, асоційованою з IGT і раннім діабетом.

Автономна дисфункція, зокрема, еректильна дисфункція, і змінена серцева вагусна реакція є ранніми ознаками невропатичного пошкодження при діабеті. Дослідження з пацієнтами з IGT також передбачає переважаючу вагусну вегетативну дистонію: окремі дослідження виявили відновлення атопічної частоти серцевих скорочень після фізичного навантаження, варіабельність відношення затупленого R-R інтервалу до глибокого дихання і зменшене відношення видиху до вдиху (всі критерії вагусної вегетативної дистонії) в більшій частині пацієнтів з IGT, ніж в нормоглікемічних контрольних суб'єктах того ж самого віку.

Пошкодження нервів при діабеті вражає рухові, сенсорні і автономні волокна. Рухова невропатія викликає м'язову слабкість, атрофію і парез. Сенсорна невропатія приводить до втрати захисних відчуттів болю, тиску і нагрівання. Відсутність болю приводить до багатьох проблем в нечутливості стоп, в тому числі утворення виразок, невідчутної травми і нейрогенної артропатії (суглоба Шарко). Пацієнт може не прагнути до лікування доти, доки рана не стане запущеною. Комбінація сенсорної і рухової дисфункції може примусити пацієнта піддавати стопу атипічному стресу, що приводить до травми, яка може приводити до інфекції. Автономна симпатична невропатія викликає вазодилатацію і зменшене потовиділення, яке приводить до теплих, понадміру сухих стоп, які особливо схильні до шкірних розривів, а також функціональних змін в мікросудинному кровопостачанні. Автономна дисфункція (і дегенерація шкірних структур) також приводить до втрати цілісності шкіри, яка забезпечує ідеальне місце для мікробної інвазії. Невропатична стопа не покривається виразками спонтанно; швидше вона є комбінацією деякої форми травми, що супроводжується невропатією.

Мікросудинна дисфункція зустрічається на ранній стадії діабету, слідує паралельно з прогресуванням нервової дисфункції і може бути достатньою для підтримання тяжкості структурних, функціональних і клінічних змін, що спостерігаються при діабетичній невропатії.

Просунуті глікозильовані кінцеві продукти - Підвищені внутрішньоклітинні рівні глюкози викликають неферментативне ковалентне зв'язування зв'язків з білками, яке змінює їх структуру і руйнує їх функцію. Передбачається, що деякі з цих глікозильованих білків беруть участь в патології діабетичної невропатії та інших довгострокових ускладненнях діабету.

Протеїнказа С (PKC) - PKC бере участь в патології діабетичної невропатії. Збільшені рівні глюкози спричиняють збільшення внутрішньоклітинного діацилгліцерину, який активує PKC. Інгібітори PKC в моделях тварин будуть збільшувати швидкість провідності нервів збільшенням нейтронного кровопостачання.

Сенсорно-рухова поліневропатія

Більш довгі нервові волокна вражаються в більшій мірі, ніж більш короткі, оскільки швидкість

провідності нервів уповільнюється пропорціонально довжині нерва. У цьому синдромі, знижене відчуття і втрата рефлексів відбувається спочатку в кінчиках пальців білатерально, потім тягнеться вгору. Це звичайно описується як рукавично-панчішний розподіл оніміння, втрати чутливості, дизестезії і нічного болю. Цей біль може відчуватись як печіння, почуття поколювання, тупий біль або ниючий біль. Почуття поколювання і голок є звичайним. Втрата пропріоцепції, тобто відчуття, де знаходиться в просторі кінцівка, вражається на ранній стадії. Ці пацієнти не можуть відчувати, коли вони наступають на чужорідне тіло, наприклад, на тріску, або коли виникають мозоль від погано придатних туфель. Внаслідок цього вони знаходяться при ризику розвитку виразок та інфекцій на стопах і ногах, які можуть приводити до ампутації. Подібним чином, ці пацієнти можуть отримати численні переломи коліна, кісточки або стоп і розвинуті суглоб Шарко. Втрата рухової функції приводить до зігненої назад контрактури пальців стопи, так званих молоткоподібних пальців стопи. Ці контрактури зустрічаються не тільки в стопі, але також і в кисті руки.

Автономна невропатія

Автономна нервова система складається з нервів, обслуговуючих серце, шлунково-кишковий тракт (GI) і сечову систему. Автономна невропатія може вражати будь-яку з цих систем органів. Найчастіше діагностованою автономною дисфункцією при діабеті є ортостатична гіпотензія або неприємне відчуття запаморочення при вставанні у пацієнта. У випадку діабетичної автономної невропатії це є наслідком нездатності серця і артерій належно коректувати частоту серцевих скорочень і судинний тонус для збереження безперервного і повного протікання крові до головного мозку. Цей симптом звичайно супроводжується втратою синусної респіраторної зміни, тобто звичайної зміни частоти серцевих скорочень, що спостерігається при нормальному диханні. Коли присутні ці два явища, присутня серцева автономна невропатія.

Прояви шлунково-кишкового тракту включають затримане випорожнення шлунка, гастро парез, нудоту, метеоризм і діарею. Оскільки багато які діабетики приймають пероральний лікарський засіб від діабету, на абсорбцію цих лікарських засобів в сильній мірі впливає випорожнення шлунка. Це може приводити до гіпоглікемії, коли пероральний діабетичний агент приймається перед їжею і не всмоктується до декількох годин або іноді декількох днів, коли вже є нормальний або низький цукор в крові. В'ялий рух тонкої кишки може викликати надмірне бактеріальне зростання, що погіршується присутністю гіперглікемії. Це приводить до метеоризму, газів і діареї.

Симптоми сечовипускання включають частоту сечовипускання, гострі позиви до сечовипускання, нетримання і затримку сечі. У цьому випадку також внаслідок затримки солодкої сечі частими є інфекції сечових шляхів. Затримка сечі може приводити до дивертикул сечового міхура, каменів, рефлюкс-нефропатії.

Краніальна невропатія

При ураженні краніальних (черепних) нервів найбільш частими є окорухові невропатії (3-ого

нерва). Окоруховий нерв контролює всі м'язи, які беруть участь в рухах ока, за винятком латерального прямого і верхнього косою м'язів. Він служить також для звуження зіниці і підняття верхнього віку. Виникнення діабетичного паралічу третього нерва є звичайно раптовим, що починається з лобового або розташованого навколо очної ямки болю з подальшою диплопією. Можуть бути уражені всі окорухові м'язи, які іннервуються третім нервом, за винятком тих, які контролюють розмір зіниці. Шостий нерв, відвідний нерв, який іннервує латеральний прямий м'яз ока (переміщує око латерально), також часто вражається, але участь четвертого нерва, блокового нерва, (який іннервує передній косий м'яз, який переміщує око вниз) є нечастою. Мононевропатії грудних або поперекових нервів можуть зустрічатись і приводити до хворобливих синдромів, які імітують інфаркт міокарда, холецистит або апендицит. Діабетики мають більш високу зустрічність тунельних невропатій, наприклад зап'ястного синдрому.

Діабетична ішемія кінцівок і діабетичні виразки стоп

Діабет і стискування можуть порушувати мікросудинну циркуляцію і приводити до змін в шкірі на нижніх кінцівках, які, в свою чергу, можуть приводити до утворення виразок і подальшої інфекції. Мікросудинні зміни приводять до мікроангіопатії м'язів кінцівок, а також до схильності до розвитку периферичної ішемії і зменшеної компенсаторної реакції ангіогенезу на ішемічні події. Мікросудинна патологія загострює захворювання периферичних судин (PVD) (або захворювання периферичних артерій (PAD) або артеріальне захворювання нижніх кінцівок (LEAD) - МАКРОсудинне ускладнення - звуження артерій в ногах внаслідок атеросклерозу. PVD зустрічається на більш ранній стадії діабету, є більш важким і широкорозповсюдженим і часто включає інтеркурентні мікроциркуляторні проблеми, що вражають ноги, очі і нирки.

Виразки і гангрена ніг є частими супутніми станами PAD. Одночасна периферична невропатія з порушеною чутливістю робить стопи сприйнятливими до травми, утворення виразок та інфекції. Прогресування PAD при діабеті змішується з таким супутнім патологічним процесом, як периферична невропатія і нечутливість стоп і нижніх кінцівок до болю і травми. З погіршеною циркуляцією і погіршеною чутливістю відбувається утворення виразок та інфекція. Прогресування до остеомієліту і гангрені може привести до необхідності ампутації.

Особи з діабетом мають в 25 разів більшу імовірність, ніж особи без діабету, бути підданими ампутації нижньої кінцівки, що посилює необхідність запобігання виразкам стоп і подальшій втраті кінцівок.

Діабетичні виразки стоп можуть зустрічатись не тільки разом з PAD, але можуть бути також пов'язані з невропатією, венозною недостатністю (варикозними венами), травмою та інфекцією. PAD сприяє цим іншим станам у продукуванні або прискоренні виразок стоп. Виразки стоп не обов'язково представляють прогресування PAD, оскільки вони можуть мати місце у присутності адекватної клінічної периферичної артеріальної перфузії. Дослі-

дження на пацієнтах показують збільшений ризик утворення виразок стоп у пацієнтів з діабетом, які мали периферичну невропатію і сильне стискування підошви стопи. Частота випадків виразок або уражень на стопі або кісточках дорівнювала 15% від всіх пацієнтів з діабетом в дослідженні на основі популяції в південному Вісконсині. Ця частота випадків була більш високою для індивідумів з діабетом, діагностованих у віці менше 30 років, була злегка більш високою у чоловіків (16%), ніж у жінок (13%), і була більш високою у пацієнтів з діабетом, що одержували інсулін (17%), ніж у пацієнтів, що не приймали інсулін (10%). Частота випадків збільшувалась з віком, особливо у пацієнтів з діабетом, діагностованих у віці менше 30 років. У дослідженнях пацієнтів з Європи частота випадків виразок стоп у пацієнтів з діабетом була 3% у віці пацієнтів <50 років, 7% у віці <60 років і 14% у віці >80 років. Частота випадків була більшою у чоловіків, ніж у жінок, у віці 70 років.

У пацієнтів з діабетом ішемія та інфекція стоп є більш серйозними і навіть загрозливими життю явищами: однак, для лікування найбільш важким станом є невропатія. Медична і хірургічна література, що стосується всіх аспектів клінічних і патологічних проявів діабетичної стопи, є в незчисленній кількості. Невропатія, ангіопатія, ретинопатія і нефропатія, окремо або в комбінації і в різних мірах тяжкості можуть впливати на лікування діабетичних стоп.

Кожний рік виконуються 82000 ампутацій кінцівок у пацієнтів з цукровим діабетом. Більшість цих ампутацій виконуються в популяції немолодих людей. Ампутації, що є наслідком діабету, можуть виникати з множинної етіології, що включає виразки стоп, ішемію, венозні виразки ніг (тобто виразки, вторинні відносно венозного рефлюксу) і виразки п'яток (тобто виразки, що відбуваються з невилікуваних пролежнів в п'ятці). Більшість цих ампутацій відбуваються з утворення виразок. Поширеність виразок стоп серед пацієнтів з діабетом становить 12%. Крім того, 20-річна кумулятивна поширеність виразок нижніх кінцівок у пацієнтів з діабетом типу 1 становить 9,9%. Індуковані діабетом ампутації кінцівок приводять до 5-літнього коефіцієнта смертності 39%-68% і пов'язані зі збільшеним ризиком додаткових ампутацій. Тривалість знаходження в лікарні є приблизно на 60% більш тривалою серед пацієнтів з діабетичними виразками стоп у порівнянні з пацієнтами без виразок.

Діабетична невропатія порушує рефлекс аксонів нейронів, який залежить від функції здорового ноцицептора (больового рецептора) С-волокон, і викликає локальну вазодилатацію у відповідь на больовий стимул. Цей стан додатково погіршує вазодилаторну реакцію, присутню в станах стресу, таких як пошкодження або запалення, в діабетичній невропатичній стопі. Це погіршення може частково пояснювати, чому деякі виразки в діабетичній невропатичній стопі або заживають повільно, або не заживають взагалі, незважаючи на успішну ревазуляризацию нижніх кінцівок.

Таким чином, найбільш звичайний причинний шлях для утворення діабетичних виразок стоп може бути ідентифікований як комбінація невропатії (втрати чутливості), деформації (наприклад,

сильно виступаючих метатарзальних (плюсневих) виступів) і травм (наприклад, через невідповідне взуття).

Більшість хірургів вважають за краще виконувати підколінне або тибіальне артеріальне шунтування внаслідок гірших коефіцієнтів виживаності і прохідності судин у порівнянні з більш проксимальними процедурами. Повідомлялось, що, якщо підколінне або тибіальне артеріальне шунтування нездатне відновити пальпований пульс стопи, ніжне (що стосується стопи) шунтування забезпечує більш надійну і ефективну процедуру порятунку кінцівки для пацієнтів з діабетом та ішемічними ранами стоп. Навіть екстенсивне багатосегментне захворювання у пацієнтів з діабетом не є перешкодою для порятунку стопи. У той час як серйозні ранові ускладнення можуть мати згубні результати, вони є нечастими після трансплантації обхідного судинного ногого шунта (шунтування стопи). Було показано, що відповідний контроль передісуючої інфекції стопи і обережної тунелізації трансплантату є ефективним в уникненні додаткових ускладнень. Ангіопластика в нижній кінцівці стає більш прогресивно використовуваною. Однак потрібно звернути увагу на те, що для того, щоб ангіопластика була ефективною, повинна бути доступною дистальна судина або живильна судина, якщо повинна бути одержана більш проксимальна ангіопластика.

Хоча діабетичні виразки/патологія кінцівок можуть бути вилікувані у деяких пацієнтів (за допомогою санації рани, обробки антибіотиками, використанням препаратів для стимуляції грануляційної тканини (нового колагену і ангиогенезу) і зменшення бактеріального навантаження в рані), було б переважно мати фармацевтичну композицію, яка могла б краще лікувати ці стани і або зменшувати ці симптоми.

Відносно додаткової інформації, див. American Journal of Surgery, Volume 187, Number 5 Suppl 1, May 1. 2004, Copyright © 2004 Elsevier.

Коронарна мікросудинна дисфункція в діабеті

Кореляція між гістопатологією і мікроциркуляторною дисфункцією при діабеті добре відома зі старих експериментальних досліджень і з аутопсії, де часто виявляють потовщення базальної мембрани, периваскулярний фіброз, розрідження судин і капілярний крововилив. Підтвердження цих даних *in vivo* залишається скрутним, хоча нещодавня стаття продемонструвала кореляцію між патологією і очною мікросудинною дисфункцією (Am J Physiol 2003; 285). Однак велика кількість клінічних досліджень показують, що не тільки явний діабет, але також порушений метаболічний контроль може впливати на коронарну мікроциркуляцію (Nurett Res 2002; 25:893). Вернер посилався на важливу статтю Sambuceti et al (Circulation 2001; 104:1129), яка показує персистенцію мікросудинної дисфункції у пацієнтів після успішного повторного відкриття пов'язаної з інфарктом артерії, яка може пояснити збільшену серцево-судинну захворюваність і смертність цих пацієнтів. Є доказ, що накопичується з великих досліджень гострої реперфузії, що захворюваність і смертність не пов'язані з самим повторним відкриванням пов'язаної з інфарктом артерії, але набагато більше залежать від

TIMI-поток (лізису тромбів при інфаркті міокарду) +/- міокардіального приливу (Stone 2002; Feldmann Circulation 2003). Herrmann показав, серед інших, що цілісність коронарної мікроциркуляції є, можливо, найбільш важливим і прогностичним фактором в цьому контексті (Circulation 2001). Нейтральна дія захисних пристроїв (немає релевантної зміни для TIMI-поток, для розділення ST або для MACE) може вказувати на те, що функціональне порушення мікроциркуляції є головною детермінантою прогнозу. Є також збільшуваний доказ того, що коронарна мікросудинна дисфункція грає головну роль в необструктивній CAD. Коронарна ендотеліальна дисфункція залишається найбільш прогностичним показником у цих пацієнтах.

Діабетична нефропатія (ниркова дисфункція у пацієнтів з діабетом)

Діабетична нефропатія включає мікроальбумінурію (ефект мікросудинного захворювання), протеїнурію і ESRD. Діабет є найбільш частою причиною ниркової недостатності, будучи відповідальним за більше ніж 40% нових випадків. Навіть коли лікарські засоби і дієта можуть контролювати діабет, це захворювання може приводити до нефропатії і ниркової недостатності. Більшість людей з діабетом не розвивають нефропатію, яка є досить серйозною, щоб викликати ниркову недостатність. Приблизно 16 мільйонів людей у Сполучених Штатах мають діабет і приблизно 10000 людей мають ниркову недостатність як наслідок діабету.

Діабетична ретинопатія

У діабетичному стані гіперглікемія приводить до зниженого кровотоку сітківки, гіперпрониємості сітківки, затримок провідності нерва фоторецептора і загибелі нервових клітин сітківки. У діабеті з короткою тривалістю була ідентифікована загибель нервових клітин у внутрішньому ядерному шарі сітківки. Конкретно, апоптоз був локалізований в гліальних клітинах, таких як клітини Мюллера і астроцити, і було показано, що він відбувається в межах 1 місяця діабету в моделі STZ-індукованих діабетичних щурів. Причина цих подій є багатофакторний, що включає активацію шляху діацилгліцерин/PKC, окислювальний стрес і неферментативне глікозилювання. Комбінація цих подій робить сітківку гіпоксичною і, зрештою, приводить до розвитку діабетичної ретинопатії. Одним з можливих зв'язків між ретиальною ішемією і ранніми змінами в діабетичній сітківці є індуковане гіпоксією продукування факторів росту, таких як VEGF. Як головний регулятор цієї гіпоксичної реакції був ідентифікований фактор-1 (HIF-1), що індукується гіпоксією, який контролює гени, які регулюють клітинну проліферацію і ангіогенез. Попередні дослідження продемонстрували, що інгібування убіквітинування HIF-1 приводить до зв'язування з елементами (HRE), які відповідають за гіпоксію, і продукування mPHK VEGF.

Діабетична ретинопатія визначається як прогресуюча дисфункція судинної сітки сітківки, що викликається хронічною гіперглікемією. Ключові ознаки діабетичної ретинопатії включають мікроаневризми, крововиливи сітківки, ліпідні ексудати сітківки, плями типу «ватних грудочок», відсутність капілярного кровопостачання, набряк жовтої пля-

ми і неоваскуляризацію. Асоційовані ознаки включають крововилив склоподібного тіла, відшаровування сітківки, неоваскулярну глаукому, передчасну катаракту і паралічі черепних нервів.

У Сполучених Штатах є 16 мільйонів людей з діабетом Типу 1 і Типу 2. У межах 15 років у 80% пацієнтів з діабетом Типу 1 розвинулась діабетична ретинопатія, тоді як у 84% пацієнтів з діабетом Типу 2 розвинулась ретинопатія в межах 19 років. Ці цифри створюють значний ринок для терапевтичних агентів, націлених на очні захворювання з неоваскуляризацією. Розвиток діабетичної ретинопатії залежить від часу. Незважаючи на оптимальний контроль цукру крові, можна чекати, що у пацієнтів з тривалим захворюванням згодом розвинеться деяка форма ретинопатії. National Society to Prevent Blindness приблизно визначило, що 4-6 мільйонів діабетиків в США мають діабетичну ретинопатію. Визначена приблизно щорічна зустрічність нових випадків проліферативної діабетичної ретинопатії і діабетичного набряку жовтої плями дорівнює 65000 і 75000, відповідно, з частотою випадків 700000 і 500000, відповідно. Діабетична ретинопатія викликає 12000-24000 нових випадків сліпоти в США щорічно. Ретинопатію лікують хірургічними способами, ефективними у зниженні важкої втрати зору, але оброблені лазерами частини сітківки є безповоротно зруйнованими. Лікування лікарськими засобами є недоступним.

Мікросудинне захворювання, яке первинно вражає капіляри, цукровий діабет, вражає око руйнуванням судинної сітки в кон'юнктиві, сітківці і центральній нервовій системі. Пацієнти можуть мати в анамнезі давнішу ін'єктовану бульбарну кон'юнктиву разом з системними скаргами на втрату маси, незважаючи на більше ніж нормальний апетит (поліпозію), атипичну спрагу (полідипсію) і патологічно часте сечовипускання (поліурію).

Коливання гостроти зору, вторинні відносно нестабільного цукру крові, є звичайним очним симптомом. Опухання в кришталику приводить до великих несподіваних зсувів в дифракції, а також передчасного утворення катаракти. Зміни гостроти зору будуть залежати від тяжкості і стадії цього захворювання.

У сітківці ослаблення артерій і капілярів може приводити до характерної появи інтратетинальних крововиливів у вигляді точок і плям, ексудатів, інтратетинальних мікросудинних аномалій (IRMA), мікроаневризм, набряку і пошкоджень типу «ватних грудочок». Проліферативна діабетична ретинопатія є результатом важкого судинного порушення і видна у вигляді неоваскуляризації диску (NVD) зорового нерва, неоваскуляризації в іншому місці (NVE) і неоваскуляризації радужки (NVI або діабетичного почервоніння радужки). Неврологічні ускладнення включають паралічі третього, четвертого і шостою черепних нервів, а також діабетичний папіліт (запалення диску зорового нерва) і параліч лицьового нерва.

Цукровий діабет є генетично обумовленою групою захворювань, які мають загальну непереносимість глюкози. Він характеризується як порушення метаболічної регуляції внаслідок недостатності або порушення функції інсуліну або

недостатності або порушення функції клітинних рецепторів інсуліну.

Біохімія, що включає утворення сорбіту, грає у в деструкції перичитів, які являють собою клітини, які підтримують ендотелій судин. Коли ці підтримуючі неричити гинуть, ендотелій капілярів стає погіршеним, що приводить до витоку крові, білка і ліпідів з судин. Це, в комбінації зі згущеною, навантаженою глюкозою кров'ю, створює судинну недостатність, відсутність перфузії капілярів, ретинальну гіпоксію, змінену структуру і знижену функцію. Утворення і вивільнення вазопроліферативних факторів, які грають роль в генезі ретинальної неоваскуляризації, є такою, що слабо розуміється.

Більшість не загрозливих зору ускладнень діабету вирішуються спонтанно протягом декількох тижнів місяців після лікарського лікування. У випадках, коли є великі зміни, що стосуються рефракції, пацієнти можуть мати потребу у тимчасовому прописуванні окулярів доти, доки рефракція не стабілізується. Коли ретинопатія загрожує жовтій плямі або коли проліферують нові кровоносні судини, пацієнт може бути направлений на лазерну фотокоагуляцію. Дослідження діабетичної ретинопатії (DRS) переконливо довело, що панретинальна фотокоагуляція була успішною у зменшенні ризику важкої втрати зору у пацієнтів з високим ризиком. Воно визначає характеристики високого ризику таким чином: (1) Неоваскуляризація (утворення нових судин) оптичного диску (NVD) в розмірі однієї чверті однієї третини діаметра оптичного диску і (2) неоваскуляризація в іншому місці (NVE) з будь-яким крововиливом склоподібного тіла.

Діабетичний набряк жовтої плями (DME)

DME є ускладненням діабетичної ретинопатії, захворюванням, що вражає кровоносні судини сітківки. Діабетична ретинопатія приводить до множинних патологій в сітківці, в тому числі потовщення і набряку сітківки, крововиливів, ускладненого кровотоку, надмірного підтікання рідини з кровоносних судин і, в кінцевих стадіях, до атипичного зростання кровоносних судин. Це зростання кровоносних судин може приводити до великих крововиливів і важкого пошкодження сітківки. Коли підтікання кровоносних судин діабетичної ретинопатії викликає набряк в жовтій плямі, його називають DME. Основним симптомом DME є втрата центрального зору. Фактори ризику, асоційовані з DME, включають рівні глюкози крові, що слабо контролюються, високий кров'яний тиск, атипичну функцію нирок, що викликає затримку рідини, високі рівні холестерину та інші звичайні системні фактори.

Згідно з Всесвітньою Організацією Охорони здоров'я, діабетична ретинопатія є головною причиною сліпоти у дорослих людей працюючого віку і головною причиною втрати зору у діабетиків. American Diabetes Association повідомляє, що є приблизно 18 мільйонів діабетиків у Сполучених Штатах і приблизно 1,3 мільйони випадків діабету, що знову діагностуються у Сполучених Штатах кожний рік. Prevent Blindness America і the National Eye Institute оцінюють приблизно, що в Сполучених Штатах є більше 5,3 мільйонів людей у віці 18

років або більше з діабетичною ретинопатією, в тому числі приблизно 50000 з DME. CDC оцінює, що щорічно є приблизно 75000 нових випадків DME у Сполучених Штатах.

Додаткові невропатії

Крім діабету, звичайними причинами невропатії є інфекція оперізуючого герпесу, хронічна або гостра травма (в тому числі після хірургії) і різні нейротоксини. Невропатичний біль є звичайним у випадку раку як пряма дія раку на периферичні нерви (наприклад, стискування пухлиною) і як побічна дія багатьох хіміотерапевтичних лікарських засобів.

Мікросудинне захворювання - судинні і невральні захворювання є тісно пов'язаними і переплетеними. Кровоносні судини залежать від нормальної функції нервів, а нерви залежать від достатнього кровопостачання. Першою патологічною зміною в мікросудинній сітці є вазоконстрикція. По мірі прогресування захворювання дисфункція нервових клітин тісно корелює з розвитком судинних патологій, таких як потовщення базальної мембрани капілярів і гіперплазія ендотелію, які сприяють зменшенню кисневого потенціалу і гіпоксії. Судинорозширювальні агенти (вазодилататори) (наприклад, інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту, альфа1-антагоністи) можуть приводити до суттєвих поліпшень в кровопостачанні нервових клітин, з відповідними поліпшеннями швидкості провідності нервів.

Клінічні прояви

Невропатія вражає всі периферичні нерви: больові волокна, рухові нейрони, автономні нерви. Таким чином, вона може необов'язково вражати всі органи і системи, оскільки всі вони іннервовані. Є декілька окремих синдромів, основаних на уражених системах органів і членах, але вони в жодному випадку не є винятковими. Пацієнт може мати сенсорно-рухову і автономну невропатію або будь-яку іншу комбінацію.

Незважаючи на успіхи у розумінні метаболічних причин невропатії, лікування, націлені на переривання цих патологічних процесів, обмежувались побічними ефектами і відсутністю ефективності. Таким чином, способи лікування є симптоматичними і не направлені на проблеми, які лежать в основі невропатії. Агенти для болю, які викликаються сенсорно-руховою невропатією, включають трициклічні антидепресанти (TCA), інгібітори зворотного захоплення серотоніну (SSRI) і антиепілептичні лікарські засоби (AED). Жоден з цих агентів не повертає патологічні процеси, що приводять до діабетичної невропатії, і жоден з них не змінює непохитно хід цього захворювання. Таким чином, було б корисно мати фармацевтичну композицію, яка могла б кращим чином лікувати ці стани і/або зменшувати ці симптоми.

Додаткові ретинопатії

Ретинальна мікроваскулопатія (ретинопатія СНІДу)

Ретинальна мікроваскулопатія спостерігається у 100% пацієнтів зі СНІДом. Вона характеризується інtrarетинальними крововиливами, мікроаневризмами, плямами Рота, плямами типу «ватних грудочок» (мікропошкоджень шару нервових воло-

кон) і утворенням периваскулярної оболонки. Етіологія цієї ретинопатії невідома, хоча передбачали, що вона зумовлена циркулюючими імунними комплексами, локальним вивільненням цитотоксичних речовин, аномальною гемореологією і ВІЛ-інфекцією ендотеліальних клітин. Ретинопатія СНІДу є в цей час настільки звичайною, що плями типу «ватних грудочок» у пацієнта без діабету або гіпертензії, але при ризику у відношенні ВІЛ повинні спонукати лікаря провести вірусне тестування. Специфічного лікування ретинопатії СНІДу не існує, але її присутність, що продовжується, може спонукати лікаря до повторною випробування ефективності ВІЛ-терапії і одержання згоди на це пацієнта.

Ретинопатія трансплантації кісткового мозку (ВМТ)

Ретинопатія трансплантації кісткового мозку вперше повідомлялась в 1983 році. Вона звичайно виникає в межах шести місяців, але може мати місце так пізно, як при 62 місяцях після ВМТ. Фактори ризику, такі як діабет і гіпертензія, можуть полегшувати розвиток ретинопатії ВМТ підвищенням ішемічної мікроvasкулопатії. Не існує вікової, статевої або расової схильності відносно розвитку ретинопатії ВМТ. Пацієнти виявляють зменшену гостроту зору і/або недостатність поля зору. Показники задніх сегментів є звичайно білатеральними і симетричними. Клінічні прояви включають множинні плями типу «ватних грудочок», телеангіектазію, мікроаневризми, набряк жовтої плями, тверді ексудати і крововиливи сітківки. Ангіографія з флуоресцеїном демонструє відсутність перфузії і підтікання капілярів, інтратретинальні мікросудинні відхилення від норми, мікроаневризми і набряк жовтої плями. Хоча точна етіологія ретинопатії ВМТ не була з'ясована, на неї, мабуть, діють декілька факторів: токсичність циклоспорину, опромінення всього тіла (TBI) і хіміотерапевтичні агенти. Циклоспорин є сильним імунomodуючим агентом, який придушує імунну реакцію трансплантат проти хазяїна. Це може приводити до пошкодження ендотеліальних клітин і неврологічних побічних дій, і внаслідок цього було зроблене припущення, що це може бути причиною ретинопатії ВМТ. Однак ретинопатія ВМТ може розвиватись за відсутності застосування циклоспорину, і не було показано, що циклоспорин викликає ретинопатію ВМТ в аутологічних або сингенних реципієнтах кісткового мозку. Таким чином, циклоспорин, мабуть, не є єдиною причиною ретинопатії ВМТ. Передбачалось також, що опромінення всього тіла (TBI) є причиною ретинопатії ВМТ. Опромінення ушкоджує мікроvasкулатуру (мікроциркуляторну частину судинного русла) і приводить до ішемічної васкулопатії. Такі зміни, як загальна доза опромінення і часовий інтервал між опроміненнями і висіченням кісткового мозку, є, мабуть, важливими. Однак ретинопатія ВМТ може зустрічатись у пацієнтів, які не отримували TBI, і ретинопатію ВМТ не спостерігають у реципієнтів трансплантатів солідних органів, які отримували схожі дози опромінення. Таким чином, TBI не є єдиною причиною, але є іншим фактором, який сприяє розвитку ретинопатії ВМТ. Передбачалось, що хіміотерапевтичні агенти є потенційним фактором, який

сприяє розвитку ретинопатії ВМТ. Лікарські засоби, такі як цисплатин, кармустин і циклофосфамід, можуть викликати очні побічні дії, в тому числі набряк диску зорового нерва, ретробульбарний неврит, недостатність поля зору і коркову сліпоту. Було зроблене припущення, що ці хіміотерапевтичні лікарські засоби можуть схилиати пацієнтів до індукованих опроміненнь ретинальних пошкоджень і посилювати шкідливу дію опромінення. Звичайно, пацієнти з ретинопатією ВМТ мають хороший прогноз. Ця ретинопатія звичайно усувається в межах двох-чотирьох місяців після припинення прийому або зниження дози циклоспорину. В одному повідомленні 69 процентів пацієнтів відчували повне усунення ретинальних показників і 46 процентів пацієнтів повністю відновлювали їх фонову гостроту зору. Внаслідок сприятливого прогнозу і відносно не прогресуючого характеру ретинопатії ВМТ агресивне втручання звичайно не є необхідним.

Ішемічні стани

Ішемія може бути поділена на 2 категорії: перша включає прискорений атеросклероз, який зустрічається звичайно у пацієнтів з діабетом, тобто в стегновій, підколінній і задній великомілкової артеріїх. Ці судини, часто тільки 1 або 2 см в діаметрі, можуть розвивати атеросклеротичну бляшку, яка серйозно зменшує кровотік. Після того як великі судини стають повністю закупореними, можуть відбуватись інсульт, інфаркт міокарда, ішемія і невиліковні діабетичні виразки стоп. Ця форма ішемії є по суті захворюванням великих судин.

Деменція після інсульту

25% людей мають деменцію після інсульту, причому у багатьох інших розвивається деменція протягом 5-10 років. Крім того, багато які індивідууми відчувають більш важко вловимі порушення їх більш високих функцій головного мозку (таких як навички планування і швидкість переробки інформації) і схильні до дуже високого ризику розвитку після цього деменції. Дуже невеликі інсульти в глибоких частинах головного мозку в цьому процесі (названому мікросудинним захворюванням) є, мабуть, суттєвими в процесі, що приводить до ідентифікованою розподілу атрофії головного мозку, специфічного для деменції після інсульту.

Очний ішемічний синдром

Пацієнти, які страждають очним ішемічним синдромом (OIS), є звичайно немолодими, в межах віку 50-80 років. Чоловіки вражаються в два рази більш часто, ніж жінки. Такий пацієнт лише в рідких випадках є безсимптомним. Знижений зір виявляється у 90 процентах випадків, і 40 процентів пацієнтів мають супутній очний біль. Може бути також супутня або попередня історія тимчасових ішемічних приступів або скороминущої сліпоти. Пацієнти також мають істотне відоме або невідоме системне захворювання в момент опису випадку. Системними захворюваннями, що найчастіше зустрічаються, є гіпертензія, діабет, ішемічна хвороба серця, інсульт і периферичне судинне захворювання. У меншій мірі пацієнти проявляють OIS як наслідок гігантоклітинного артеріїту (GCA).

Односторонні показники присутні у 80 процентах випадків. Звичайні показники можуть включати запущену односторонню катаракту, запалення

передньої камери ока, безсимптомну реакцію передньої камери ока, набряк жовтої плями, розширені, але не скручені вени сітківки, середньопериферичні крововиливи у вигляді точок і плям, плями типу ватних грудочок, ексудати і неоваскуляризацію диску зорового нерва і сітківки. Може спостерігатись також спонтанна артеріальна пульсація, підвищений внутрішньоочний тиск і неоваскуляризація радужки і кут з неоваскулярною глаукомою (NVG). Хоча цей пацієнт може виявляти неоваскуляризацію передньої камери ока, може мати місце гіпотонія ока внаслідок низької артеріальної перфузії до війкового тіла. Іноді є видима ретинальна емболія (бляшки Холенхорста).

Показники в OIS обумовлені атероматозним покриттям виразками сонної артерії і стенозом в біфуркації загальної сонної артерії. У п'яти проценти пацієнтів зі стенозом внутрішньої артерії розвивається OIS. Однак OIS зустрічається тільки в тому випадку, якщо міра стенозу перевищує 90 процентів. Стеноз сонної артерії зменшує перфузійний тиск на око, приводячи до вищезазначених ішемічних явищ. Як тільки стеноз досягає 90 процентів, перфузійний тиск в центральній ретинальній артерії (CRA) падає тільки до 50 процентів. Часто зменшений артеріальний тиск проявляється у вигляді спонтанної пульсації CRA. Ці показники є варіабельними і можуть включати всі з наведених вище показників.

Пацієнти з OIS мають істотне системне захворювання, яке повинне бути обстежене. Серцева смерть є первинною причиною смертності у випадку пацієнтів з OIS - п'ятирічний коефіцієнт смертності дорівнює 40%. З цієї причини пацієнти з OIS повинні бути відіслані до кардіолога для повної серології, ЕКГ, ехокардіограми і оцінки сонних артерій.

Мікросудинні захворювання нирки

Нирка бере участь в ряді окремих клінікопатологічних станів, які впливають на системну і ниркову мікроциркуляторну частину судинного русла (мікроваскулатуру). Деякі з цих станів характеризуються первинним пошкодженням ендотеліальних клітин, таким як:

- гемолітико-уремічний синдром (HUS) і тромботична тромбоцитопенічна пурпура (TTP). HUS і TTP є близькоспорідненими захворюваннями, які відрізняються мікроангіопатичною гемолітичною анемією і варіабельними порушеннями органів. Традиційно, діагноз TTP робиться, коли ниркова недостатність є переважаючою ознакою цього синдрому, як це є звичайним у дітей. У дорослих часто переважає неврологічне порушення і тоді цей синдром називають TTP. Тромботична мікроангіопатія є лежачим в основі патологічним пошкодженням в обох синдромах, і клінічні і лабораторні показники в пацієнтах з HUS або TTP значною мірою перекриваються. Це спонукало деяких дослідників розглядати ці два синдроми як безперервне єдине захворювання. Патогенез: Експериментальні дані в сильній мірі передбачають, що пошкодження ендотеліальних клітин є первинною подією в патогенезі HUS/TTP. Ендотеліальне пошкодження запускає каскад подій, який включає локальну внутрішньосудинну коагуляцію, відкладення фібрину і активацію і агрегацію тромбоцитів.

Кінцевим результатом є гістопатологічний показник тромботичної мікроангіопатії, спільний для різних форм синдрому HUS/TTP. За відсутності лікування HUS/TTP коефіцієнт смертності наближається до 90%. Підтримуюча терапія, в тому числі діаліз, антигіпертензивні лікарські засоби, переливання крові і лікування неврологічних ускладнень сприяє поліпшенню виживанню пацієнтів з HUS/TTP. Адекватний баланс рідини і відпочинок травного тракту є важливими в лікуванні типового HUS з діареєю.

- променевий (радіаційний) нефрит - Довгострокові ускладнення опромінення нирок більше ніж 2500 рад можуть бути поділені на п'ять клінічних синдромів:

- (i) Гострий радіаційний нефрит має місце в приблизно 40% пацієнтів після латентного періоду 6-13 місяців. Він характеризується клінічно різким виникненням гіпертензії, протеїнурією, набряком і прогресуючою нирковою недостатністю, що в більшості випадків приводить до нирок термінальної стадії.

- (ii) Хронічний радіаційний нефрит, навпаки, має латентний період, який варіюється між 18 місяцями і 14 роками після початкового пошкодження. Він є таким, що поступово протікає на початку і характеризується гіпертензією, протеїнурією і поступовою втратою ниркової функції.

- (iii) Третій синдром проявляється через 5-19 років після дії опромінення у вигляді доброякісної протеїнурії з нормальною нирковою функцією.

- (iv) Четверта група пацієнтів виявляє тільки доброякісну гіпертензію через 2 роки - 5 років і може мати варіабельну протеїнурію. Пізня злаякісна гіпертензія виникає через 18 місяців 11 років після опромінення у пацієнтів або з хронічним радіаційним нефритом, або доброякісною гіпертензією. Видалення ураженої нирки усуває гіпертензію. Повідомлялось також індуковане опроміненням пошкодження ниркових артерій з подальшою гіпертензією ниркових судин.

- (v) Синдром ниркової недостатності, аналогічний гострому радіаційному нефриту, спостерігали у пацієнтів з трансплантацією кісткового мозку (BMT), яких лікували опроміненням всього тіла (TBI).

Повідомлялось, що опромінення викликає ендотеліальну дисфункцію, але зберігає клітини гладких м'язів судин в ранній стадії після опромінення. Опромінення могло б безпосередньо ушкоджувати ДНК, приводячи до зниженої регенерації цих клітин і оголення (денудації) базальної мембрани в клубочкових капілярах і каналцях. Яким чином це початкове пошкодження згодом приводить до гломерулосклерозу, атрофії каналців та інтерстиціального фіброзу, є неясним. Постулюється, що дегенерація шару ендотеліальних клітин може приводити до внутрішньосудинного тромбозу в капілярах і більш дрібних артеріолах. Ця внутрішньониркова ангіопатія може тоді пояснювати прогресуючий нирковий фіброз і гіпертензію, які характеризують радіаційний нефрит. Нещодавнє дослідження нирок опроміненої миші показало залежне від дози збільшення лейкоцитів в корковій речовині нирки, що передбачає роль

запальних процесів в індукованому опроміненні нефриті.

В інших захворюваннях нирок мікроциркуляторна частина судинної сітки нирки бере участь в аутоімунних порушеннях, таких як системний склероз (склеродермія). Участь нирок в системному склерозі виявляється у вигляді повільно прогресуючого хронічного ниркового захворювання або у вигляді ниркової кризи склеродермії (SRC), що характеризується злоякісною гіпертензією і гострою азотемією. Постулюється, що SRC обумовлена Рейно-подібним феноменом в нирці. Важкий вазоспазм приводить до ішемії коркової речовини нирки і посиленого продукування реніну і ангіотензину II, які, в свою чергу, зберігають назавжди ниркову вазоконстрикцію. Гормональні зміни (вагітність), фізичний і емоційний стрес або низька температура можуть запускати Рейно-подібний артеріальний вазоспазм. Роль системи ренін-ангіотензину у збереженні ниркової ішемії підтверджується значною користю інгібіторів ACE у лікуванні SRC. Для пацієнтів з SRC, у яких прогресує важка ниркова недостатність, незважаючи на антигіпертензивне лікування, стає необхідним діаліз. Використали як перитонеальний діаліз, так і гемодіаліз. Повідомлення Network The End-Stage Renal Disease (ESRD) про 311 пацієнта з системним індукованим склерозом ESRD, підданого діалізу між 1983 і 1985 роками, виявило коефіцієнт виживаності 33% при 3 роках.

На ниркову мікроциркуляцію може вливати також серпасто-клітинна хвороба, до якої нирка особливо чутлива внаслідок низького кисневого потенціалу, що досягається в глибоких судинах мозкової речовини нирки внаслідок протиточного перенесення кисню вздовж vasa recta. Більш дрібні ниркові артерії і артеріоли можуть бути також місцем тромбоемболічного пошкодження від холестеринвмісного матеріалу, зміщеного зі стінок великих судин.

Взяті у вигляді групи, захворювання, які викликають скороминушу або перманентну оклюзію ниркової мікроциркуляторної частини судинного русла, приводять до порушення клубочкової перфузії і, отже, швидкості клубочкового фільтрування, створюючи тим самим серйозну загрозу відносно системного гомеостазу.

Гостра ниркова недостатність

ARF може бути викликана мікросудинним або макросудинним захворюванням (оклюзією головної ниркової артерії або важким захворюванням абдомінальної аорти). Класичні мікросудинні захворювання часто виявляють мікроангіопатичний гемоліз і гостру ниркову недостатність, що має місце внаслідок тромбозу або оклюзії клубочкових капілярів, що часто супроводжується тромбоцитопенією. Типові приклади цих захворювань включають:

а) Тромботичну тромбоцитопенічну пурпуру - Класична пентада в тромботичній тромбоцитопенічній пурпурі включає лихоманку, неврологічні зміни, ниркову недостатність, мікроангіопатичну гемолітичну анемію і тромбоцитопенію.

б) Гемолітичний уремичний синдром - Гемолітичний уремичний синдром подібний тромботичній

тромбоцитопенічній пурпурі, але не виявляє неврологічних змін.

с) Синдром HELLP (гемолізу, підвищених ферментів печінки і низьких тромбоцитів). Синдром HELLP є типом гемолітичного уремичного синдрому, який зустрічається у вагітних жінок, з додаванням підвищень трансамінази.

Гостра ниркова недостатність може бути присутньою у всіх медичних умовах, але переважно набувається в лікарнях. Цей стан розвивається у 5% госпіталізованих пацієнтів і приблизно 0,5% госпіталізованих пацієнтів мають потребу в діалізі. Протягом останніх 40 років коефіцієнт виживаності для гострої ниркової недостатності не поліпшився, передусім, внаслідок того, що уражені пацієнти є в цей час більш старими і мають більше супутніх патологічних станів. Інфекція відповідальна за 75 процентів смертей у випадку пацієнтів з гострою нирковою недостатністю, і серцево-респіраторні ускладнення є другою найбільш частою причиною смерті. В залежності від тяжкості ниркової недостатності, коефіцієнт смертності може знаходитись в діапазоні від 7 процентів до 80 процентів. Гостра ниркова недостатність може бути поділена на три категорії: передниркова, внутрішня і післяниркова ARF. Внутрішня ARF поділена на чотири категорії: канальцеве захворювання, клубочкове захворювання, судинне захворювання (в тому числі мікросудинне) та інтерстиціальне захворювання.

Прогресуюче ниркове захворювання

Є доказ, що прогресуюче ниркове захворювання характеризується прогресуючою втратою мікроциркуляторної частини судинного русла. Втрата мікроциркуляторної частини судинного русла корулює безпосередньо з розвитком утворення клубочкових і канальцево-інтерстиціальних рубців. Цей механізм частково опосередкований зменшенням ендотеліальної проліферативної реакції, і це порушення репарації капілярів опосередковане зміною локальної експресії як ангіогенних (судинний ендотеліальний фактор росту), так і антиангіогенних (тромбоспондин 1) факторів в нирці. Зміна в балансі ангіогенних факторів зростання опосередковуються як пов'язаними з макрофагами цитокінами (інтерлейкин-1 β), так і вазоактивними медіаторами. Нарешті, існує інтригуючий доказ того, що стимуляція ангіогенезу і/або репарації капілярів може стабілізувати ниркову функцію і уповільнювати прогресування і що цей позитивний ефект має місце незалежно від дій на BP або протеїнурію.

Відносно додаткової інформації див. Brenner & Rector's The Kidney, 7th ed, Copyright © 2004 Elsevier: Chapter 33 - Microvascular diseases of kidney і також Tiwary and Vikrant Journal of Indian Academy of Clinical Medicine Vol. 5, No. 1 Review Article-Sepsis and the Kidney.

На закінчення, можна сказати, що існуючі способи терапії для профілактики і/або лікування ХОХЛ, дегенерації жовтої плями і мікросудинних захворювань є незадовільними, та існує потреба в розвитку нових сполук для цієї мети. Всі захворювання і показання, описані тут вище, а також інші захворювання і стани, описані тут, такі як MI, можуть також лікуватись новими сполуками цього винаходу.

RTP801

Про ген RTP801 було вперше повідомлено правонаступником даної заявки. Патенти США з номерами 6455674, 6555667 і 6740738, всі переутуплені правонаступнику даної заявки, описують *per se* полінуклеотид і поліпептид RTP801 і антитіла, направлені проти цього поліпептиду. RTP801 представляє унікальну генну мішень для індукованого гіпоксією фактора-1 (HIF-1), який може регулювати індукований гіпоксією патогенез незалежно від факторів росту, таких як VEGF.

Автор даного винаходу зробив відкриття, які ведуть до нової концепції інгібування гена RTP801 з метою поліпшення лікування різних респіраторних порушень.

Наступні заявки на патенти і публікації представляють аспекти інформації рівня техніки

WO 2001070979 стосується маркерів нуклеїнових кислот, які понадекспресуються в клітинах раку яєчника.

US 6673549 описує комбінацію, що містить кДНК, які диференціально експресуються у відповідь на лікування стероїдами.

Заявка США 2003165864 стосується кДНК, які диференціально експресуються в клітинах, оброблених деметилуючим ДНК агентом.

Заявка США 2003108871 стосується композиції, яка містить декілька кДНК, які диференціально експресуються в культурах клітин печінки С3А людини і нібито застосовні для лікування порушень печінки.

Заявка США 2002119463 описує нову композицію, застосовну для лікування і діагностики раку передміхурової залози, причому вказана композиція містить кДНК людини, які диференціально експресуються в раку передміхурової залози.

WO 2004018999 описує спосіб оцінки, характеристики, моніторингу, профілактики і лікування раку шийки матки.

EP 1394274 стосується способу тестування на бронхіальну астму або хронічну обструктивну хворобу легень за допомогою порівняння рівня експресії маркерного гена в біологічній пробі з суб'єкта з рівнем експресії цього гена в пробі зі здорового суб'єкта.

WO 2002101075 стосується виділеної молекули нуклеїнової кислоти, застосовної для детектування, характеристики, профілактики і лікування раку шийки матки людини.

WO 2003010205 стосується інгібування ангіогенезу для лікування загоєння ран, ретинопатії, ішемії, запалення, мікрovasculopatії, загоєння кісток і запалення шкіри.

WO 2002046465 стосується ідентифікації гена, що бере участь у захворюванні, для лікування регульованих гіпоксією станів.

WO 2002031111 стосується нібито нових поліпептидів і їх білків, що кодуються, і, отже, забезпечені багато які їх застосування.

WO 2001012659 стосується нуклеїнових кислот, застосовних в методологіях рекомбіантних ДНК.

WO 2001077289 описує шістьсот двадцять три полінуклеотиди, одержаних з різних джерел тканин людини.

WO 2003101283 стосується комбінації, яка містить багато які кДПК і білки, які нібито диференціально експресуються в респіраторних захворюваннях.

JP 2003259877 стосується багатьох маркерів захворювання фіброзу печінки.

Tzipora Shoshani, et al. Identification of a Novel Hypoxia-Inducible Factor 1-Responsive Gene, RTP801, Involved in Apoptosis. MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Apr. 2002, p. 2283-2293: ця стаття, де співавтором є автор даного винаходу, детально описує ген RTP801 (тоді новий HIF-1-залежний ген).

Anat Brafman, et al. Inhibition of Oxygen-Induced retinopathy in RTP801-Deficient Mice, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 Oct; 45 (10): 3796-805; також у співавторстві з автором даного винаходу; ця стаття демонструє, що в мишах з нокаутом RTP801 гіпоксія не викликає дегенерації капілярної сітки сітківки.

Leif W. Ellisen, et al. REDD1, a Developmental Regulated Transcriptional Target of p63 and p53, Links p63 to Regulation of Reactive Oxygen Species. Molecular Cell, Vol. 10, 995-1005, November, 2002; ця стаття демонструє, що понадекспресія RTP801 (названого в цій статті REDD1) приводить до збільшеного продукування молекулярних частинок активного кисню.

Richard DR, Berra E. and Pouyssegur J. Non-hypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 alpha in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 2000. Sep1; 275(35): 26765-71; ця стаття демонструє, що HIF-1-залежна транскрипція може бути індукована надмірним продукуванням молекулярних частинок активного кисню.

Rangasami T, et al., Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Подана в Journal of Clinical Investigation. Ця робота стосується мишей з порушеним захистом проти антиоксидантів (внаслідок інактивації RTP801 в зародковій лінії, тут названо-го Nrf2).

Суть винаходу

Даний винахід забезпечує нові способи і композиції для лікування мікросудинних порушень, дегенерації жовтої плями, респіраторних порушень і пошкодження або захворювання спинного мозку.

В одному варіанті здійснення, забезпечені нові молекули, які інгібують RTP801 і можуть бути використані для лікування різних захворювань і показань.

В іншому варіанті здійснення, даний винахід забезпечує спосіб лікування пацієнта, який страждає мікросудинним порушенням, дегенерацією жовтої плями або респіраторним порушенням, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить інгібітор RTP801.

Інший варіант здійснення даного винаходу стосується способу лікування пацієнта, який страждає ХОХЛ, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібітору RTP801. В одному варіанті здійснення, цим інгібітором є молекула siRNA, антисмислова молекула, антитіло

(наприклад, нейтралізуюче антитіло), домінантно негативний пептид або рибозим.

Інший варіант здійснення даного винаходу стосується способу лікування пацієнта, який страждає дегенерацією жовтої плями, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібітору RTP801. В одному варіанті здійснення цим інгібітором є молекула siRNA, антисмислова молекула, антитіло (наприклад, нейтралізуюче антитіло), домінантно негативний пептид або рибозим.

Інший варіант здійснення даного винаходу стосується способу лікування пацієнта, який страждає мікросудинним порушенням, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну кількість інгібітору RTP801. В одному варіанті здійснення цим інгібітором є молекула siRNA, антисмислова молекула, антитіло (наприклад, нейтралізуюче антитіло), домінантно негативний пептид або рибозим.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу забезпечує застосування терапевтично ефективною кількості інгібітору RTP801 для приготування лікарського засобу для стимуляції видужання пацієнта, який страждає респіраторним порушенням. В одному варіанті здійснення цим респіраторним порушенням є ХОХЛ, а інгібітором є переважно siRNA.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу забезпечує застосування терапевтично ефективною дози інгібітору RTP801 для приготування лікарського засобу для стимуляції видужання пацієнта, який страждає дегенерацією жовтої плями. В одному варіанті здійснення дегенерацією жовтої плями є AMD, а інгібітором є переважно siRNA.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу забезпечує застосування терапевтично ефективною дози інгібітору RTP801 для приготування лікарського засобу для стимуляції видужання пацієнта, який страждає мікросудинним порушенням. В одному варіанті здійснення цим мікросудинним порушенням є діабетична ретинопатія, а інгібітором є переважно siRNA.

Докладний опис винаходу

Даний винахід, в деяких його варіантах здійснення, стосується інгібування гена або поліпептиду RTP801 для лікування очних хвороб, респіраторних порушень і мікросудинних порушень, *inter alia*. Як буде описано тут, переважними інгібіторами для застосування з даним винаходом є біологічні молекули.

Не зв'язуючи себе теорією, автори даного винаходу виявили, що RTP801 бере участь в різних патологічних станах, в тому числі мікросудинних порушеннях, очних хворобах, респіраторних порушеннях і пошкодженні і захворюванні кісткового мозку, і міг би бути корисним для інгібування RTP801 для лікування будь-якого з вказаних захворювань або порушень. Способи, молекули і композиції, які інгібують RTP801, обговорюються тут детально, і будь-яка з вказаних молекул і/або композицій може бути з користю використана у лікуванні пацієнта, який страждає будь-яким з вказаних станів.

Даний винахід забезпечує способи і композиції для інгібування експресії гена RTP801 *in vivo*. Звичайно, цей спосіб включає введення олігорибонуклеотидів, таких як малі інтерферуючі РНК (тобто siRNA), які націлені на конкретну мРНК і гібридизуються з нею, або матеріалу нуклеїнових кислот, який може продукувати siRNA в клітині, в кількості, достатній для придушення експресії гена-мішені за допомогою механізму інтерференції РНК. Зокрема, спосіб, що розглядається, може бути використаний для інгібування гена RTP801 для лікування респіраторних порушень, мікросудинних порушень або очних порушень.

Таким чином, в одному варіанті здійснення даний винахід забезпечує спосіб лікування пацієнта, який страждає мікросудинним порушенням, очною хворобою або респіраторним порушенням, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить інгібітор RTP801, у терапевтично ефективній кількості, з тим, щоб таким чином лікувати пацієнта. Крім того, даний винахід забезпечує спосіб лікування пацієнта, який страждає мікросудинним порушенням, очною хворобою або респіраторним порушенням, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить інгібітор RTP801, в дозі і протягом періоду часу, достатніх для стимуляції видужання. Очною хворобою може бути дегенерація жовтої плями, наприклад, пов'язана з віком дегенерація жовтої плями (AMD), *inter alia*. Мікросудинним порушенням може бути діабетична ретинопатія або гостра ниркова недостатність, *inter alia*. Респіраторним порушенням може бути хронічна обструктивна хвороба легень (ХОХЛ), емфізема, хронічний бронхіт, астма і рак легені, *inter alia*. Інгібітор RTP801 може бути вибраний з великої різноманітності молекул, в тому числі, але не тільки, таких сполук, як полінуклеотиди, AS-фрагменти (антисмислові фрагменти), молекули РНК, які націлені на мРНК гена RTP801, такі як рибозими або siRNA (такі як siRNA таблиць А-С і, зокрема, siRNA з номерами 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 і 50 таблиці А), або які містять їх експресуючі вектори; поліпептиди, такі як домінантно негативні поліпептиди, антитіла (такі як антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, присутнім в поліпептиді, який містить послідовні амінокислоти, послідовність яких подана на Фіг. 2 (SEQ ID NO:2)), або, у деяких випадках, ферменти. Крім того, інгібітором RTP801 може бути хімічний інгібітор, такий як мала молекула, наприклад, хімічні молекули з низькою молекулярною масою, наприклад, з молекулярною масою, меншою, ніж 2000 дальтон. Конкретні інгібітори RTP801 представлені нижче.

Крім того, даний винахід забезпечує спосіб лікування пацієнта, який страждає дегенерацією жовтої плями, ХОХЛ або діабетичною ретинопатією, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну дозу інгібітору RTP801, що містить полінуклеотид, який специфічно гібридується з мРНК, яка транскрибується з гена RTP801, і/або придушує експресію гена RTP801 з тим, щоб таким чином лікувати пацієнта. Цим полінуклеотидом може бути siRNA, що містить послідовні нуклеоти-

ди, які мають послідовність, ідентичну будь-яким з послідовностей, представлених в таблицях A-C (SEQ ID NO:3-344), і, зокрема, siRNA з номерами 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49, і 50 таблиці A.

Крім того, додатковий варіант здійснення даного винаходу стосується способу лікування пацієнта, який страждає мікросудинним порушенням, респіраторним порушенням або очною хворобою, який передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну дозу інгібітору RTP801, що містить молекулу siRNA, необов'язково молекулу siRNA, представлену в будь-який з таблиць A-C, в дозі і протягом періоду часу з тим, щоб таким чином лікувати пацієнта.

Забезпечений додатковий спосіб лікування пацієнта, який страждає мікросудинним порушенням, респіраторним порушенням або очною хворобою, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну дозу молекули РНК, яка націлена на мРНК гена RTP801, в дозі і протягом періоду часу з тим, щоб таким чином лікувати пацієнта. Цією молекулою РНК може бути молекула siRNA, така як молекула siRNA, представлена в таблицях A-C, і, зокрема, siRNA з номерами 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 і 50 таблиці A, або рибозим.

Крім того, даний винахід забезпечує спосіб лікування пацієнта, який страждає респіраторним порушенням, мікросудинним порушенням або очною хворобою або будь-яким з описаних тут станів, що передбачає введення пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить терапевтично ефективну дозу молекули siRNA, яка націлена на мРНК гена RTP801, необов'язково молекули siRNA, представлені в таблицях A-C, в дозі і протягом періоду часу з тим, щоб таким чином лікувати пацієнта. Крім того, очною хворобою може бути дегенерація жовтої плями (AMD); мікросудинним порушенням може бути діабетична ретинопатія або гостра ниркова недостатність; респіраторним порушенням може бути ХОХЛ, і проявами ХОХЛ, що підлягають лікуванню, можуть бути, але не тільки, емфізема, хронічний бронхіт або і те, та інше.

«Лікування захворювання» означає введення терапевтичної речовини, ефективною для зменшення симптомів, пов'язаних із захворюванням, для ослаблення тяжкості або лікування цього захворювання або для попередження виникнення цього захворювання.

«Терапевтично ефективною дозою» називають кількість фармацевтичної сполуки або фармацевтичної композиції, яка є ефективною для досягнення поліпшення у пацієнта або його фізіологічних системах, що включає, але що не обмежується ними, поліпшений коефіцієнт виживаності, більш швидке видужання або поліпшення або усунення симптомів, та інші показники, вибрані як придатні визначальні критерії фахівцями з кваліфікацією в даній галузі.

Способи лікування захворювань, описані тут і включені в даний винахід, можуть передбачати введення інгібітору RTP801 разом з додатковим інгібітором RTP801, речовиною, яка поліпшує фармакологічні властивості цього активного інгредіє-

нта, як детально описано нижче, або додатковою сполукою, про яку відомо, що вона є ефективною у лікуванні підлягаючого лікуванню захворювання, такого як дегенерація жовтої плями, ХОХЛ, ARF, DR, inter alia. Під виразом «разом з» мається на увазі: до, одночасно або після. Додаткова деталізація зразкових об'єднаних терапій наведена нижче.

В іншому варіанті здійснення, даний винахід забезпечує застосування терапевтично ефективної дози інгібітору RTP801 для приготування лікарського засобу для стимуляції видужання пацієнта, який страждає дегенерацією жовтої плями, ХОХЛ, ARF, DR або будь-якою іншою очною хворобою, мікросудинним або респіраторним станом, детально описаним вище, і застосування терапевтично ефективної дози інгібітору RTP801 для приготування лікарського засобу для лікування вказаних захворювань і станів. В цьому варіанті здійснення, інгібітор RTP801 може містити полінуклеотид, який містить послідовні нуклеотиди, що мають послідовність, яка містить антисмислову послідовність відносно послідовності, поданої на Фіг. 1 (SEQ ID NO:1). Додатково, інгібітором RTP801 може бути експресуючий вектор, який містить полінуклеотид, що має послідовність, яка є антисмисловою послідовністю відносно послідовності, представлені на Фіг. 1 (SEQ ID NO:1). Інгібітором RTP801 відповідно до вказаних застосувань може також бути антитіло, таке як нейтралізуюче антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, присутнім в поліпептиді, який містить послідовні амінокислоти, послідовність яких представлена на Фіг. 2 (SEQ ID NO:2). Крім того, інгібітором RTP801 може бути молекула РНК, яка націлена на мРНК гена RTP801, необов'язково siRNA, необов'язково siRNA, що містить послідовні нуклеотиди, які мають послідовність, ідентичну будь-яким з послідовностей, представлених в таблицях A-C (SEQ ID NO:3-344) і, зокрема, siRNA з номерами 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, і 50 таблиці A, або рибозим.

Таким чином, відповідно до описаної тут інформації інгібітор RTP801, який повинен бути використаний з будь-яким з описаних тут способів, в будь-якому з описаних тут застосувань, в будь-якій з описаних тут фармацевтичних композицій, може бути вибраний з групи, що складається з молекули siRNA, вектора, що містить молекулу siRNA, вектора, який може експресувати молекулу siRNA, і будь-якої молекули, яка ендогенно процесується в молекулу siRNA. Як детально описано тут, вказаною молекулою siRNA є переважно siRNA, що містить послідовні нуклеотиди, які мають послідовність, ідентичну будь-яким з послідовностей, представлених в таблицях A-C (SEQ ID NO:3-344), і, зокрема, siRNA з номерами 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, і 50 таблиці A.

«Респіраторним порушенням» називають стани, захворювання або синдроми дихальної (респіраторної) системи, що включають, але що не обмежуються ними, легеневі порушення всіх типів, в тому числі хронічну обструктивну хворобу легень (ХОХЛ), емфізему, хронічний бронхіт, астму і рак легень, inter alia. Емфізема і хронічний бронхіт мо-

жуть зустрічатись у вигляді частини ХОХЛ або незалежно.

«Мікросудинним порушенням» називають будь-який стан, який впливає на мікроскопічні капіляри і лімфатичні судини, зокрема, вазоспастичні захворювання, васкулітні захворювання і лімфатичні оклюзійні захворювання. Приклади мікросудинних порушень включають, *inter alia*: очні порушення, такі як сліпота скороминуща (емболічна або вторинна відносно системного червоного вовчка (SLE), арла-синдром, недостатність Prot CS і ATIII, мікросудинні патології, обумовлені IV-застосуванням лікарських засобів, диспротеїнемію, скроневий артеріїт, передню ішемічну очну невротію, ретробульбарний неврит (первинний або вторинний відносно аутоімунних захворювань), глаукому, синдром фон Гіппеля-Ліндау, корнеальне захворювання, відторгнення корнеального трансплантату, катаракти, хворобу Ілза (ретинальний васкуліт), *frosted branch angitis*, операцію стягування склери (при відшаруванні сітківки), увеїт, в тому числі *pars planitis*, хороїдальну меланому, аплазію зорового нерва: ретинальні стани, такі як оклюзія ретинальної аретрії, оклюзія ретинальної вени, ретролетальна фіброплазія (синдром Террі), ВІЛ-ретинопатія, ретинопатія Пурчера, ретинопатія системного васкуліту і аутоімунних захворювань, діабетична ретинопатія, гіпертонічна ретинопатія, радіаційна ретинопатія, оклюзія гілок ретинальної аретрії або вени, ідіопатичний ретинальний васкуліт, аневризми, нейро-ретиніт, ретинальна емболізація, гострий ретинальний некроз, ретинохороїдопатія Бердшота, давнє відшарування сітківки; системні стани, такі як цукровий діабет, діабетична ретинопатія (DR), пов'язані з діабетом мікросудинні патології (детально описані тут), синдроми підвищеної в'язкості, синдроми дуги аорти і очні ішемічні синдроми, каротидно-кавернозний свищ, розсіяний склероз, системний червоний вовчак, артеріоліт з аутоантитілом SS-A, гострий багатоосередковий геморагічний васкуліт, васкуліт, що походить з інфекції, васкуліт, що походить з хвороби Бехчета, саркоїдоз, коагулопатії, невротії, нефропатії, мікросудинні захворювання нирки та ішемічні мікросудинні стани, *inter alia*).

Мікросудинні порушення можуть містити неоваскулярний елемент (елемент утворення нових судин). Термін «неоваскулярне порушення» означає стани, в яких утворення кровоносних судин (неоваскуляризація) є шкідливим для пацієнта. Приклади очної неоваскуляризації включають: ретинальні захворювання (діабетичну ретинопатію, діабетичний набряк жовтої плями, хронічну глаукому, відшарування сітківки і серпасто-клітинну ретинопатію); почервоніння радужки; проліферативну вітреоретинопатію; запальні захворювання; хронічний увеїт; неоплазми (ретинобластому, псевдогліому і меланому); гетерохромний іридоцикліт Фухса; неоваскулярну глаукому: корнеальну неоваскуляризацію (запальну, трансплантаційну і пов'язану з розвитком гіоплазію радужки); неоваскуляризацію після об'єднаної ектомії склоподібного тіла і ектомії кришталика: судинні захворювання (ретинальну ішемію, хороїдальну судинну недостатність, хороїдальний тромбоз та

ішемію сонної артерії); неоваскуляризацію зорового нерва; і неоваскуляризацію внаслідок проникнення в око або пошкодження ока внаслідок удару (контузії). Всі ці неоваскулярні стани можуть лікуватись з використанням сполук і фармацевтичних композицій даного винаходу.

«Очною хворобою» називають стани, захворювання або синдроми ока, що включають, але що не обмежуються ними, будь-які стани, що включають хороїдальну неоваскуляризацію (CNV), вологу і суху AMD, синдром гістоплазмозу ока, ангіодні смуги сітківки, розриви в оболонці Бруха (базальній пластинці), міонічну дегенерацію, очні пухлини, ретинальні дегенеративні захворювання і оклюзію ретинальної вени (RVO). Деякі описані тут стани, такі як DR, які можуть лікуватись згідно зі способами даного винаходу, розглядались або як мікросудинне порушення, або як очна хвороба, або і те, та інше, у представлених тут визначеннях.

«Геном RTP801» називають відкрити рамку читування кодуєчої RTP801 послідовності, показану на Фіг. 1 (SEQ ID NO:1), або її будь-яку гомологічну послідовність, що переважно має щонайменше 70% ідентичність, більш переважно 80% ідентичність, навіть більш переважно 90% або 95% ідентичність. Це включає будь-які послідовності, зроблені з SEQ ID NO:1, які були піддані мутаціям, змінам або модифікаціям, описаним тут. Таким чином, в переважному варіанті здійснення RTP801 кодується послідовністю нуклеїнової кислоти, відповідною SEQ ID NO:1. У даний винахід входять також нуклеїнові кислоти, які є тільки комплементарними та ідентичними, відповідно, частині нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, переважно у вигляді першого ланцюга, і перший ланцюг є звичайно більш коротким, ніж нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу. Повинно бути також зрозуміло, що на основі амінокислотної послідовності RTP801 будь-яка послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує таку амінокислотну послідовність, може бути представлена фахівцем з кваліфікацією в даній галузі на основі генетичного коду. Однак внаслідок згодного механізму дії нуклеїнових кислот за даним винаходом, найбільш переважно, щоб нуклеїнова кислота, яка кодує RTP801, переважно його мРНК, була нуклеїновою кислотою, присутньою в організмі, тканині і/або клітині, відповідно, в якій повинна бути зменшена експресія RTP801.

«Поліпептидом RTP801» називають поліпептид гена RTP801, і, як це зрозуміло, цей термін включає, для цілей даного винаходу, терміни «RTP779», «REDD1», «Ddit4», «FLJ20500», «Dig2» і «PRF1», одержані з будь-якого організму, неособи людини, їх сплайсингові варіанти і фрагменти, що зберігають біологічну активність, і їх гомологи, що переважно мають щонайменше 70%, більш переважно щонайменше 80%, навіть більш переважно щонайменше 90% або 95% гомологію з ним. Крім того, передбачається, що цей термін включає поліпептиди, які походять з мінорних змін в кодуючій послідовності RTP801, таких як, *inter alia*, точкові мутації, заміни, делеції та інсерції, які можуть викликати відмінність в небагатьох амінокислотах між одержаним поліпептидом і RTP801, що природно зустрічається. Поліпептиди, що ко-

дуються послідовностями нуклеїнових кислот, які зв'язуються з кодуючою послідовністю або геномною послідовністю RTP801 в умовах гібридизації високої суворості, які добре відомі в даній галузі (наприклад, див. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons. Baltimore. Maryland (1988), доповнені в 1995 і 1998 роках), також охоплені цим терміном. У цей термін включені також хімічно модифікований RTP801 або хімічно модифіковані фрагменти RTP801, поки зберігається біологічна активність. RTP801 переважно має або містить амінокислотну послідовність, відповідну SEQ ID NO:2. Зрозуміло, що можуть бути відмінності в цій амінокислотній послідовності серед різних тканин організму або серед різних організмів одного виду або серед різних видів, до яких нуклеїнова кислота за даним винаходом може бути застосована в різних варіантах здійснення даного винаходу. Однак на основі забезпечення тут технічних описів відповідна послідовність може бути врахована відповідним чином при конструюванні будь-якої з нуклеїнових кислот за даним винаходом. Конкретні фрагменти RTP801 включають амінокислоти 1-50, 51-100, 101-150, 151-200 і 201-232 послідовності, показаної на Фіг. 2. Додаткові конкретні фрагменти RTP801 включають амінокислоти 25-74, 75-124, 125-174, 175-224 і 225-232 послідовності, показаної на Фіг. 2.

RTP801 означає в даному контексті білок, описаний, серед інших, в WO 99/09046. RTP801, який також називають RTP801, був описаний як транскрипційна мішень HIF-1 α , Shoshani T et al. (Shoshani et al., 2002, *Mol Cell*, 22, 2283-93). Крім того, дослідження Ellisen et al. (Ellisen et al., *Mol Cell*, 10, 995-1005) ідентифікували RTP801 як р53-залежний ген реакції пошкодження ДНК і як р63-залежний ген, що бере участь в диференціюванні епітелію. RTP801 також відображає тканеспецифічний характер члена р63 сімейства р53, є ефективним подібно TP 63 або в доповнення до TP 63, є інгібітором диференціювання *in vitro* і бере участь в регуляції молекулярних частинок активного кисню. Крім того, RTP801 є чутливим до чутливого до гіпоксії фактора транскрипції, що індукується гіпоксією фактору 1 (HIF-1) і є звичайно позитивно регульованим під час гіпоксії як *in vitro*, так і *in vivo* в моделі ішемічного інсульту тварини. RTP801 функціонує, мабуть, в регуляції молекулярних частинок активного кисню (ROS), і рівні ROS і зменшена чутливість до окислювального стресу збільшуються після ектопічної експресії RTP801 (Ellisen et al. *Supra*; Shoshani et al. 2002, *supra*). Переважно, RTP801 є біологічно активним білком RTP801, який переважно виявляє щонайменше одну з цих характеристик, переважно дві або більше і найбільш переважно кожну і будь-яку з цих характеристик.

Спорідненим RTP801 геном є RTP801L, також названий "REDD2", і він був виявлений авторами даного винаходу, RTP801L є гомологічним RTP801 і реагує схожим чином на окислювальний стрес: таким чином, RTP801L, можливо, володіє деякими схожими функціями з RTP801.

Не зв'язуючи себе теорією, автори вважають, що RTP801, будучи стресом, що індукується біл-

ком (який відповідає на гіпоксію, окислювальний стрес, термічний стрес, ER-стрес), є фактором, діючим в тонкій настройці реакції клітин на порушення балансу енергії. Як такий, він є мішенню, придатною для лікування будь-якого захворювання, в якому клітини повинні бути врятовані від апоптозу внаслідок стресових умов (наприклад, захворювань, що супроводжуються загибеллю нормальних клітин), або в якому клітини, які адаптовані до стресових умов внаслідок змін в експресії RTP801, повинні бути вбиті. В останньому випадку, RTP801 може розглядатись як фактор виживаності для ракових клітин, і його інгібітори можуть лікувати рак у вигляді монотерапії або у вигляді сенситизуючих лікарських засобів в комбінації з хіміотерапією або променевою терапією.

Термін «полінуклеотид» означає будь-яку молекулу, що складається з ДНК-нуклеотидів, РНК-нуклеотидів або комбінації обох типів, тобто яка містить дві або більше з основ гуанідину, цитозину, тимідину, аденіну, урацилу або інозину, *inter alia*. Полінуклеотид може включати природні нуклеотиди, хімічно модифіковані нуклеотиди і синтетичні нуклеотиди або їх хімічні аналоги. Цей термін включає «олігонуклеотиди» і включає «нуклеїнові кислоти».

Термін «амінокислота» стосується молекули, яка складається з будь-якої з 20 амінокислот, що природно зустрічаються, амінокислот, які були хімічно модифіковані (див. нижче) або синтетичних амінокислот.

Термін «поліпептид» стосується молекули, яка складається з двох або декількох амінокислотних залишків. Цей термін включає пептиди, поліпептиди, білки і пептидоміметики.

«Пептидоміметик» є сполукою, яка містить не-пептидні структурні елементи, що здатна імітувати біологічну дію (дії) природного вихідного пептиду. Деякі з класичних пептидних характеристик, таких як пептидні зв'язки, що ферментативно розрізаються, звичайно не присутні в пептидоміметиках.

Під терміном «домінантно негативний пептид» мають на увазі поліпептид, що кодується кДНК-фрагментом, який кодує частину білка (див. Herskowitz I.: *Functional inactivation of genes by dominant negative mutations*. *Nature*. 1987 Sep 17-23; 329(6136):219-22. Review: Roninson IB et al., *Genetic suppressor elements: new tools for molecular oncology thirteenth Cornelius P. Rhoads Memorial Award Lecture*. *Cancer Res*. 1995 Sep 15; 55(18):4023). Цей пептид може мати функцію, яка відрізняється, у порівнянні з білком, з якого він зроблений. Він може взаємодіяти з повним білком та інгібувати його активність або він може взаємодіяти з іншими білками та інгібувати їх активність у відповідь на повнорозмірний (вихідний) білок. Домінантно негативний означає, що цей пептид здатний подолати природний вихідний білок та інгібувати його активність, додаючи цій клітині відмінну властивість, таку як резистентність або сенситизацію відносно смерті або будь-якого клітинного фенотипу, який представляє інтерес. Для терапевтичного втручання цей пептид сам може доставлятися як активний інгредієнт фармацевтичної композиції або ця кДНК може бути доставлена в клітину з використанням відомих способів.

Одержанні пептидів і поліпептидів

Поліпептиди можуть бути одержані з використанням декількох способів, наприклад:

1) Синтетично:

Синтетичні поліпептиди можуть бути одержані з використанням комерційно доступного приладу з використанням відомої послідовності RTP801 або її частини.

2) Рекомбінантні способи:

Переважаючий спосіб одержання поліпептидів RTP801 або їх фрагментів полягає в клонуванні полінуклеотиду, що містить кДНК гена RTP801, в експресуючий вектор і культивуванні клітини, яка несе цей вектор, таким чином, щоб експресувати поліпептид, що кодується, і потім очищенні одержаного поліпептиду, причому все виконується з використанням способів, відомих в даній галузі, як описано, наприклад, в Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press (1996). (Крім того, див. Bibl Haematol. 1965; 23:1165-74 Appl Microbiol. 1967 Jul; 15(4):851-6; Can. J. Biochem. 1968 May; 46(5):441-4; Biochemistry. 1968 Jul; 7(7):2574-80; Arch Biochem Biophys. 1968 Sep 10; 126(3):746-72; Biochem Biophys Res Commun. 1970 Feb 20; 38(4):825-30).

Цей експресуючий вектор може включати промотор для регуляції транскрипції гетерологічного матеріалу, і цей промотор може бути конститутивним або індукцибельним промотором, щоб зробити можливою селективну транскрипцію. Не обов'язково можуть бути включені енхансери, які можуть вимагатись для одержання необхідних рівнів транскрипції. Цей експресуючий вектор може також включати ген для відбору.

Вектори можуть бути введені в клітини або тканини будь-яким з різноманітних способів, відомих в даній галузі. Такі способи можуть бути знайдені звичайно в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor, MI (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths., Boston MA (1988) і Gilboa et al., (1986).

3) Очищення з природних джерел:

Поліпептид RTP801, або його фрагменти, що природно зустрічаються, можуть бути очищені з природних джерел (таких як тканини) з використанням багатьох способів, відомих фахівцям зі звичайною кваліфікацією в даній галузі, таких як, наприклад: імунопреципітація анти-RTP801-антитілом або афінна хроматографія з матриксом, пов'язаним з будь-якою молекулою, про яку відомо, що вона зв'язує RTP801.

Очищення білка виконують, як відомо в даній галузі і як описано, наприклад, в Marschak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization. A laboratory course manual." CSHL Press (1996).

Під «біологічним ефектом RTP801» або «біологічною активністю RTP801» мають на увазі дію RTP801 в респіраторних порушеннях, яка може бути прямою або посередньою, і включає, без

зв'язування теорією, дію RTP8013 на апоптоз альвеолярних клітин, індукований гіпоксичними або гіпероксичними умовами. Посередня дія включає, але не обмежується ними, зв'язування RTP801 з однією з декількох молекул або дію на одну з декількох молекул, які беруть участь в каскаді трансдукції сигналу, що приводить до апоптозу.

«Апоптозом» називають фізіологічний тип смерті клітин, який виникає з активації деяких клітинних механізмів, тобто смерті, яка регулюється апаратом клітини. Апоптоз може, наприклад, бути результатом активації апарату клітини зовнішнім пусковим механізмом, наприклад, цитокином або анти-FAS-антитілом, який приводить до смерті клітин, або внутрішнім сигналом. Термін «запрограмована смерть клітин» може бути також використаний взаємозамінно з «апоптозом».

«Пов'язане з апоптозом захворювання» означає захворювання, етіологія якого пов'язана або повністю, або частково, з процесом апоптозу. Це захворювання може бути викликане або порушенням функції апоптотичного процесу (наприклад, у випадку раку або аутоімунного захворювання), або підвищеною активністю апоптотичного процесу (наприклад, у випадку деяких нейродегенеративних захворювань). Багато які захворювання, в яких бере участь RTP801, є пов'язаними з апоптозом захворюваннями. Наприклад, апоптоз є важливим механізмом в сухій AMD, за допомогою якого має місце повільна атрофія фоторецепторних і епітеліальних клітин, яка містить пігменти, передусім в центральному (макулярному) районі сітківки. Нейроретинальний апоптоз є також важливим механізмом в діабетичній ретинопатії.

«Інгібітор» є сполукою, яка здатна інгібувати активність гена або продукту такого гена до міри, достатньої для досягнення біологічного або фізіологічного ефекту. «Інгібітор RTP801» є сполукою, яка здатна інгібувати активність гена RTP801 або продукту гена RTP801, зокрема, гена або продукту гена RTP801 людини. Такі інгібітори включають речовини, які впливають на транскрипцію або трансляцію цього гена, а також речовини, які впливають на активність продукту цього гена. Інгібітор RTP801 може бути також інгібітором промотора RTP801. Приклади таких інгібіторів можуть включати, *inter alia*: полінуклеотиди, такі як AS-фрагменти (антисмислові фрагменти), мала інтерферуюча РНК (siRNA) або вектори, які їх містять: поліпептиди, такі як домінантно неагивні пептиди, антитіла і ферменти; каталітичні РНК, такі як рибозими; і хімічні молекули з низькою молекулярною масою, наприклад, молекулярною масою нижче 2000 дальтон. Конкретні інгібітори RTP801 наведені нижче.

«Експресуючий вектор» є вектором, який має здатність включення в чужорідну клітину і експресії гетерологічних фрагментів ДНК в чужорідній клітині. Багато які прокаріотичні і еукаріотичні експресуючі вектори знаходяться в рамках кваліфікації фахівців в даній галузі.

Термін «антитіло» стосується антитіла IgG, IgM, IgD, IgA і IgH, *inter alia*. Це визначення включає поліклональні антитіла або моноклональні антитіла. Цей термін стосується цілих антитіл або фрагментів антитіл, які містять антигензв'язуваль-

ний домен, наприклад, антитіл без Fc-частини, однокланцевих антитіл, мініантитіл, фрагментів, що складаються по суті тільки з варіабельного антигензв'язувального домену антитіла, і т.д. Термін «антитіло» може також стосуватись антитіл проти полінуклеотидних послідовностей, одержаних вакцинацією кДНК. Цей термін включає також фрагменти антитіл, які зберігають здатність селективного зв'язування з їх антигеном або рецептором, і прикладами їх є, *inter alia*:

(1) Fab, фрагмент, який містить одновалентний антигензв'язувальний фрагмент молекули антитіла, який може бути одержаний розщепленням цілого антитіла ферментом папаїном з одержанням легкого ланцюга і частини важкого ланцюга:

(2) F(ab')₂, фрагмент антитіла, який може бути одержаний обробкою цілого антитіла ферментом пепсином без подальшого відновлення; F(ab')₂ є димером двох Fab-фрагментів, які утримуються разом двома дисульфідними зв'язками:

(3) Fv, який визначається як генетично сконструйований фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, експресовану у вигляді двох ланцюгів; і

(4) Однокланцеве антитіло (SCA), що визначається як генетично сконструйована молекула, яка містить варіабельну ділянку легкого ланцюга і варіабельну ділянку важкого ланцюга, пов'язані придатним поліпептидним лінкером у вигляді злистої однокланцевої молекули.

Під терміном «епітоп» в контексті даного винаходу мають на увазі, антигенну детермінанту на антигені, з якою зв'язується антитіло. Епітопні детермінанти звичайно складаються з хімічно активних поверхневих групувань молекул, таких як амінокислоти або цукрові бічні ланцюги, і звичайно мають специфічні структурні характеристики, а також специфічні характеристики зарядів.

Одержання анти-RTP801-антитіл

Антитіла, які зв'язуються з RTP801 або зробленим з нього фрагментом, можуть бути одержані з використанням інтактного поліпептиду або фрагментів, що містять менші поліпептиди, як імунізуючий антиген. Наприклад, може бути бажаним одержання антитіл, які специфічно зв'язуються з N-кінцевим або C-кінцевим або будь-якими іншими придатними доменами RTP801. Поліпептид, що використовується для імунізації тварини, може бути зроблений з трансльованої кДНК або одержаний хімічним синтезом і може бути необов'язково кон'югований з білком-носієм. Такі носії, що звичайно використовуються, які хімічно пов'язані з поліпептидом, включають гемоціанін фісуреллі (KLH), тироглобулін, бичачий сироватковий альбумін (BSA) і правцевий токсойд. Потім цей пов'язаний поліпептид використовують для імунізації тварини.

Якщо бажано, поліклональні або моноклональні антитіла можуть бути додатково очищені, наприклад, зв'язуванням з матриксом і елюцією з матриксу, з яким пов'язаний поліпептид або пептид, до якого були індуковані антитіла. Фахівцям з кваліфікацією в даній галузі відомі різні способи, звичайні в імунології, для очищення і/або концентрування поліклональних, а також моноклональних

антитіл (Coligan et al., Unit 9, Current Protocols in Immunology. Wiley Interscience. 1994).

Способи одержання антитіл всіх типів, в тому числі фрагментів, відомі в даній галузі (див., наприклад, Harlow and Lane. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1988)). Способи імунізації, в тому числі всі необхідні стадії приготування імуногену у придатному ад'юванті, визначення зв'язування антитіл, виділення антитіл, способи одержання моноклональних антитіл і гуманізації моноклональних антитіл, є відомими кваліфікованому фахівцеві в даній галузі.

Антитіла можуть бути гуманізованими антитілами або антитілами людини. Антитіла можуть бути гуманізовані різними способами, відомими в даній галузі, в тому числі CDR-трансплантацією (EP239400: Публікація PCT WO 91/09967; US патенти з номерами 5225539; 5530101 і 5585089), облицюванням або зміною поверхні (EP 592106; EP 519596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska et al., PNAS 91:969-973 (1994)) і перетасовуванням ланцюга (Патент США з номером 5565332).

Моноклональні антитіла за визначенням включають антитіла, одержані з одного виду (такі як мишачі, кролячі, козячі, щурячі антитіла і антитіла людини і т.д.), а також антитіла, одержані з двох або більшої кількості видів, такі як химерні і гуманізовані антитіла.

Повністю людські антитіла особливо бажані для терапевтичного лікування пацієнтів-людей. Антитіла людини можуть бути одержані різними способами, відомими в даній галузі, що включають способи фагового дисплею з використанням бібліотек антитіл, одержаних з послідовностей імуноглобулінів людини. Див. також Патенти США з номерами 4444887 і 4716111 і Публікаціями PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 і WO 91/10741, кожна з яких включена тут як посилання в її повному об'ємі.

Додаткова інформація відносно всіх типів антитіл, в тому числі гуманізованих антитіл, антитіл людини і фрагментів антитіл може бути знайдена у WO 01/05998, яка включена тут як посилання в її повному об'ємі.

Нейтралізуючі антитіла можуть бути одержані способами, що обговорюються вище, можливо, з додатковою стадією скринінгу на нейтралізуючу активність, наприклад, з використанням аналізу виживаності.

Терміни «хімічна сполука», «мала молекула», «хімічна молекула», «мала хімічна молекула» і «мала хімічна сполука» використовуються тут взаємозамінно і стосуються хімічних частин молекул будь-якого конкретного типу, які можуть бути синтетично одержані або одержані з природних джерел і звичайно мають молекулярну масу менше ніж 2000 дальтон, менше ніж 1000 дальтон, або навіть менше ніж 600 дальтон.

Даний винахід стосується також функціональних нуклеїнових кислот, що містять дволанцюгову структуру, їх застосування для приготування лікарського засобу, фармацевтичної композиції, яка

містить такі функціональні нуклеїнові кислоти, і способу лікування пацієнта.

Гіпоксію вважають ключовим елементом в патологічному механізмі цілого ряду захворювань, таких як інсульт, емфізема та інфаркт, які асоційовані з субоптимальною доступністю кисню і реакціями пошкодження тканин у відповідь на умови гіпоксії. У швидко зростаючих тканинах, в тому числі в пухлині, субоптимальна доступність кисню компенсується небажаним утворенням нових кровоносних судин (неоангіогенезом). Таким чином, щонайменше у випадку ракових захворювань зростання судинної сітки є небажаним.

У зв'язку з цим, інгібування ангіогенезу і зростання судин, відповідно, є предметом інтенсивних досліджень. Вже сьогодні є доступними декілька сполук, які інгібують небажаний ангіогенез і зростання судин. Деякі з більш важливих сполук є сполуками, які інгібують VEGF і рецептор VEGF. В обох випадках, дія VEGF усувається або блокуванням VEGF як такого, наприклад, з використанням антитіл, направлених проти VEGF, таких як Genentech антитіло, що вивчається AVASTIN (моноклональне АВ, специфічне у відношенні VEGF) (Ferrara N., *Endocr Rev.* 2004 Aug; 25(4):581-611), або блокуванням відповідного рецептора, тобто рецептора VEGF (Traxler P; *Cancer Res.* 2004 Jul 15; 64(14):4931-41; або Stadler WM et al., *Clin Cancer Res.* 2004 May 15; 10(10):3365-70).

Однак, оскільки ангіогенез і зростання судинної сітки є дуже істотними і життєво важливим процесом в будь-якій тварині і людині, дія цього типу сполук повинна бути сфокусована в конкретній ділянці, де ангіогенез і зростання судин є фактично небажаним, що робить відповідне націлювання і придатну доставку вирішальними у зв'язку з цим типом терапевтичного підходу.

Таким чином, метою даного винаходу є забезпечення додаткових засобів для лікування захворювань, в яких бере участь зростання судинної сітки і ангіогенез, відповідно.

Під «малою інтерферуючою РНК» (siRNA) мають на увазі молекулу РНК, яка зменшує або здійснює сайленсинг (запобігає експресії) гена/мРНК її ендогенної клітинної копії. Передбачається, що цей термін включає «інтерференцію РНК» (RNAi), Інтерференцією РНК (RNAi) називають процес послідовність-специфічного посттранскрипційного сайленсингу генів у ссавцях, опосередкованого малими інтерферуючими РНК (siRNA) (Fire et al., 1998, *Nature* 391, 806). Відповідний процес в рослинах звичайно називають специфічним посттранскрипційним сайленсингом генів або сайленсингом РНК, а також називають набуханням в грибах. Реакція інтерференції РНК може представляти ендонуклеазний комплекс, що містить siRNA, звичайно названий комплексом сайленсингу (RISC), що РНК-індукується, який опосередковує розщеплення одноланцюгової РНК, яка має послідовність, комплементарну антисмисловою ланцюгу цього siRNA-дуплексу. Розщеплення РНК-мішені може мати місце в середині району, комплементарного антисмисловою ланцюгу siRNA-дуплексу (Elbashir et al 2001, *Genes Dev.*, 15, 188). Відносно нещодавньої інформації з цих термінів і передбачуваних механізмів див. Bernstein E., Denli AM., Hannon GJ:

The rest is silence. *RNA.* 2001 Nov; 7(11): 1509-21; i Nishikura K.: A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell.* 2001 Nov 16; 107(4):415-8. Приклади молекул siRNA, які можуть бути використані, наведені в таблицях А-С.

В останні роки інтерференція РНК (RNAi) з'явилась як один з найбільш ефективних способів інактивації генів (*Nature Reviews*, 2002. v. 3. p. 737-47; *Nature*, 2002. v. 418, p. 244-51). Як один спосіб, він оснований на здатності молекул дволанцюгової РНК (dsRNA) входити у специфічний білковий комплекс, де вона потім діє на комплементарну клітинну РНК-мішень і специфічно руйнує її. Більш детально, dsRNA розщеплюється на короткі (17-29 п.н.) інгібіторні РНК (siRNA) РНК-азами типу III (DICER, Drosha, і т.д.) (*Nature*. 2001. v. 409. p. 363-6; *Nature*. 2003, 425, p. 415-9). Ці фрагменти і комплементарні мРНК впізнаються специфічним білковим комплексом RISC. Весь процес культивується ендонуклеазним розщепленням мРНК-мішені (*Nature Reviews*, 2002, v. 3, p. 737-47; *Curr Opin Mol Ther.* 2003 Jun; 5(3):217-24).

Відносно опису, як конструювати і одержувати siRNA до відомих генів, див., наприклад, Chalk AM, Wahlestedt C, Sonnhhammer EL. Improved and automated prediction of effective siRNA *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004 Jim 18;319(1):264-74; Sioud M. Leirdal M., Potential design rules and enzymatic synthesis of siRNAs, *Methods Mol Biol.* 2004;252:457-69; Levenkova N, Gu Q, Rux JJ.: Gene specific siRNA selector *Bioinformatics.* 2004 Feb 12;20(3):430-2. and Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, Haraguchi T, Ohki-Hamazaki H, Juni A, Ueda R, Saigo K., Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference *Nucleic Acids Res.* 2004 Feb 9;32(3):936-48. Див. також Liu Y, Braasch DA, Nulf CJ, Corey DR. Efficient and isoform-selective inhibition of cellular gene expression by peptide nucleic acids *Biochemistry*, 2004 Feb 24;43(7):1921-7. Див. також PCT publications WO 2004O15107 (Atugen) and WO 02/44321 (Tuschl et al). and also Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis, *RNA* 2003 Sep;9(9):1034-48 and US Patent Nos.5898031 and 6107094 (Crooke) відносно одержання модифікованих/більш стабільних siRNA.

Були також розроблені вектори на основі ДНК, здатні генерувати siRNA в клітинах. Цей спосіб звичайно включає транскрипцію коротких шпилькових РНК, які ефективно процесуються з утворенням siRNA в клітинах. Paddison et al. *PNAS* 2002, 8:5515-5520; i Brummelkamp et al. *Science* 2002, 296:550-553. Ці повідомлення описують способи генерування siRNA, здатних специфічно націлюватись на численні ендогенно і екзогенно експресовані гени.

Відносно доставки siRNA див., наприклад, Shen et al (*FEBS letters* 539: 111-114 (2003)), Xia et al., *Nature Biotechnology* 20: 1006-1010 (2002), Reich et al., *Molecular Vision* 9: 210-216 (2003), Sorensen et al. (*J. Mol. Biol.* 327: 761-766 (2003), Lewis et al., *Nature Genetics* 32: 107-108 (2002) and Simeoni et al., *Nucleic Acids Research* 31,11: 2717-2724 (2003). siRNA нещодавно була успішно використана для інгібування в приматах; відносно до-

даткових подробиць див. Tolentino et al., *Retina* 24(1) February 2004 pp. 132-138.

siRNA даного винаходу

Загальні описи siRNA даного винаходу

Звичайно, siRNA, що використовуються в даному винаході, містять рибонуклеїнову кислоту, що містить дволанцюгову структуру, причому ця дволанцюгова структура містить перший ланцюг і другий ланцюг, причому перший ланцюг містить перший сегмент суміжних нуклеотидів і вказаний перший сегмент є щонайменше частково комплементарним нуклеїновій кислоті-мішені, а другий ланцюг містить другий сегмент суміжних нуклеотидів і вказаний другий сегмент є щонайменше частково ідентичним нуклеїновій кислоті-мішені, причому вказаний перший ланцюг і/або вказаний другий ланцюг містить множину груп модифікованих нуклеотидів, що мають модифікацію в положенні 2', причому в кожній групі цього ланцюга модифіковані нуклеотиди фланковані на одній або на обох сторонах фланкуючою групою нуклеотидів, причому фланкуючі нуклеотиди, які утворюють фланкуючу групу нуклеотидів, є або немодифікованими нуклеотидами, або нуклеотидами, що мають модифікацію, яка відрізняється від модифікації вищезазначених модифікованих нуклеотидів. Крім того, вказаний перший ланцюг і/або вказаний другий ланцюг може містити вказану множину модифікованих нуклеотидів і може містити вказану множину груп модифікованих нуклеотидів.

Група модифікованих нуклеотидів і/або група фланкуючих нуклеотидів може містити деяку кількість нуклеотидів, причому ця кількість нуклеотидів вибрана з групи, що складається з 1-10 нуклеотидів. У зв'язку з будь-якими діапазонами, вказаними тут, повинно бути зрозуміло, що кожний діапазон включає будь-яке окреме ціле число між відповідними числами, які використовуються для визначення діапазону, в тому числі вказані два числа, які обмежують вказаний діапазон. Таким чином, в цьому випадку ця група містить один нуклеотид, два нуклеотиди, три нуклеотиди, чотири нуклеотиди, п'ять нуклеотидів, шість нуклеотидів, сім нуклеотидів, вісім нуклеотидів, дев'ять нуклеотидів і десять нуклеотидів.

Розподіл модифікованих нуклеотидів вказаного першого ланцюга може бути таким же, що і розподіл модифікованих нуклеотидів вказаного другого ланцюга, і може бути зіставлений з розподілом вказаного другого ланцюга. Крім того, розподіл вказаного першого ланцюга може бути зміщений на один або декілька нуклеотидів відносно розподілу другого ланцюга.

Модифікації, що обговорюються вище, можуть бути вибрані з групи, що складається з аміно, фтору, метокси, алкокси і алкілу.

Дволанцюгова структура siRNA може бути затуплена на одній стороні або на обох сторонах. Більш конкретно, ця дволанцюгова структура може бути затуплена на стороні дволанцюгової структури, яка обмежена 5'-кінцем першого ланцюга і 3'-кінцем другого ланцюга, або ця дволанцюгова структура може бути затуплена на стороні дволанцюгової структури, яка обмежена 3'-кінцем першого ланцюга і 5'-кінцем другого ланцюга.

Крім того, щонайменше один з цих двох ланцюгів може мати виступ щонайменше одного нуклеотиду на 5'-кінці; цей виступ може складатись з щонайменше одного дезоксирибонуклеотиду. Щонайменше один з цих ланцюгів може також необов'язково мати виступ з щонайменше одного нуклеотиду на 3'-кінці.

Довжина дволанцюгової структури цієї siRNA звичайно дорівнює приблизно 17-21 і більш переважно 18-19 основ. Крім того, довжина вказаного першого ланцюга і/або довжина вказаного другого ланцюга може незалежно одна від одної бути вибрана з групи, що містить приблизно 15 основ - приблизно 23 основи, 17 основ 21 - основа і 18 або 19 основ.

Крім того, комплементарність між вказаним першим ланцюгом і нуклеїновою кислотою-мішенню може бути абсолютною, або дуплекс, утворений між першим ланцюгом і нуклеїновою кислотою-мішенню може містити щонайменше 15 нуклеотидів, де є одне помилкове спарювання або два помилкових спарювання між вказаним першим ланцюгом і нуклеїновою кислотою-мішенню, які утворюють вказану дволанцюгову структуру.

У деяких випадках як перший ланцюг, так і другий ланцюг, кожний, містять щонайменше одну групу модифікованих нуклеотидів і щонайменше одну фланкуючу групу нуклеотидів, причому кожна група модифікованих нуклеотидів містить щонайменше один нуклеотид і кожна фланкуюча група нуклеотидів містить щонайменше один нуклеотид, причому кожна група модифікованих нуклеотидів першого ланцюга зіставляється з фланкуючою групою нуклеотидів на другому ланцюгу, причому найбільш кінцевий 5'-нуклеотид першого ланцюга є нуклеотидом групи модифікованих нуклеотидів, а найбільш 3'-кінцевий нуклеотид другого ланцюга є нуклеотидом фланкуючої групи нуклеотидів. Кожна група модифікованих нуклеотидів може складатись з єдиного нуклеотиду і/або кожна фланкуюча група нуклеотидів може складатись з єдиного нуклеотиду.

Крім того, може бути так, що на першому ланцюгу нуклеотид, який утворює фланкуючу групу нуклеотидів, є немодифікованим нуклеотидом, який розташований в 3'-напрямі відносно нуклеотиду, який утворює групу модифікованих нуклеотидів, а на другому ланцюгу нуклеотид, який утворює групу модифікованих нуклеотидів, є модифікованим нуклеотидом, який розташований в 5'-напрямі відносно нуклеотиду, який утворює фланкуючу групу нуклеотидів.

Крім того, перший ланцюг siRNA може містити вісім-дванадцять, переважно дев'ять-одинадцять, груп модифікованих нуклеотидів, а другий ланцюг може містити сім-одинадцять, переважно вісім-десять, груп модифікованих нуклеотидів.

Перший ланцюг і другий ланцюг можуть бути пов'язані структурою петлі, яка може складатись з полімеру, що не є нуклеїновою кислотою, такого як, *inter alia*, поліетиленгліколь. Альтернативно, ця структура петлі може складатись з нуклеїнової кислоти.

Крім того, 5'-кінець першого ланцюга siRNA може бути пов'язаний з 3'-кінцем другого ланцюга або 3'-кінець першого ланцюга може бути пов'яза-

ний з 5'-кінцем другого ланцюга, причому вказаний зв'язок здійснюється через лінкер, який являє собою нуклеїнову кислоту, що звичайно має довжину 10-2000 нуклеосомов.

Конкретні описи siRNA даного винаходу

Даний винахід забезпечує сполуку, яка має структуру (структуру А):

5' (N)_x - Z 3' (антисмисловий ланцюг)

3'Z' - (Ne)_y 5' (смысловий ланцюг)

де кожний N і N' означає рибонуклеотид, який може бути модифікованим або немодифікованим в його цукровому залишку, а (N)_x і (N')_y означає олігомер, в якому кожний послідовний N або N' з'єднаний з наступним N або N' ковалентним зв'язком;

де кожний з x і y означає ціле число 19-40;

де кожний з Z і Z' може бути присутнім або бути відсутнім, але, якщо присутній, означає dTdT і є ковалентно приєднаним на 3'-кінці ланцюга, в якому він присутній; і

де послідовність (N)_x містить антисмыслову послідовність відносно кДНК гена RTP801.

Зокрема, даний винахід забезпечує вищезгадану сполуку, в якій послідовність (N)_x містить одну або декілька антисмыслових послідовностей, присутніх в таблицях А, В і С.

Зокрема, даний винахід забезпечує вищезгадану сполуку, де ковалентним зв'язком є фосфодієфірний зв'язок, де x=y, переважно x=y=19, де Z і Z' обидва відсутні, де щонайменше один рибонуклеотид є модифікованим в його цукровому залишку в положенні 2', де групою в положенні 2' є метокси (2'-О-метил), де рибонуклеотиди, які чергуються, є модифікованими як в антисмысловому, так і в смысловому ланцюгах і де рибонуклеотиди на 5'- і 3'-кінцях антисмысового ланцюга є модифікованими в їх цукрових залишках, а рибонуклеотиди на 5'- і 3'-кінцях смысового ланцюга є немодифікованими в їх цукрових залишках.

Зокрема, siRNA, що використовується в даному винаході, є олігорибонуклеотидом, де один ланцюг містить послідовні нуклеотиди, які мають, від 5' до 3', послідовність, представлену в SEQ ID NO:3-52 або в SEQ ID NO:103-174 або в SEQ ID NO:247-295 (які є смысловими ланцюгами), де множина основ можуть бути модифікованими, переважно 2'-О-метил-модифікацією, або її гомолог, де змінена основа в сегменті до 2 нуклеотидів в кожному кінцевому районі.

Крім того, даний винахід забезпечує спосіб лікування пацієнта, який страждає респіраторним порушенням, очною хворобою, мікросудинним порушенням або пошкодженням або захворюванням спинного мозку, що передбачає введення цьому пацієнту фармацевтичної композиції, яка містить сполуку вищезгаданої структури (А) (що має будь-які вищезазначені специфічні ознаки), в терапевтично ефективній кількості з тим, щоб таким чином лікувати пацієнта. Крім того, даний винахід забезпечує застосування терапевтично ефективної кількості вищезгаданої структури (А) (що має будь-які вищезазначені специфічні ознаки), для приготування лікарського засобу для стимуляції видужання пацієнта, який страждає респіраторним порушенням, очною хворобою, мікросудинним порушенням або пошкодженням або захворюванням спинного мозку.

Додатковий аспект даного винаходу забезпечує фармацевтичну композицію, яка містить сполуку вищезгаданої структури (А) для лікування будь-якого зі згаданих тут захворювань і станів.

Крім того, цей аспект забезпечує фармацевтичну композицію, яка містить дві або більше сполук вищезгаданої структури (А) для лікування будь-якого зі згаданих тут захворювань і станів, причому вказані дві сполуки можуть бути фізично змішані разом у фармацевтичній композиції в кількостях, які генерують однакову або корисну в іншому відношенні активність, або можуть бути ковалентно або нековалентно пов'язані або з'єднані разом ліпкером нуклеїнової кислоти з довжиною в діапазоні 2-100, переважно 2-50 або 2-30 нуклеотидів. Таким чином, такі молекули siRNA складаються з дволанцюгової структури нуклеїнової кислоти, описаної тут, причому дві послідовності siRNA, вибрані з таблиць А-С і переважно з таблиці А, SEQ ID NO:14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 і 50, є ковалентно або нековалентно пов'язаними або з'єднаними разом ліпкером з утворенням тандемної молекули siRNA. Такі тандемні молекули siRNA, що містять дві послідовності siRNA, будуть звичайно мати довжину з 38-150 нуклеотидів, більш переважно 38 або 40-60 нуклеотидів, і більшу довжину, якщо в цю тандемну молекулу включені більше ніж дві послідовності siRNA. Вважається, що такі тандемні молекули також є частиною даного винаходу, і додаткова інформація, що стосується їх, наведена нижче.

Вказані об'єднані або тандемні структури мають ту перевагу, що токсичність і/або дії кожної siRNA, що не стосуються націлювання, є мінімізованими, тоді як ефективність є збільшеною.

Зокрема, siRNA, які використовуються у Прикладах, були модифіковані таким чином, що 2'-О-Ме-група була присутньою на першому, третьому, п'ятому, сьомому, дев'ятому, одинадцятому, тринадцятому, п'ятнадцятому, сімнадцятому і дев'ятнадцятому нуклеотиді антисмысового ланцюга, причому та ж сама модифікація, тобто 2'-О-група, була присутньою на другому, четвертому, шостому, восьмому, десятому, дванадцятому, чотирнадцятому, шістнадцятому і вісімнадцятому нуклеотиді смысового ланцюга. Крім того, потрібно зазначити, що у випадку конкретних нуклеїнових кислот за даним винаходом перший сегмент є ідентичним першому ланцюгу, а другий сегмент є ідентичним другому ланцюгу, і ці нуклеїнові кислоти є також затупленими. siRNA була фосфорильованою, але очікується, що нефосфорильована версія може бути більш простою для одержання у великому масштабі, і було виявлено, що вказана нефосфорильована REDD14, названа REDD14NP, є точно такою ж біологічно активною, що і REDD14, в моделі CNV (див. Приклад 6). Послідовністю цієї siRNA, що використовується в експериментах у Прикладах 6-8, є послідовність REDD14, тобто послідовність, що має внутрішнє посилення № 14 (див. таблицю А).

Кінцевим районом цього олігонуклеотиду називають основи 1-4 і/або 16-19 в 19-мірних послідовностях (таблиці А і В нижче) і основи 1-4 і/або 18-21 в 21-мірних послідовностях (таблиця С нижче).

Додатково, siRNA, що використовуються в даному винаході, є олігорибонуклеотидами, причому один ланцюг містить послідовні нуклеотиди, які мають, від 5'-кінця до 3'-кінця, послідовність, представлену SEQ ID NO:53-102 або SEQ ID NO:175-246 або SEQ ID NO:296-344 (антисмыслові ланцюги), або її гомолог, в якому змінена основа в сегменті до 2 нуклеотидів в кожному кінцевому районі. Таким чином, в конкретних аспектах цей олігонуклеотид містить дволанцюгову структуру, причому така дволанцюгова структура містить перший ланцюг і другий ланцюг, причому перший ланцюг містить перший сегмент суміжних нуклеотидів, а другий ланцюг містить другий сегмент суміжних нуклеотидів, причому цей перший сегмент є або комплементарним, або ідентичним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує ген RTP801, причому другий сегмент є або ідентичним, або комплементарним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. Вказаний перший сегмент містить щонайменше 14 нуклеотидів, переважно щонайменше 18 нуклеотидів і навіть більш переважно 19 нуклеотидів або навіть щонайменше 21 нуклеотид. В одному варіанті здійснення цей перший сегмент містить приблизно 14-40 нуклеотидів, переважно приблизно 18-30 нуклеотидів, більш переважно приблизно 19-27 нуклеотидів і найбільш переважно приблизно 19 нуклеотидів - 23 нуклеотиди. В одному варіанті здійснення цей другий сегмент містить приблизно 14-40 нуклеотидів, переважно приблизно 18-30 нуклеотидів, більш переважно приблизно 19-27 нуклеотидів і найбільш переважно приблизно 19 нуклеотидів - 23 нуклеотиди. В одному варіанті здійснення перший нуклеотид першого сегмента відповідає нуклеотиду послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, внаслідок чого останній нуклеотид цього першого сегмента відповідає нуклеотиду послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. В одному варіанті здійснення перший сегмент містить послідовність щонайменше 14 суміжних нуклеотидів олігонуклеотиду, причому такий олігонуклеотид вибраний з групи, що складається з SEQ ID NO:3-344, переважно з групи, що містить олігонуклеотиди, які мають послідовність будь-якого з послідовних номерів 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 і 50 в таблиці А. Додаткові описи молекул siRNA, що використовуються в даному винаході, можуть забезпечувати олігорибонуклеотид, в якому динуклеотид dTdT ковалентно приєднаний до 3'-кінця і/або щонайменше в одному нуклеотиді цукровий залишок є модифікованим, можливо, модифікацією, що містить 2'-О-метилмодифікацію. Крім того, 2'-ОН-група може бути замінена групою або частиною молекули, вибраною з групи, що складається з -H, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂ і -F. Крім того, переважні сполуки даного винаходу, як описано вище, можуть бути фосфорильованими або нефосфорильованими.

Крім того, siRNA, що використовуються в даному винаході, можуть бути олігорибонуклеотидом, в якому в нуклеотидах, що чергуються, модифіковані цукри розташовані в обох ланцюгах. Конкретно, цей олігорибонуклеотид може містити

один зі смислових ланцюгів, в якій цукор є немодифікованим в 5'- і 3'-нуклеотидах, або один з антисмыслових ланцюгів, в якому цукор модифікований в кінцевих 5'- і 3'-нуклеотидах.

Крім того, додаткові нуклеїнові кислоти, які можуть бути використані в даному винаході, містять щонайменше 14 суміжних нуклеотидів будь-якої з SEQ ID NO:3-344, і більш переважно 14 суміжних пар нуклеотидних основ на будь-якому кінці дволанцюгової структури, що складається з першого сегмента і другого сегмента, як описано вище. Фахівцеві з кваліфікацією в даній галузі повинно бути зрозуміло, що за наявності потенційної довжини нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу і, зокрема, окремих сегментів, які утворюють таку нуклеїнову кислоту відповідно до даного винаходу, можливі деякі зміщення відносно кодуєчої послідовності гена RTP801, як показано в SEQ ID NO:1, в кожному сторону, причому такі зміщення можуть бути на 1, 2, 3, 4, 5 і 6 нуклеотидів в обох напрямках, причому генеровані таким чином дволанцюгові молекули нуклеїнових кислот будуть також знаходитись в рамках даного винаходу.

Додатковий аспект даного винаходу стосується функціональної нуклеїнової кислоти, що містить дволанцюгову структуру, де така дволанцюгова структура містить

перший ланцюг і другий ланцюг, причому перший ланцюг містить перший сегмент суміжних нуклеотидів, а другий ланцюг містить другий сегмент суміжних нуклеотидів, причому

цей перший сегмент є або комплементарним, або ідентичним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, а другий сегмент є або ідентичним, або комплементарним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801.

В одному варіанті здійснення ця нуклеїнова кислота негативно регулюється RTP801, причому ця негативна регуляція RTP801 вибрана з групи, що складається з негативною регуляції функції RTP801, негативною регуляції білка RTP801 і негативною регуляції експресії мРНК RTP801.

В одному варіанті здійснення перший сегмент містить щонайменше 14 нуклеотидів, переважно щонайменше 18 нуклеотидів і навіть більш переважно 19 нуклеотидів.

В одному варіанті здійснення перший сегмент містить приблизно 14-40 нуклеотидів, переважно приблизно 18-30 нуклеотидів, більш переважно приблизно 19-27 нуклеотидів і найбільш переважно приблизно 19 нуклеотидів - 23 нуклеотиди.

В одному варіанті здійснення другий сегмент містить приблизно 14-40 нуклеотидів, переважно приблизно 18-30 нуклеотидів, більш переважно приблизно 19-27 нуклеотидів і найбільш переважно приблизно 19 нуклеотидів - 23 нуклеотиди.

В одному варіанті здійснення перший нуклеотид першого сегмента відповідає нуклеотиду послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, причому останній нуклеотид першого сегмента відповідає нуклеотиду послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801.

В одному варіанті здійснення один сегмент містить послідовність з щонайменше 14 суміжних нуклеотидів послідовності нуклеїнової кислоти, причому така послідовність нуклеїнової кислоти

вибрана з послідовностей, описаних в таблицях А-С, переважно з групи, що містить SEQ ID NO:53, 66, 67, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 91, 92, 93, 94, 96, 101 і 102, більш переважно вибраних з групи, що містить SEQ ID NO:66, 75, 79, 91, 94, 101 і 102, і найбільш переважно вибраних з групи, що містить SEQ ID NO:66, 74, 75 і 79.

В одному варіанті здійснення інший сегмент містить послідовність з щонайменше 14 суміжних нуклеотидів послідовності нуклеїнової кислоти, причому така послідовність нуклеїнової кислоти вибрана з послідовностей, описаних в таблицях А-С, переважно з групи, що містить SEQ ID NO:3, 16, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 51 і 52, більш переважно вибрана з групи, що містить SEQ ID NO:16, 24, 25, 29, 41, 44, 51 і 52, і найбільш переважно вибрана з групи, що містить SEQ ID NO:16, 24, 25 і 29.

В одному варіанті здійснення

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:53, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:3:

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:66, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:16;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:67, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:17:

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:72, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:22;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:73, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:23;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:74, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:24;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:75, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:25;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:76, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:26:

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:77, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:27;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:79, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:29;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:91, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:41;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:92, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:42;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:93, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:43:

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:94, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:44;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:95, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:45;

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:96, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:46:

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:101, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:51:

перший сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:102, а другий сегмент має послідовність згідно з SEQ ID NO:52.

В одному варіанті здійснення перший сегмент має послідовність нуклеїнової кислоти, яка вибрана з групи, що містить SEQ ID NO:53, 66, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 101 і 102.

Повинно бути зрозуміло, що, хоча терміни «перший» і «другий» сегмент використовуються разом з нуклеїновими кислотами даного винаходу, вони використовуються тільки для зручності, і будь-яка молекула нуклеїнової кислоти цього винаходу, яка описана як така, що має перший сегмент з послідовністю X і другий сегмент з послідовністю Y, могла б бути також описана як така, що має перший сегмент з послідовністю Y і другий сегмент з послідовністю X, поки є ясным, що один сегмент міститься в антисмисловому ланцюгу, який повинен бути антисмисловим відносно частини кодуючої послідовності гена RTP801, а інший сегмент міститься в смисловому ланцюгу, який повинен бути компліментарним (хоча і не на 100% комплементарним) антисмисловому ланцюгу, відповідно до визначень і описів, представлених тут.

В одному варіанті здійснення перший і/або другий ланцюг містить щонайменше виступ з одного нуклеотиду на 3'-кінці, який є комплементарним або ідентичним відповідному нуклеотиду послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801.

В одному варіанті здійснення перший і/або другий ланцюг містить виступ з 1-15 нуклеотидів на 3'-кінці, переважно перший і/або другий ланцюг містить виступ з 1-10 нуклеотидів на 3'-кінці, більш переважно перший і/або другий ланцюг містить виступ з 1-5 нуклеотидів на 3'-кінці, і найбільш переважно перший і/або другий ланцюг містить виступ з 1-2 нуклеотидів на 3'-кінці.

В одному варіанті здійснення перший і/або другий ланцюг містить щонайменше виступ з одного нуклеотиду, який відрізняється від відповідного нуклеотиду послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801.

В одному варіанті здійснення перший ланцюг містить виступ з двох нуклеотидів, які відрізняються від відповідного нуклеотиду послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801.

В одному варіанті здійснення перший ланцюг складається тільки з першого сегмента.

В одному варіанті здійснення другий ланцюг складається тільки з другого сегмента.

В одному варіанті здійснення перший сегмент і/або перший ланцюг містить рибонуклеотиди.

В одному варіанті здійснення другий сегмент і/або другий ланцюг містить рибонуклеотиди.

В одному варіанті здійснення перший сегмент і/або другий ланцюг складаються з рибонуклеотидів.

В одному варіанті здійснення деякі або все ці нуклеотиди є модифікованими.

В переважному варіанті здійснення така модифікація стосується нуклеосооснови нуклеотиду, цукрової частини нуклеотиду і/або фосфатної частини нуклеотиду.

У більш переважному варіанті здійснення цією модифікацією є модифікація цукрової частини, і ця модифікація знаходиться в положенні 2', причому 2'-ОН-група замінена групою або частиною молекули, вибраною з групи, що містить -H, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -OCH₂CH₂CH₃, -NH₂ і -F.

В одному варіанті здійснення цією модифікацією є модифікація нуклеосооснови, або модифікована нуклеосооснова вибрана з групи що містить інозин, ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метил-, 2-пропіл- та інші алкіладеніни, 5-галогенурацил, 5-галогенцитозин, 5-галогеназацитозин, 6-азацитозин, 6-азатимін, псевдоурацил, 4-тіоурацил, 8-галогенаденін, 8-аміноаденін, 8-тіоладенін, 8-тіоалкіладеніни, 8-гідроксиладенін та інші 8-заміщені аденіни, 8-галогенгуаніни, 8-аміногуаніни, 8-тіолгуанін, 8-тіоалкілгуанін, 8-гідроксилгуанін та інші заміщені гуаніни, інші аза- і деазааденіни, інші аза- і деазагуаніни, 5-трифторметилурацил і 5-трифторцитозин.

В одному варіанті здійснення цією модифікацією є модифікація фосфатної частини молекули, причому модифікована фосфатна частина вибрана з групи, що містить фосфотіоат.

В одному варіанті здійснення перший сегмент і/або другий сегмент містить множину груп модифікованих нуклеотидів, що мають модифікацію в положенні 2', причому в цьому сегменті кожна група модифікованих нуклеотидів фланкована на одній або на обох сторонах фланкуючою групою нуклеотидів, причому ці фланкуючі нуклеотиди, які утворюють фланкуючу групу нуклеотидів, є або немодифікованими нуклеотидами, або нуклеотидами, що мають модифікацію, яка відрізняється від модифікації модифікованих нуклеотидів.

У переважному варіанті здійснення перший сегмент і/або другий сегмент складається з рибонуклеотидів.

У більш переважному варіанті здійснення перший сегмент і другий сегмент містять множину груп модифікованих нуклеотидів.

В одному варіанті здійснення перший сегмент містить вказану множину груп модифікованих нуклеотидів.

В одному варіанті здійснення другий сегмент містить вказану множину груп модифікованих нуклеотидів.

В одному варіанті здійснення кожна група модифікованих нуклеотидів і/або кожна група фланкуючих нуклеотидів містить деяку кількість нуклеотидів, причому ця кількість нуклеотидів вибрана з групи, що містить 1 нуклеотид - 10 нуклеотидів.

В одному варіанті здійснення перший сегмент містить перший розподіл модифікованих нуклеотидів, а другий сегмент містить другий розподіл модифікованих нуклеотидів.

В одному варіанті здійснення перший розподіл є тим же самим розподілом, що і другий розподіл.

В іншому варіанті здійснення перший розподіл зіставляється з другим розподілом.

У переважному варіанті здійснення перший розподіл зміщений на один або декілька нуклеотидів відносно другого розподілу.

В одному варіанті здійснення кожна з груп модифікованих нуклеотидів складається з одного модифікованого нуклеотиду і кожна з груп фланкуючих нуклеотидів складається з одного немодифікованого нуклеотиду, що має модифікацію, яка відрізняється від модифікації модифікованих нуклеотидів.

У переважному варіанті здійснення модифікований нуклеотид має групу OMe в положенні 2'.

У переважному варіанті здійснення фланкуючим нуклеотидом є рибонуклеотид, який має 2'-ОН-групу.

В одному варіанті здійснення перший сегмент починається з модифікованого нуклеотиду на 5'-кінці і кожний інший нуклеотид цього сегмента є також модифікованим нуклеотидом, тоді як другий нуклеотид від 5'-кінця і кожний інший нуклеотид є немодифікованим нуклеотидом або нуклеотидом, що має модифікацію, яка відрізняється від модифікації цього модифікованого нуклеотиду (модифікованих нуклеотидів).

В одному варіанті здійснення перший сегмент знаходиться в антисмисловій орієнтації відносно послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801.

Додатковий аспект даного винаходу стосується фармацевтичної композиції, яка містить нуклеїнову кислоту відповідно до першого аспекту даного винаходу і/або вектор згідно з другим аспектом даного винаходу і переважно фармацевтично прийнятний носій; причому вказана композиція призначена необов'язково для системного або місцевого застосування.

В одному варіанті здійснення ця композиція призначена для лікування захворювання, причому це захворювання вибране з групи, що містить пухлинні захворювання.

У додатковому аспекті проблема, яка лежить в основі даного винаходу, вирішується з використанням способу профілактики і/або лікування пацієнта, потребуючого такого попередження і/або лікування, що передбачає введення нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу і/або вектора відповідно до даного винаходу і/або композиції відповідно до даного винаходу.

У додатковому варіанті здійснення нуклеїнову кислоту відповідно до даного винаходу і/або вектор відповідно до даного винаходу використовують для приготування лікарського засобу. Цей лікарський засіб може бути призначений для профілактики і/або лікування захворювання, причому таке захворювання вибране з групи, що містить пухлинні захворювання. Це пухлинне захворювання може бути вибране з групи, що містить солідні пухлини, метастатичні пухлини, в тому числі PTEN-негативні пухлини, пухлини, які є стійкими до лікарських засобів, і пухлини, в яких інгібування RTP801 може бути використано для сенситивізації. Крім того, цим пухлинним захворюванням може бути пухлинне захворювання останньої стадії або це пухлинне захворювання може включати клітини, які є нечутливими до пухлинного супресора; вказаним пухлинним супресором може бути PTEN.

Додатковий аспект даного винаходу вирішується способом конструювання нуклеїнової кислоти або скринінгу на нуклеїнову кислоту, яка придатна для негативної регуляції RTP801, що передбачає наступні стадії:

а) конструювання або скринінг нуклеїнової кислоти, яка придатна для негативної регуляції RTP801;

б) оцінку дефекту нуклеїнової кислоти відповідно до будь-якого з вищезгаданих аспектів даного винаходу;

с) порівняння дії нуклеїнової кислоти стадії а) з дією нуклеїнової кислоти стадії б).

В одному варіанті здійснення цієї дії є негативна регуляція RTP801.

Додатковим аспектом даного винаходу є застосування нуклеїнової кислоти за даним винаходом як сенсibilізатора, зокрема, як сенсibilізатора у лікуванні захворювання, причому таке захворювання вибрано з групи, що містить пухлину і, більш конкретно, пухлини, які є резистентними до лікування з використанням хіміотерапевтичних і/або радіотерапевтичних засобів. Додаткові захворювання, для яких нуклеїнова кислота даного винаходу може служити як сенсibilізатор, описані тут.

Дана заявка описує, що нуклеїнова кислота, яка містить дволанцюгову структуру, яка є специфічною у відношенні RTP801, є відповідним засобом інгібування ангіогенезу/зростання судинної сітки і підтікання судин (як з існуючої кровоносної сітки, так та зі зростаючої судинної сітки). Крім того, ця заявка описує (без зв'язування теорією), що RTP801, будучи індукованим стресом білком (індукованим гіпоксією, окислювальним стресом, тепловим стресом, ER-стресом), є фактором, який діє в тонкій настройці реакції клітини на порушення балансу енергії. Таким чином, інгібування RTP801 такою дволанцюговою нуклеїновою кислотою є придатним для лікування будь-якого захворювання, в якому клітини повинні бути врятовані від апоптозу внаслідок стресових умов (наприклад, захворювань, що супроводжуються загибеллю нормальних клітин) або в якому клітини, адаптовані до стресових станів внаслідок змін в експресії RTP801, повинні вбиватись (наприклад, пухлинні клітини). В останньому випадку, після інгібування RTP801 такою дволанцюговою нуклеїновою кислотою фактор виживання з антиапоптотичною функцією в гіпоксічних клітинах, більш конкретно, в гіпоксічних ракових клітинах, стає неефективним, дозволяючи, отже, клітинам, позбавленим RTP801-опосередкованого захисту, перейти в апоптоз. Це може зустрічатись також, коли присутні інші стимулюючі апоптоз фактори. Такі інші стимулюючі апоптоз фактори включають, серед інших, хіміотерапію і променеву терапію. Іншими словами, дволанцюгова нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу може бути ефективною у лікуванні раку (як монотерапія), а також як додаткова терапія.

Така дволанцюгова структура містить перший ланцюг і другий ланцюг, причому перший ланцюг містить перший сегмент суміжних нуклеотидів, а другий ланцюг містить другий сегмент суміжних нуклеотидів, причому цей перший сегмент є або

комплементарним, або ідентичним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує ген RTP801, причому другий сегмент є або ідентичним, або комплементарним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. Таким чином, з використанням, зокрема, RTP801 як мішені для такого типу дволанцюгової нуклеїнової кислоти можна також безпосередньо діяти на мішень в каскаді, що бере участь у зростанні і розвитку судинної сітки і ангіогенезі, відповідно, і, отже, відмінним шляхом у порівнянні з шляхом, що використовується інгібіторами VEGF, такими як антитіла до VEGF. Не бажаючи зв'язувати себе теорією, автори даного винаходу передбачають, що нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу може проявляти свою функцію в клітинах, які забезпечують фон, який бере участь або спостерігається у зв'язку з будь-яким захворюванням, при якому має місце небезпечний, зокрема, індукований гіпоксією ангіогенез і/або зростання або розвиток судинної сітки. Це розуміння підтверджується виявленням того, що миші з нокаутом RTP801 не виявляють ніякого фенотипу, який відрізняється від фенотипу мишей дикого типу, при негіпоксічних станах. Тільки після індукції гіпоксії, як спостерігалось в патологічному стані, такому як, наприклад, пухлинне зростання, нокаут RTP801 приводить до патології, схожої з патологією, що спостерігається у людей, які страждають від цього типу захворювання.

Повинно бути зрозуміло, що нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу є переважно функціональною нуклеїновою кислотою. В даному контексті, термін функціональна нуклеїнова кислота переважно означає нуклеїнову кислоту, функція якої відрізняється від функції бути активною в клітині як матриця для транскрипції будь-якої гетерогенної ядерної РНК (гяРНК), мРНК або іншого продукту транскрипції, причому або вказана гяРНК, мРНК або будь-який інший продукт транскрипції, відповідно, або нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу піддається процесу трансляції, переважно клітинному процесу трансляції, що приводить до біологічно активного білка RTP801. Повинно бути зрозуміло, що функціональна кислота, як та, що переважно використовується тут, здатна зменшувати експресію нуклеїнової кислоти-мішені. Більш конкретно, таке зменшення основане на посттранскрипційному процесі сайленсінгу гена нуклеїнової кислоти-мішені. Ще більш переважно, таке зменшення основане на інтерференції РНК. Найбільш переважною формою функціональної нуклеїнової кислоти є молекула siRNA або будь-яка інша молекула, що має ту ж саму дію, що і молекула siRNA. Така додаткова молекула вибрана з групи, що містить siRNA, синтетичні siRNA, shRNA і синтетичні shRNA. В даному контексті, siRNA можуть додатково містити одержані з експресуючого вектора siRNA, причому цим експресуючим вектором є в переважному варіанті здійснення вірус, такий як аденовірус, аденоасоційовані віруси, герпесвірус і лентівіруси. В даному контексті, shRNA переважно означають «шпилькові» РНК (які утворюють петлю РНК). Такі shRNA можуть бути одержані синтетично або генеровані з використанням систем експресії, що кодуються вектором, переважно з використанням промоторів

РНК-полімерази III. У зв'язку з цим повинно бути зрозуміло, що функціональна нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу направлена на білок RTP801, який також переважно називають тут мішенню, а нуклеїнову кислоту, що кодує вказану мішень, називають нуклеїновою кислотою-мішенню.

У переважному використанні тут, дволанцюгова структура нуклеїнової кислоти за даним винаходом містить будь-яку дволанцюгову структуру, причому така дволанцюгова структура переважно генерована першим сегментом і другим сегментом, що забезпечується нуклеїновою кислотою, яка має цю базову конструкцію. Ця дволанцюгова структура може містити одне або декілька помилкових спарювань. Така дволанцюгова структура утворена спарюванням основ за правилами спарювання Уотсона-Крика і/або спарюванням основ по Хугстину і/або з використанням схожих механізмів спарювання основ. На основі базової конструкції нуклеїнової кислоти даного винаходу переважним є те, що один сегмент знаходиться в антисмисловій орієнтації відносно послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801 або його частину, тоді як інший сегмент знаходиться у смисловій орієнтації відносно послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801 або його частину. Внаслідок цього один сегмент є комплементарним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801 або його частину, а інший сегмент є ідентичним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801 або його частину. У зв'язку з цим, повинно бути зрозуміло, що термін ідентичний, звичайно, означає «частково ідентичний», причому ця ідентичність, виражена у вигляді гомології, дорівнює щонайменше 80%, переважно 90%, більш переважно 95%, 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. Подібно визначенню ідентичності, комплементарність може бути визначена у вигляді гомології, причому така гомологія знаходиться в тому ж самому діапазоні, що й ідентичність, якщо комплементарний ланцюг міг би трансклюватись в ідентичний ланцюг відповідно до правил спарювання основ Уотсона-Крика. В альтернативному варіанті здійснення, один сегмент є ідентичним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801 або його частину, а інший сегмент є комплементарним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801 або його частину.

У переважному варіанті здійснення, нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу негативно регулює функцію RTP801. Негативна регуляція функції RTP801 переважно здійснюється зменшенням рівня експресії на рівні білка і/або рівні мРНК, причому такий зменшений рівень експресії, переважно на рівні білка, може бути таким малим, як 5%, і бути таким високим, як 100%, відносно експресії в умовах, в яких нуклеїнова кислота даного винаходу не вводиться або не є функціонально активною. Такі умови є переважно умовами системи експресії або умовами, присутніми в системі експресії, переважно системи експресії RTP801. Така система експресії є переважно системою трансляції, яка може бути системою трансляції *in vitro*, більш переважно системою трансляції клітини, органу і/або організму. Більш пе-

реважно, цей організм є багатоклітинним організмом, більш переважно ссавцем, причому такий ссавець переважно вибраний з групи, що містить людину, мавпу, мишу, щура, морську свинку, кролика, кішку, собаку, вівцю, корову, коня, велику рогату худобу і свиню. У зв'язку з негативною регуляцією повинно бути зрозуміло, що вказана негативна регуляція може бути функцією часу, тобто дія негативною регуляції не обов'язково спостерігається відразу ж після введення або функціональної активації нуклеїнових кислот даного винаходу, але може бути відстрочена у часі, а також рознесена в просторі, тобто може спостерігатись в різних клітинах, тканинах і/або органах. Така відстрочка може бути в діапазоні 5%-100%, переважно 10%-50%. Фахівцям з кваліфікацією в даній галузі повинно бути зрозуміло, що зменшення 5% протягом більш тривалого періоду часу може бути таким же ефективним, що і зменшення 100% протягом більш короткого періоду часу. Фахівцям з кваліфікацією в даній галузі повинно бути також зрозуміло, що така відстрочка в сильній мірі залежить від конкретної функціональної нуклеїнової кислоти, що фактично використовується, а також від популяції клітин-мішеней і, отже, зрештою, від захворювання, яке повинно лікуватись і/або запобігатись відповідно до технічної ідеї даної заявки. Таким чином, зменшення 5% протягом більш тривалого періоду часу може бути таким же ефективним, що і зменшення 100% протягом більш короткого періоду часу. Фахівцям з кваліфікацією в даній галузі повинно бути також зрозуміло, що ця відстрочка може мати місце на будь-якому описаному вище рівні, тобто відстрочка в функції, причому такою функцією є будь-яка функція, що проявляється RTP801, відстрочка експресії білка або відстрочка рівня експресії мРНК.

У переважному варіанті здійснення перший сегмент містить щонайменше 14 нуклеотидів, переважно 14 суміжних нуклеотидів. Фахівцям з кваліфікацією в даній галузі буде зрозуміло, що перший сегмент повинен мати довжину, яка придатна для створення можливості напряду специфічно на послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, і, більш конкретно, специфічно на нуклеїнову кислоту, що кодує RTP801, присутню в системі трансляції, в якій повинна бути зменшена експресія RTP801. Знову, не бажаючи бути пов'язаними якою-небудь теорією, автори вважають, що є взаємодія між нуклеїновою кислотою за даним винаходом і послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, переважно на рівні транскрипту, тобто після генерування мРНК з відповідної послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. Внаслідок імовірності того, що будь-яка послідовність нуклеїнової кислоти за даним винаходом є ідентичною з послідовністю або комплементарною послідовністю, що міститься в геномі або транскриптомі системи трансляції, довжина першого сегмента повинна бути, отже, такою довгою, щоб гарантувати те, що при допущенні, що дійсно має місце деякий тип спарювання основ між нуклеїновою кислотою, яка кодує RTP801, і одним з ланцюгів нуклеїнової кислоти за даним винаходом, тільки послідовність, що кодує RTP801, але не інша кодуєча послідовність, переважно не інша

суттєва кодуєча послідовність, геному або транскриптому, прямує для такого спарювання основ або таким спарюванням основ. За допомогою цієї довжини може зменшуватись і переважно елімінуватись виникнення ефектів, які не мають відношення до мішені. Для збільшення суворості цього типу специфічного напрямку на RTP801 і на кодуєчу його нуклеїнову кислоту перший сегмент переважно має довжину щонайменше 18 або 19 нуклеотидів. Верхня межа для довжини першого сегмента дорівнює переважно менше ніж 50 нуклеотидів, однак ця довжина може бути значно більшою і може містити 100, 200 або навіть 500 нуклеотидів або бути будь-якої довжини між ними. Крім цього, фахівець з кваліфікацією в даній галузі вважатиме за краще мати швидше короткий перший сегмент, особливо у випадку, коли нуклеїнова кислота за даним винаходом хімічно синтезована, оскільки, чим коротше ця послідовність, тим менше часу і матеріалу буде вимагати її синтез і тим менше буде міра вбудовування неправильних нуклеотидів у відповідну послідовність. Іншим фактором, який повинен враховуватись у зв'язку з фіксуванням довжини першого сегмента, є той факт, що, звичайно при довжині вище 50 або більше нуклеотидів, може спостерігатись неспецифічна інтерференова реакція. Чи переноситься цей тип неспецифічної інтерференової реакції пацієнтом або не переноситься, залежить від конкретного стану, що підлягає лікуванню. Наприклад, інтерференова реакція могла б переноситись, якби ця інтерференова реакція і/або експресія генів інтерферонів могла бути обмежена патогенними клітинами.

У зв'язку з цим, більш переважними довжинами першого сегмента є довжини приблизно 14-40 нуклеотидів, 18-30 нуклеотидів, 19-27 нуклеотидів, 21-25 нуклеотидів і 19 нуклеотидів - 23 нуклеотиди.

Ті ж самі розгляди, що і описані вище для першого сегмента, застосовні до другого сегмента, який може, отже, мати будь-яку довжину, як описано тут у зв'язку з першим сегментом. Крім того, згідно з даним винаходом, довжина першого сегмента відрізняється від довжини другого сегмента, однак переважно обидва сегменти мають одну і ту ж довжину.

Згідно з базовою конструкцією цієї нуклеїнової кислоти, перший сегмент і другий сегмент є частинами першого ланцюга і другого ланцюга, відповідно, нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу. Буде зрозуміло, що на будь-якому кінці, тобто на 5'-кінці, а також на 3'-кінці перший і/або другий сегмент може містити один або декілька нуклеотидів, переважно додаткових нуклеотидів, в будь-якій комбінації.

У зв'язку з цим повинно бути зрозумілим, що нуклеотиди окремого ланцюга, які слідує за кінцем (за кінцями) сегмента, відповідного відповідному ланцюгу, можуть бути використані для додаткового сприяння комплементарності та ідентичності, відповідно, цього сегмента і, отже, специфічному направленню на послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801.

Буде зрозуміло, що, по суті, на основі забезпеченої тут технічної ідеї, нуклеїнова кислота за даним винаходом може бути направлена на будь-

яку частину послідовності нуклеїнової кислоти, яка кодує RTP801, що переважно кодує RTP801 в системі трансляції, в якій повинна бути зменшена експресія RTP801. Таким чином, даний винахід містить будь-яку нуклеїнову кислоту, що має характеристики, визначені тут, причому комплементарні та ідентичні ланцюги і сегменти нуклеїнової кислоти за даним винаходом можуть по суті починатись з будь-якого нуклеотиду послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. Таким чином, за умови, що перший сегмент нуклеїнової кислоти за даним винаходом є комплементарним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, тобто є її антисмисловим ланцюгом або знаходиться в антисмисловій орієнтації до неї, перший нуклеотид вказаного сегмента, тобто найбільш 5'-кінцевий нуклеотид, відповідає, тобто зіставляється з останнім нуклеотидом послідовності, що кодує RTP801, на 3'-кінці. У наступному варіанті здійснення такий найбільш 5'-кінцевий нуклеотид відповідає передостанньому нуклеотиду нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, і т.д., поки не досягається останнє положення, яке, за умови цієї довжини антисмислового сегмента, все ще дозволяє цьому антисмислового ланцюгу нуклеїнової кислоти за даним винаходом бути комплементарним послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. Таким чином, в рамках даного винаходу знаходиться будь-яка нуклеїнова кислота за даним винаходом, яка могла б бути генерована скануванням послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, починаючи від найбільш 5'-кінцевого нуклеотиду, і накладенням на базову конструкцію нуклеїнової кислоти за даним винаходом і виявленням характеристик для такої нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу. Ті ж самі розгляди застосовні до описаних тут варіантів здійснення, де комплементарність та ідентичність нуклеїнової кислоти за даним винаходом забезпечується не тільки першим сегментом і другим сегментом, відповідно, але така комплементарність та ідентичність включає також один або декілька нуклеотидів за межами першого сегмента і другого сегмента, відповідно, що є частиною першого ланцюга і другого ланцюга, відповідно.

З різних нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу, описаних тут, особливо переважними є нуклеїнові кислоти з внутрішніми посилювальними номерами 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 і 50 (див. Таблицю А). У зв'язку з цим, потрібно зазначити, що нуклеїнові кислоти за даним винаходом, які можуть бути використані як в людині, так і в моделі тварини, такий як щур і/або миша, є особливо переважними. Несподівана перевага цих конкретних нуклеїнових кислот за даним винаходом основана на тому факті, що вони є ефективними як в людині, так і в моделі тварини, що означає, що тест-результати, одержані в моделі тварини, можуть бути безпосередньо перенесені з моделі тварини на людину і, більш конкретно, без необхідності здійснювати які-небудь зміни відносно послідовності людини, які в іншому випадку стають необхідними у випадку, коли нуклеїнову кислоту даного винаходу конструювали таким чином, щоб вона містила (а) послідовність (послідовності), яка відрізняється (які відрізняються) між

видами, більш конкретно, видами, що використовуються для тестування моделі тварини і людини як кінцеві переважні організми або пацієнт. Крім того, переважно, щоб ці нуклеїнові кислоти мали розподіл модифікацій, описаний також у прикладах.

Однак в рамках даного винаходу знаходиться також будь-яка з послідовностей, відповідних SEQ ID NO:3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96 і 101-102, і відповідні комбінації, що приводять до молекул нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу, які мають внутрішні посилені номери 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 і 50, тільки частково містяться в додатковій нуклеїновій кислоті відповідно до даного винаходу. Переважно, додаткові нуклеїнові кислоти за даним винаходом містять щонайменше 14 суміжних нуклеотидів SEQ ID NO:3, 16-17, 22-27, 29, 41-46, 51-53, 66-67, 72-77, 79, 91-96 і 101-102, і більш переважно 14 суміжних пар нуклеотидних основ на будь-якому кінці дволанцюгової структури, що складається з першого сегмента і другого сегмента, описаного в попередній таблиці. Фахівцям з кваліфікацією в даній галузі буде зрозуміло, що за умови потенційної довжини нуклеїнової кислоти за даним винаходом і, зокрема, окремих сегментів, які утворюють таку нуклеїнову кислоту, за даним винаходом, можливі деякі зміщення відносно кодуєчої послідовності RTP801 в кожен сторону, причому такі зміщення можуть бути зміщеннями на 1, 2, 3, 4, 5 і 6 нуклеотидів в обох напрямках, причому генеровані таким чином дволанцюгові молекули нуклеїнових кислот будуть також знаходитись в рамках даного винаходу.

У переважному варіанті здійснення даного винаходу перший сегмент і перший ланцюг мають одну і ту ж довжину. Подібним чином, переважно другий ланцюг має ту ж саму довжину, що і другий сегмент, причому навіть більш переважно перший сегмент і другий сегмент мають однакову довжину. У ще більш переважному варіанті здійснення перший ланцюг містить тільки перший сегмент і другий ланцюг містить тільки другий сегмент. У навіть більш переважному варіанті здійснення ані перший сегмент і, отже, перший ланцюг, ані другий сегмент і, отже, другий ланцюг, не містять виступу. Іншими словами, в рамках даного винаходу знаходиться також те, що дволанцюгові нуклеїнові кислоти за даним винаходом є затупленими на кінцях, переважно на кожному кінці дволанцюгової структури нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу. Така затуплена на кінцях структура може бути здійснена у зв'язку з будь-якими іншими варіантами нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу, зокрема, варіантами, в яких нуклеїнові кислоти за даним винаходом мають розподіл модифікацій, більш переважний розподіл модифікацій, описаний тут.

У наступному аспекті, нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу має, отже, базову конструкцію, яка забезпечує тупі кінці на обох сторонах дволанцюгової структури нуклеїнової кислоти даного винаходу. Однак в рамках даного винаходу є також те, що є виступ, тобто сегмент з одного або декількох нуклеотидів, виступаючий з цієї дволанцюгової структури. Цей виступ може

знаходитись, в принципі, на 5'-кінці антисмислового ланцюга, на 3'-кінці антисмислового ланцюга, на 5'-кінці смислового ланцюга і/або на 3'-кінці смислового ланцюга. Потрібно зазначити, що здійснення будь-якої з вказаних можливостей, а також будь-якої їх комбінації знаходиться в рамках даного винаходу. Більш переважно є комбінація, причому цей виступ розташований на 3'-кінці антисмислового ланцюга і на 3' кінці смислового ланцюга. У рамках даного винаходу знаходиться також те, що цей виступ знаходиться на 5'-кінці антисмислового ланцюга і на 5'-кінці смислового ланцюга. Крім того, в рамках даного винаходу знаходиться також те, що цей виступ розташований тільки на антисмисловому ланцюгу дволанцюгової структури, більш переважно на 3'-кінці антисмислового ланцюга дволанцюгової структури.

У зв'язку з цими виступами потрібно зазначити, що виступ плюс сегмент переважно утворюють ланцюг, і довжини, забезпечені для цих сегментів тут, застосовні також до цих варіантів здійснення. Однак окремий виступ може містити так багато, як 10 нуклеотидів, і переважно має довжину два нуклеотиди. У рамках даного винаходу знаходиться також те, що відповідний нуклеотид (відповідні нуклеотиди), який утворює виступ (які утворюють виступи), є (є) також комплементарним (комплементарними) послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, у випадку, коли перший ланцюг є комплементарним вказаній послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, і цей виступ знаходиться на 3'- або 5'-кінці антисмислового ланцюга, або те, що виступ (виступи) є (є) ідентичним (ідентичними) послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, у випадку, коли перший ланцюг є ідентичним вказаній послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. Це стосується будь-якого виступу, розташованого на другому сегменті базової конструкції нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу, причому повинно бути зрозуміло, що конструкція виступу на другому сегменті може бути незалежною від конструкції виступу першого сегмента.

У рамках даного винаходу знаходиться також те, що нуклеотиди, які утворюють виступ, не є ані комплементарними, ані ідентичними відповідним нуклеотидам послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. В даному контексті і переважно в цьому варіанті здійснення, «відповідні» означає відповідні нуклеотиди, які слідує на 5'-кінці і/або 3'-кінці сегмента, що має нуклеотидну копію на нуклеїновій кислоті, що кодує RTP801.

Переважно, перший ланцюг містить на її 3'-кінці два нуклеотиди, переважно дезоксинуклеотиди, і більш переважно два ТТ і/або цей тип нуклеотидів також на 3'-кінці другого ланцюга, причому більш переважно довжина першого сегмента і другого сегмента дорівнює 19 нуклеотидам. Таким чином, ці ланцюги складаються з сегмента і виступу. У цьому варіанті здійснення дволанцюгова структура складається з 19 пар основ і виступу з двох нуклеотидів на кожному 3'-кінці окремого сегмента.

У переважному варіанті здійснення перший сегмент і/або перший ланцюг містять рибонуклеотиди, причому особливо переважно, перший сегмент

складається весь з рибонуклеотидів. Те ж саме застосовне до другого сегмента і до другого ланцюга, відповідно. Однак, у зв'язку з цим кожний і будь-який з нуклеотидів першого сегмента і другого сегмента, відповідно, є модифікованим в переважному варіанті здійснення. Те ж саме застосовне до першого ланцюга і другого ланцюга, відповідно. Зокрема, кінцеві нуклеотиди, незалежно від того, чи є вони рибонуклеотидами або дезоксирибонуклеотидами, можуть мати ОН-групу, яка сама може бути модифікована. Така ОН-група може походити або з цукрової частини нуклеотиду, більш переважно з 5'-положення у випадку 5'-ОН-групи і/або 3'-положення у випадку 3'-ОН-групи, або з фосфатної групи, приєднаної до цієї цукрової частини відповідного кінцевого нуклеотиду. Фосфатна група може бути, в принципі, приєднана до ОН-групи цукрової частини цього нуклеотиду. Переважно, фосфатна група приєднана до 5'-ОН-групи цукрової частини у випадку вільної 5'-ОН-групи і/або до 3'-ОН-групи цукрової частини у випадку вільної 3'-ОН-групи, все ще із забезпеченням того, що називається тут вільною 5'- або 3'-групою.

У контексті будь-якої стратегії для конструювання siRNA або будь-якого варіанту siRNA, описаного тут, термін кінцева модифікація означає хімічну частинку, додану до найбільш 5'- або 3'-кінцевого нуклеотиду першого і/або другого ланцюга. Приклади таких кінцевих модифікацій включають, але не обмежуються ними, 3'- або 5'-фосфатом, інвертовані (дезоксид) нуклеотиди, які не містять нуклеоснов, аміно, фтор, хлор, бром, CN, CF, метокси, імідазол, карбоксилат, тіоат, нижчий C₁-C₆ алкіл, заміщений нижчий алкіл, алкаріл або аралкіл, OCF₃, OCN, O-, S- або N-алкіл; O-, S- або N-алкеніл; SO₂CH₃; SO₂CH₃; ONO₂; NO₂,

N₃; гетероциклоалкіл; гетероциклоалкаріл; аміно-алкіламіно; поліалкіламіно або заміщений силіл, описані, серед інших, в Європейських патентах EP 0586520 B1 або EP 0618925 B1.

У даному контексті алкіл або будь-який термін, що містить «алкіл», переважно означає будь-який ланцюг атомів вуглецю, який містить 1-12, переважно 1-6 або більше, переважно 1-2 атоми вуглецю.

Додатковою кінцевою модифікацією є група біотину. Така група біотину може бути переважно приєднана або до найбільш 5' (лівого), або до або найбільш 3' (правого) нуклеотиду першого і/або другого ланцюга або до обох кінців. У більш переважному варіанті здійснення група біотину пов'язана з поліпептидом або білком. В обсязі даного винаходу знаходиться те, що цей поліпептид або білок приєднаний через будь-яку з інших вищезгаданих кінцевих модифікацій. Цей поліпептид або білок може надавати додаткові характеристики молекулам нуклеїнових кислот даного винаходу. Серед інших властивостей, цей поліпептид або білок може діяти як ліганд для іншої молекули. Якщо вказаною іншою молекулою є рецептор, функція і активність рецептора можуть бути активовані за допомогою зв'язування ліганду. Цей рецептор може виявляти активність інтерналізації, яка робить можливою трансфекцію ліганд-пов'язаних молекул нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу. Прикладом ліганду для зв'язування з молекулою нуклеїнової кислоти даного винаходу є VEGF, а відповідним рецептором є рецептор VEGF.

Різні можливі варіанти siRNA даного винаходу, що мають різні типи кінцевої модифікації (кінцевих модифікацій), представлені в наступній таблиці 1.

Таблиця 1

Різні варіанти інтерферуючої рибонуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу

| | | 1-ий ланцюг/1-ий сегмент | 2-ий ланцюг/2-ий сегмент |
|----|-----------|--------------------------|--------------------------|
| 1) | 5'-кінець | вільний ОН | вільний ОН |
| | 3'-кінець | вільний ОН | вільний ОН |
| 2) | 5'-кінець | вільний ОН | вільний ОН |
| | 3'-кінець | кінцева модифікація | кінцева модифікація |
| 3) | 5'-кінець | вільний ОН | вільний ОН |
| | 3'-кінець | вільний ОН | кінцева модифікація |
| 4) | 5'-кінець | вільний ОН | вільний ОН |
| | 3'-кінець | кінцева модифікація | вільний ОН |
| 5) | 5'-кінець | вільний ОН | кінцева модифікація |
| | 3'-кінець | вільний ОН | вільний ОН |
| 6) | 5'-кінець | вільний ОН | кінцева модифікація |
| | 3'-кінець | кінцева модифікація | вільний ОН |
| 7) | 5'-кінець | вільний ОН | кінцева модифікація |
| | 3'-кінець | вільний ОН | кінцева модифікація |
| 8) | 5'-кінець | вільний кінець | кінцева модифікація |
| | 3'-кінець | кінцева модифікація | кінцева модифікація |

Різні кінцеві модифікації, описані тут, переважно розташовані на рибозній частині нуклеотиду нуклеїнової кислоти даного винаходу. Більш конкретно, кінцева модифікація може бути приєднана до ОН-груп або може замінювати ОН-групи рибоз-

ної частини молекули, в тому числі, але не тільки, в положенні 2'ОН, 3'ОН і 5'ОН, за умови, що модифікований таким чином нуклеотид є кінцевим нуклеотидом. Інвертовані нуклеотиди, які не містять нуклеоснов, є дезоксирибонуклеотидами або

рибонуклеотидами, які не містять частини, що є нуклеосомною. Цей тип сполуки, серед інших, описаний в Sternberg, M., Schmiedeknecht, A., Kretschnner, A., Gebhardt, F., Leenders, F., Czauderna, F., Von Carlowitz, I., Engle, M., Giese, K., Beigelman, L. & Klippel, A. (2002). *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 12, 131-43.

Будь-які з вищезгаданих кінцевих модифікацій можуть бути використані в зв'язку з різними варіантами siRNA, зображеними в таблиці 1; потрібно зазначити, що 5'-кінцеві модифікації, вказані вище, присутні звичайно тільки в смислового ланцюгу молекули siRNA.

Додаткові модифікації можуть бути пов'язані з частиною-нуклеосомною, цукровою частиною або фосфатною частиною окремого нуклеотиду.

Така модифікація частини-нуклеосомної може виконуватись таким чином, що похідні аденіну, гуаніну, цитозину і тимідину і урацилу є модифікованими. Особливо переважні модифіковані нуклеосомні вибрані з групи, що містить інозит, ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метил-, 2-пропіл- та інші алкіладеніни, 5-галогенурацил, 5-галогенцитозин, 5-галогеназацитозин, 6-азацитозин, 6-азатимін, псевдоурацил, 4-тіоурацил, 8-галогенаденін, 8-аміноаденін, 8-тіоладенін, 8-тіоалкіладеніни, 8-гідроксиладенін та інші 8-заміщені аденіни, 8-галогенгуаніни, 8-аміногуанін, 8-тіолгуанін, 8-тіоалкілгуанін, 8-гідроксилгуанін та інші заміщені гуаніни, інші аза- і деазааденіни, інші аза- і деазагуаніни, 5-трифторметилурацил і 5-трифторцитозин.

В іншому переважному варіанті здійснення цукрової частини нуклеотиду є модифікованою, причому така модифікація знаходиться переважно в положенні 2' рибозної або дезоксирибозної частини молекули, відповідно. Більш переважно, 2'-ОН-група замінена групою або частиною молекули, вибраною з групи, що містить аміно, фтор, алкокси і алкіл. Переважно, алкокси є метокси або бутокси. Також переважно алкіл означає метил, етил, пропіл, ізобутил, бутіл та ізопропіл. Навіть більш переважно, незалежно від типу модифікації цим нуклеотидом є переважно рибонуклеотид.

Модифікація фосфатної частини молекули переважно вибрана з групи, що містить фосфотіоати.

Фахівцями з кваліфікацією в даній галузі буде зрозуміло, що нуклеїнова кислота даного винаходу, яка складається з множини нуклеотидів, може бути, отже, утворена нуклеотидами, які пов'язані через фосфодієфірний зв'язок або через фосфотіоатний зв'язок, або комбінацією обох вздовж довжини нуклеотидної послідовності окремого ланцюга і сегмента, відповідно.

Додатковою формою нуклеотидів, що використовуються, може бути фактично siRNA, яка, серед інших, описана в Міжнародній заявці на патент WO 03/070918.

Нуклеотиди, які утворюють перший сегмент і перший ланцюг, відповідно, нуклеїнової кислоти даного винаходу можуть містити один або декілька модифікованих нуклеотидів, причому окремий, модифікований нуклеотид має модифікацію, яка переважно є модифікацією, описаною тут. Крім цієї конкретної модифікації, ця модифікація може бути міткою або може містити мітку певного сорту, при-

чому ця мітка вибрана з групи хемілюмінесцентних міток, флуоресцентних міток і радіоактивних міток. Ці типи міток відомі фахівцям з кваліфікацією в даній галузі і, наприклад, описані в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland, 1998. Мічена таким чином нуклеїнова кислота даного винаходу може бути використана також для діагностичних цілей або для моніторингу місця дії, а також для демонстрації будь-якого лікування, переважно пов'язано-го з будь-яким з описаних тут захворювань.

У переважному варіанті здійснення нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу модифікують таким чином, що піримідинові нуклеотиди в смислового сегменті або смислового ланцюгу є 2'-метилпіримідиновими нуклеотидами і, або додатково, або альтернативно, пуринові нуклеотиди в смислового сегменті або смислового ланцюгу є 2'-дезоксипуриновими нуклеотидами. У додатковому варіанті здійснення піримідинові нуклеотиди, присутні в смислового сегменті або смислового ланцюгу, є 2-дезоксипіримідиновими нуклеотидами.

В альтернативному варіанті здійснення модифікація не основана на хімії нуклеотиду, тобто модифікація залежить від того, чи є нуклеотид, який підлягає модифікації, пуриновим або піримідиновим нуклеотидом, але переважно основана на просторовому розміщенні окремого нуклеотиду в загальній дволанцюговій структурі базової конструкції нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу.

Більш конкретно, або перший ланцюг і перший сегмент, або другий ланцюг і другий сегмент виявляють просторовий розподіл модифікації нуклеотидів, які утворюють вказані сегменти і ланцюги, відповідно.

Фокусуючи спочатку увагу на першому сегменті, потрібно зазначити, що є розподіл груп модифікованих нуклеотидів і груп немодифікованих нуклеотидів. Ці групи немодифікованих нуклеотидів називають тут також фланкуючими групами нуклеотидів. Більш переважно, цей розподіл складається з груп модифікованих і немодифікованих нуклеотидів. Навіть більш переважно, цей розподіл є регулярним розподілом і, навіть більш переважно, розподілом, що чергується, вздовж довжини першого сегмента нуклеїнової кислоти даного винаходу. Група модифікованих нуклеотидів може складатись або з одного, або з декількох нуклеотидів, які є модифікованими і які є переважно нуклеотидами, які модифіковані в положенні 2', тобто мають модифікацію в цукровій частині молекули. Більш переважно, цією модифікацією є 2'-О-Метилмодифікація.

Група немодифікованих нуклеотидів може складатись з одного або декількох нуклеотидів, які або є немодифікованими, причому немодифіковані нуклеотиди є переважно рибонуклеотидами, або ці немодифіковані нуклеотиди є нуклеотидами, що мають модифікацію, причому така модифікація є відмінною від модифікації, яка виявляється нуклеотидами, що утворюють групу модифікованих нуклеотидів. Навіть більш переважно, немодифіковані нуклеотиди є рибонуклеотидами. Потрібно зазначити, що термін немодифіковані і немодифіковані

використовується взаємозамінно, якщо немає іншої вказівки. Перший сегмент нуклеїнової кислоти за даним винаходом може починатись або з групи модифікованих нуклеотидів, або з групи немодифікованих нуклеотидів, визначених тут. Однак переважно перший сегмент починається з групи модифікованих нуклеотидів. Найбільш переважно, група модифікованих нуклеотидів складається з єдиного нуклеотиду. У зв'язку з цим варіантом здійснення перший сегмент знаходиться переважно в антисмисловій орієнтації відносно нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801. В рамках даного винаходу знаходиться також те, що модифікація, яка проявляється нуклеотидами, що утворюють групу модифікованих нуклеотидів, є однаковою для всіх груп модифікованих нуклеотидів, присутніх на першому сегменті. Однак в рамках даного винаходу знаходиться також те, що деяка група модифікованих нуклеотидів має іншу модифікацію, ніж модифікація однієї або декількох груп модифікованих нуклеотидів, присутніх на першому сегменті.

На другому сегменті нуклеїнової кислоти за даним винаходом може також знаходитись розподіл, описаний для першого сегмента. Такі ж характеристики, які описані в зв'язку з першим сегментом, можуть бути також представлені у варіанті на другому сегменті, причому, переважно, за умови, що другий сегмент знаходиться у смисловій орієнтації відносно послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує RTP801, другий ланцюг нуклеїнової кислоти за даним винаходом починається з групи немодифікованих нуклеотидів.

Нуклеїнова кислота відповідно до даного винаходу, яка містить дволанцюгову структуру, може містити перший сегмент, що має описаний тут розподіл модифікацій. Альтернативно, дволанцюгова нуклеїнова кислота за даним винаходом може містити другий сегмент, що має розподіл модифікацій, описаний вище. Однак, найбільш переважно, дволанцюгова нуклеїнова кислота за даним винаходом складається з першого сегмента і другого сегмента, причому як перший сегмент, так і другий сегмент мають просторовий розподіл модифікацій, як описано тут.

У рамках даного винаходу знаходиться те, що характеристики просторового розподілу модифікацій є однаковими на обох сегментах за розмірами груп модифікованих нуклеотидів і груп немодифікованих нуклеотидів і типу модифікацій, що фактично використовуються. Переважно, просторовий розподіл модифікацій на першому сегменті зміщений таким чином, що група модифікованих нуклеотидів на першому сегменті знаходиться навпроти групи немодифікованих нуклеотидів на другому сегменті і *vice versa*. Однак в рамках даного винаходу знаходиться також те, що ці розподіли точно зіставляються, тобто що група модифікованих нуклеотидів на першому сегменті знаходиться навпроти групи немодифікованих нуклеотидів на другому сегменті, а група немодифікованих нуклеотидів на першому сегменті знаходиться навпроти групи немодифікованих нуклеотидів на другому сегменті. В рамках даного винаходу знаходиться також те, що просторовий розподіл модифікацій на першому сегменті і другому сегменті зміщений відносно один одного таким чином, що перша час-

тина групи модифікованих нуклеотидів на одному сегменті знаходиться навпроти частини групи немодифікованих нуклеотидів на іншому сегменті, тоді як друга частина групи модифікованих нуклеотидів знаходиться навпроти іншої групи модифікованих нуклеотидів. В рамках даного винаходу знаходиться також те, що наведений тут опис просторового розподілу модифікацій сегмента (сегментів) нуклеїнової кислоти за даним винаходом застосовний також до ланцюга (ланцюгів) нуклеїнової кислоти за даним винаходом. Однак, переважно, сегменти цієї нуклеїнової кислоти мають просторовий розподіл модифікацій, і ці ланцюги містять такі сегменти і один або декілька виступів, описаних тут. Особливо переважним є те, що цей виступ є фосфатною групою на 3'-кінці антисмисловою або смисловою ланцюга або обох ланцюгах, причому, більш переважно, ця фосфатна група знаходиться на 3'-кінці як антисмислового ланцюга, так і смислового ланцюга. У ще більш переважному варіанті здійснення фосфатна група є описаною тут фосфатною групою.

В рамках даного винаходу знаходиться також те, що нуклеїнова кислота за даним винаходом може мати лінкер, який з'єднує перший і другий ланцюг. Таким лінкером є переважно полімер. Цей полімер може бути будь-яким синтетичним або природним полімером. Можливими синтетичними лінкерами є, серед інших, ПЕГ або полінуклеотид. Такий лінкер переважно конструюють таким чином, щоб зробити можливим частковий або повний зворотний фолдинг першого сегмента на другий сегмент і *vice versa*.

Нарешті, в рамках даного винаходу знаходиться те, що нуклеїнова кислота за даним винаходом є синтетичною нуклеїновою кислотою, виділеною нуклеїновою кислотою або нуклеїновою кислотою, одержаною з будь-якого з природних джерел, таких як, наприклад, джерела, одержані способами рекомбінантної технології. У зв'язку з одержанням будь-якої нуклеїнової кислоти за даним винаходом будь-яка модифікація, описана тут, може бути введена до, під час або після одержання відповідної нуклеїнової кислоти за даним винаходом, як відомо фахівцям з кваліфікацією в даній галузі.

Вектор відповідно до даного винаходу містить нуклеїнову кислоту за даним винаходом. Крім того, цей вектор може включати елементи для регуляції націлювання, експресії і транскрипції вказаної нуклеїнової кислоти клітинспецифічним чином, як відомо в даній галузі. Плазміда може включати промотор для регуляції транскрипції гетерологічного матеріалу, тобто нуклеїнової кислоти за даним винаходом, і промотор може бути або конститутивним, або індукцибельним промотором для створення можливості селективної транскрипції. Можуть бути також необов'язково включені енхансери, які можуть вимагатись для одержання необхідних рівнів експресії. Енхансерами є звичайно будь-які ДНК-послідовності, які не транскрибуються, які працюють суміжно з кодуючою послідовністю, отже, *in cis*, для зміни базового рівня транскрипції, що диктується промотором. Експресія таких конструкцій відома фахівцям з кваліфікацією в даній галузі і може бути виконана, наприклад, забезпе-

ченням відповідної тандемної конструкції або введенням різних промоторів транскрипції для першого і другого ланцюга і першого і другого сегмента, відповідно, нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу.

При приготуванні або експресії нуклеїнової кислоти за даним винаходом, переважно експресії *in vivo*, більш переважно в пацієнті, який потребує нуклеїнової кислоти даного винаходу, таке приготування або така експресія переважно використовують експресуючий вектор, переважно експресуючий вектор ссавця. Експресуючі вектори відомі в даній галузі і переважно включають плазмиди, косміди, вірусні системи експресії. Переважні вірусні системи експресії включають, але не обмежуються ними, аденовірус, ретровірус і лентівірус.

В даній галузі відомі способи введення цих векторів в клітини або тканини. Такі способи можуть бути знайдені звичайно в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Johnm Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Придатні способи включають, серед інших, трансфекцію, ліпофекцію, електропорацію та інфекцію рекомбінантними вірусними векторами. У зв'язку з даним винаходом додатковою ознакою цього вектора є в одному варіанті здійснення обмежуюча експресію ознака, така як промотор і регуляторний елемент, відповідно, які є специфічними для бажаного типу клітин, отже, такими, що дозволяють експресію послідовності нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу тільки після забезпечення фону, який робить можливою бажану експресію.

У наступному аспекті даний винахід стосується фармацевтичної композиції за даним винаходом і/або вектору за даним винаходом і необов'язково фармацевтично прийнятному носію, розріджувача або ад'ювантів або іншого наповнювача (інших наповнювачів). Переважно, такий носій, розчинники, ад'юванти і наповнювачі є інертними і нетоксичними. Фармацевтична композиція в її різних варіантах адаптована для введення різними способами. Таке введення включає системне і місцеве введення, а також пероральне, підшкірне, парентеральне, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, внутрішньом'язове, внутрішньочеревинне, інтраназальне та інтратекальне (підоболонкове) введення.

Фахівцям з кваліфікацією в даній галузі буде зрозуміло, що кількість фармацевтичної композиції і відповідних нуклеїнової кислоти і вектора, відповідно, залежить від клінічного стану пацієнта, місця і способу введення, схеми введення, віку, статі, маси тіла пацієнта та інших факторів, відомих лікарям-практикам. Таким чином, фармацевтично ефективна кількість для цілей профілактики і/або лікування визначається з урахуванням таких факторів, які відомі в цих галузях медицини. Переважно, ця кількість є ефективною для досягнення поліпшення, в тому числі, але не тільки, для поліпшення патологічного стану або для забезпечення більш швидкого видужання, поліпшення або усунення симптомів та інших показників, вибраних

як придатні критерії фахівцями з кваліфікацією в галузі медицини.

У переважному варіанті здійснення фармацевтична композиція відповідно до даного винаходу може містити інші фармацевтично активні сполуки. Переважно, такі інші фармацевтично активні сполуки вибрані з групи, що містить сполуки, які роблять можливою доставку для внутрішньоклітинного поглинання, сполуки, які роблять можливим ендосомне вивільнення, сполуки, які роблять можливим більш тривалий час циркуляції, і сполуки, які роблять можливим націлювання на ендотеліальні клітини або патогенні клітини. Переважними сполуками для ендосомного вивільнення є хлорохін та інгібітори АТФ-залежних H^+ -насосів.

Фармацевтичну композицію переважно готують таким чином, щоб забезпечувати однократне введення або багаторазове введення.

Буде зрозуміло, що фармацевтична композиція за даним винаходом може бути використана для будь-якого захворювання, яке включає небажаний розвиток або небажане зростання судинної сітки, в тому числі ангіогенез, а також будь-яке із захворювань і станів, описаних тут. Переважно, цим типом захворювань є пухлинні захворювання. Серед пухлинних захворювань наступні пухлини є найбільш переважними для лікування: рак ендометрію, колоректальні карциноми, гліоми, ендометріальні карциноми, аденокарциноми, ендометріальні гіперплазії, синдром Коудена, спадкова неполіпозна колоректальна карцинома, синдром Лі-Фромені, рак молочної залози, рак передміхурової залози (Ali, I.U., *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, no. 11, June 07, 2000, page 861-863), синдром Баннаяна-Зонана, LDD (синдром Лермітте-Дуклоса) (Macleod, K., *supra*), хвороби гамартоми-макроцефалії, в тому числі хвороба Коу (CD) і синдром Баннаяна-Рувалькаба-Рілі (BRR), шкірно-слизові пошкодження (наприклад, трихилемоми), макроцефалія, затримка розумового розвитку, шлунково-кишкові гамартоми, ліпоми, аденома щитовидної залози, фіброзно-кістозне захворювання молочної залози, мозочкова диспластична гангліоцитоміа і злоякісності молочної залози і щитовидної залози (Vazquez, F., Sellers, W.R., *supra*).

Повинно бути зрозуміло, що будь-яке з пухлинних захворювань, яке повинно лікуватись фармацевтичною композицією відповідно до даного винаходу, є переважно пухлинним захворюванням пізньої стадії. В іншому варіанті здійснення це пухлинне захворювання включає клітини, які є нечутливими до пухлинного супресора, причому більш переважно цим пухлинним супресором є PTEN (гомолог фосфатази і тензину).

Фармацевтична композиція за даним винаходом може бути також використана у способі профілактики і/або лікування описаного тут захворювання, причому цей спосіб передбачає введення нуклеїнової кислоти за даним винаходом, вектора за даним винаходом або фармацевтичної композиції або лікарського засобу за даним винаходом для будь-якого з описаних тут захворювань.

У наступному аспекті даний винахід стосується способу конструювання або скринінгу нуклеїнової кислоти, яка придатна для негативної регуляції

RTP801, більш переважно для негативної регуляції функції RTP801. Цей спосіб передбачає застосування послідовності нуклеїнової кислоти, описаної тут, і оцінку такої нуклеїнової кислоти у придатному аналізі. Такий аналіз відомий в даній галузі і, наприклад, описаний в частині прикладів цієї заявки. У наступній стадії конструюють дволанцюгову структуру, переважно відповідно до принципів конструювання, представлених тут, яка придатна для негативної регуляції RTP801, переважно у зв'язку з механізмом посттранскрипційного сайленсінгу генів, такого як інтерференція РНК. Одержану таким чином, тобто сконструйовану або одержану скринінгом, нуклеїнову кислоту оцінюють також у відповідному аналізі і цей результат, тобто дію як нуклеїнової кислоти за даним винаходом, так і заново сконструйованої або одержаної скринінгом нуклеїнової кислоти порівнюють в такому аналізі. Переважно, ця сконструйована або одержана скринінгом нуклеїнова кислота є більш придатною, якщо вона є або більш стабільною, або більш ефективною, переважно має обидві ці властивості. Буде зрозуміло, що цей спосіб буде особливо ефективним, якщо будь-яку з нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу використовують як вихідну точку. Таким чином, в рамках даного винаходу знаходиться те, що нові молекули нуклеїнових кислот будуть конструюватися на основі описаних тут ознак, причому послідовність-мішень на мРНК RTP801 буде злегка зміщена відносно послідовності-мішені на мРНК RTP801 для відповідної нуклеїнової кислоти відповідно до даного винаходу. Переважно, ця нова нуклеїнова кислота буде зміщена на щонайменше один або декілька нуклеотидів відносно сегмента на мРНК-мішені або в 5'-напрямі, або в 3'-напрямі мРНК, що кодує RTP801. Однак відповідно до даного винаходу це зміщення має місце в обох напрямках одночасно, що означає, що ця нова нуклеїнова кислота включає нуклеїнову кислоту за даним винаходом, що використовується як вихідна точка. Відповідно до даного винаходу, елонгація нуклеїнової кислоти за даним винаходом, що використовується як початкова точка, також зміщена або до 3'-, або 5'-кінця. У випадку такого зміщення або 3'-кінець, або 5'-кінець нової нуклеїнової кислоти є більш довгим, тобто більш подовженим, ніж інший кінець. При генеруванні цієї нової молекули нуклеїнової кислоти подовженням 3'-кінця або 5'-кінця антисмислового ланцюга і/або смислового ланцюга застосовують звичайно наступну послідовність стадій. Якщо зміщення виконується до 5'-кінця мРНК RTP801, 3'-кінець антисмислового ланцюга повинен бути подовжений кількістю нуклеотидів, на яку був зміщений 5'-кінець мРНК RTP801. Таким чином, нуклеотид або нуклеотиди, які повинні бути додані до 3'-кінця антисмислового ланцюга нової нуклеїнової кислоти, є комплементарними нуклеотидам, що знаходяться на 5'-кінці послідовності-мішені на мРНК RTP801, що використовується для молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом як вихідна точка. Те ж саме повинне бути виконане для смислового ланцюга. Однак, нуклеотиди, які повинні бути додані до смислового ланцюга, повинні відповідати, тобто бути комплементарними нуклеотидам, що заново

додаються до 3'-кінця антисмислового ланцюга, що означає, що вони повинні бути додані до 5'-кінця смислового ланцюга. Однак ця остання стадія на смисловому ланцюгу повинна виконуватись тільки до тієї міри, до якої буде зміщений також смисловий ланцюг, крім антисмислового ланцюга, що має місце в переважному варіанті здійснення даного винаходу. Хоча це зміщення може бути виконане до міри, що визначається фахівцями з кваліфікацією в даній галузі, більш переважно, це зміщення буде виконуватись таким чином, що також і нова нуклеїнова кислота все ще містить сегмент з щонайменше 14 нуклеотидів, переважно 14 суміжних нуклеотидів, як показано будь-якою з описаних тут молекул нуклеїнових кислот.

Синтез будь-якої з описаних тут нуклеїнових кислот знаходиться в рамках кваліфікації фахівця в даній галузі. Такий синтез описаний, серед інших, в Beaucage S.L. and Iyer R.P., *Tetrahedron* 1992; 48: 2223-2311, Beaucage S.L. and Iyer R.P., *Tetrahedron* 1993; 49: 6123-6194 і Caruthers M.H. et al., *Methods Enzymol.* 1987; 154: 287-313, синтез тіоатів, серед інших, описаний в Eckstein F., *Annu. Rev. Biochem.* 1985; 54: 367-402, синтез молекул РНК описаний в Sproat B., in *Humana Press* 2005 Edited by Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 і відповідні процеси далі по ходу описаних, серед інших, в Pingoud A. et al., in *IRL Press* 1989 Edited by Oliver R.W.A.; Kap. 7: 183-208 і Sproat B., in *Humana Press* 2005 Edited by Herdewijn P.; Kap. 2: 17-31 (supra).

siRNA для RTP801 може бути одержана з використанням способів, відомих в даній галузі, описаних вище, на основі відомої послідовності RTP801 (SEQ ID NO:1) і може бути зроблена стабільною різними описаними вище модифікаціями. Відносно додаткової інформації див. Приклад 9.

Крім того, що стосується способів даного винаходу, описаних тут, додаткові молекули РНК можуть бути використані з вказаними способами, наприклад, інгібуючі молекули РНК даного винаходу включають одноланцюгові олігорибонуклеотиди, що переважно містять сегменти з щонайменше 7-10 послідовних нуклеотидів, присутніх в послідовностях, детально описаних в таблицях А-С, причому вказані олігорибонуклеотиди здатні утворювати [і/або містять] дволанцюгові райони в конкретних конформаціях, які впізнаються внутрішньоклітинними комплексами, що приводить до деградації вказаних олігорибонуклеотидів на менші молекули РНК, які здатні виявляти інгібування їх відповідного ендогенного гена і ДНК-молекул, що кодують такі молекули РНК. Відповідним ендогенним геном є переважно ген 801 і може бути ген VEGF і/або ген VEGF-R1. Даний винахід забезпечує також композицію, яка містить вищезгаданий одноланцюговий олігорибонуклеотид в носії, переважно фармацевтично прийнятному носії.

Крім того, даний винахід забезпечує комбіновану терапію для всіх описаних тут станів і, зокрема, станів, що включають хороїдальну неоваскулярізацію. У вказаній комбінованій терапії як ген RTP801, так і ген VEGF інгібуються для ослаблення симптомів підлягаючого лікуванню захворювання. Ці ієни можуть бути інгібовані комбінацією siRNA або антитіл (в тому числі аптамерних анти-

тіл) або обома. Таким чином, даний винахід забезпечує також нову фармацевтичну композицію, яка містить інгібітор RTP801 та інгібітор VEGF або VEGFR-1, причому інгібітором RTP801 є переважно siRNA, більш переважно siRNA, детально описана в таблицях A-C, і, зокрема, siRNA з номерами 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 і 50 таблиці A, а інгібітором VEGF/VEGFR-1 необов'язково є антитіло або аптамер. Комбіноване застосування вказаних сполук (тобто siRNA RTP801 і антитіла VEGF або будь-якого іншого комбінованого прикладу, описаного тут) у приготуванні лікарського засобу є також частиною даного винаходу.

Таким чином, siRNA RTP801, такі як молекула siRNA, детально описана в таблицях A-C і, зокрема, siRNA з номерами 14, 22, 23, 25, 27, 39, 41, 49 і 50 таблиці A, можуть вводитись разом з агентами, які націлені на VEGF і рецептор 1 VEGF (VEGFR1). Такі агенти є в цей час на ринку або знаходяться в різних стадіях затвердження і дослідження за допомогою різних механізмів. Антитіла і фрагменти антитіл, такі як ранібіцимаб (Lucentis, Genentech) приєднують до вивільненого VEGF для інгібування зв'язування VEGF з активними рецепторами. Аптамер, який може діяти подібно комплексу ліганд/антитіло (Mascigen, Eyetech/Pfizer, схвалений нещодавно Департаментом з контролю за якістю харчових продуктів, медикаментів і косметичних засобів (FDA), для вологої AMD), також може бути використаний. Макуген зв'язується з позаклітинним VEGF з блокуванням його активності. Ці лікарські засоби вводять локально ін'єкцією в склоподібне тіло. Анти-VEGF-сполуки на основі siRNA (такі як інгібітор VEGF Aculity's Cand5 або інгібітор VEGFR-1 siRNA's 027) також є доступними. Крім того, повідомлялось, що низькомолекулярний аміностерин Сквамін (Gepaega), який вводять системно, є інтерферуючим фактором в багатьох аспектах ангиогенного процесу, в тому числі інгібує VEGF і передачу сигналів інших факторів росту в ендотеліальних клітинах.

Однчасне введення інгібітору RTP801, переважно siRNA, і будь-якого з вищезгаданих інгібуючих агентів VEGF/VEGFR-1, може мати синергічну дію, причому вказане комбіноване лікування є більш ефективним, ніж лікування будь-якою з цих окремих композицій, незалежно від дози у випадку монотерапії. Ця синергічна дія підтверджується також попередніми результатами, отриманими цим правонаступником, як описано детально в Прикладі 6.

Інгібітор RTP801 (RTP801i) має інший механізм дії і є потенційно синергічним з інгібіторами VEGF-VEGFR. Дослідження на мишах з нокаутом RTP801 показує, що захисний фенотип в мишах з нокаутом зберігається, не дивлячись на той факт, що експресія мРНК VEGF в оці є такою ж високою, як і в мишах дикого типу. Додаткові попередні результати авторів даного винаходу показують, що інгібування RTP801 може бути синергічним з інгібуванням регуляторної системи VEGF-VEGFR у лікуванні патології сітківки. Автори даного винаходу виявили у відповідних експериментах, що введення siRNA проти RTP801 в моделі AMD (див. Приклад 6 нижче) приводить не тільки до негативної регуляції самого RTP801, але так само, як на-

слідок, до підвищуючої регуляції антиангіогенного і нейропротективного фактора PEDF, а також негативної регуляції експресії MCP, хемоатрактантного білка макрофагів. Таким чином, інгібування RTP801 одночасно індукує антиангіогенну, нейропротективну і протизапальну дії.

Повинно бути зрозуміло, що в контексті даного винаходу будь-яка з молекул siRNA, описаних тут, або будь-яка з дволанцюгових молекул РНК (звичайно з довжиною 25-500 нуклеотидів), які процесуються ендогенними клітинними комплексами (такими як DICER - див. вище) з утворенням описаних тут молекул siRNA або молекул, які містять описані тут молекули siRNA, можуть бути використані у лікуванні описаних тут захворювань або порушень.

Додаткові порушення, які можуть лікуватись молекулами і композиціями даного винаходу, включають всі типи хороїдальної неоваскуляризації (CNV), яка має місце не тільки у вологої AMD, але також в інших очних патологіях, таких як синдром очного гістоплазмозу, ангиодні смуги сітківки, розриви в оболонці Бруха, міопічна дегенерація, очні пухлини і деякі дегенеративні захворювання сітківки.

Додатковий аспект даного винаходу забезпечує способи лікування пов'язаного з апоптозом захворювання. Забезпечені способи терапії захворювань або порушень, асоційованих з патологічним зростанням клітин, що не контролюється, наприклад, раку, псоріазу, аутоімунних захворювань, *inter alia*, і способи терапії захворювань, асоційованих з ішемією і відсутністю правильного кровотоку, наприклад, інфаркту міокарда (MI) або інсульту. «Раком» або «пухлиною» називають неконтрольовану зростаючу масу клітин, що відхиляються від норми. Ці терміни включають як первинні пухлини, які можуть бути доброякісними або злоякісними, так і вторинні пухлини, або метастази, які розповсюдились в інші місця тіла. Приклади захворювань ракового типу включають, *inter alia*: карциному (наприклад, молочної залози, ободової кишки і легені), лейкоз, такий як В-клітинний лейкоз, лімфому, таку як В-клітинна лімфома, бластому, таку як нейробластома і меланома.

Даний винахід забезпечує також композицію, яка містить одну або декілька сполук даного винаходу в носії, переважно фармацевтично прийнятному носії. Ця композиція може містити суміш двох або більшої кількості siRNA для різних генів або різних siRNA для одного і того ж гена. Розглядається питання про композицію, яка містить siRNA для гена RTP801 і siRNA для гена VEGF і/або гена VEGF-R1.

Інша сполука даного винаходу включає вищезгадану сполуку даного винаходу (структуру A), ковалентно або нековалентно пов'язану з однією або декількома сполуками даного винаходу (структурою A). Ця сполука може доставлятися в носії і може процесуватись внутрішньоклітинно ендогенними клітинними комплексами з утворенням однієї або декількох siRNA даного винаходу. Інша сполука даного винаходу містить вищезгадану сполуку даного винаходу (структуру A), ковалентно або нековалентно пов'язану з siRNA для іншого гена, зокрема, гена VEGF або гена VEGF-R1.

Даний винахід включає також нову хімічну частинку, яка є інгібітором RTP801, переважно siRNA, хімічно пов'язаним, ковалентно або нековалентно, з будь-яким з інгібуючих агентів VEGF/VEGFR-1. Конкретною хімічною частинкою, що розглядається, є інгібітор RTP801 siRNA, ковалентно пов'язаний з антитілом VEGF або рецептором-1 VEGF. Способи одержання таких нових хімічних частинок відомі фахівцям з кваліфікацією в даній галузі.

Даний винахід включає також тандемну дволанцюгову структуру, яка містить дві або більшу кількість послідовностей siRNA, яка процесується внутрішньоклітинно з утворенням двох або більшої кількості siRNA, одна з яких інгібує 801, а друга інгібує VEGF/VEGFR-1. У спорідненому аспекті цей винахід включає також тандемну дволанцюгову структуру, яка містить дві або більшу кількість послідовностей siRNA, яка деградується внутрішньоклітинно з утворенням двох або більшої кількості siRNA, обидві з яких інгібують 801.

Зокрема, розглядається, що довгий олігонуклеотид (звичайно з довжиною приблизно 80-500 нуклеотидів), який містить одну або декілька структур стеблини і петлі, де райони стеблини містять послідовності олігонуклеотидів цього винаходу, може доставлятися в носії, переважно фармацевтично прийнятному носії, і може процесуватись внутрішньоклітинно ендегенними клітинними комплексами (наприклад, DROSHA і DICER, описаними вище) з утворенням одного або декількох менших дволанцюгових олігонуклеотидів (siRNA), які є олігонуклеотидами даного винаходу. Цей олігонуклеотид може бути названий тандемною конструкцією shRNA. Передбачається, що цей довгий олігонуклеотид є одноланцюговим олігонуклеотидом, що містить одну або декілька структур стеблини і петлі, де кожний район стеблини містить смислову і відповідну антисмислову послідовність siRNA гена 801. Зокрема, передбачається, що цей олігонуклеотид містить смислову і антисмислову послідовності siRNA, зображені в будь-якій з таблиць А-С. Альтернативно, ця тандемна конструкція shRNA може містити смислову і відповідну антисмислову послідовність siRNA гена 801 і додаткову смислову і відповідну антисмислову послідовність siRNA іншого гена, такого як VEGF або VEGF-R1.

Як згадувалось вище, siRNA проти RTP801 може бути основним активним компонентом у фармацевтичній композиції або може бути одним активним компонентом фармацевтичної композиції, яка містить дві або декілька siRNA (або молекул, які кодують або ендегенно продукують дві або більше siRNA, будь-це сумішшю молекул або однією або декількома тандемними молекулами, кожна з яких кодує дві або більше siRNA), причому вказана фармацевтична композиція додатково містить одну або декілька додаткових молекул siRNA, кожна з яких націлена на один або декілька додаткових генів. Одночасне інгібування RTP801 і вказаних додаткових гена або генів буде, можливо, мати адитивну або синергічну дію у лікуванні описаних тут захворювань згідно з наступним:

Гостра ниркова недостатність (ARF) та інші мікросудинні порушення: фармацевтична композиція для лікування ARF може складатись з наступних комбінацій сполук: 1) димери siRNA RTP801 і

siRNA p53; 2) димери siRNA RTP801 і Fas; 3) димери siRNA RTP801 і Bax; 4) димери siRNA p53 і Fas; 5) димери siRNA RTP801 і Bax; 6) димери siRNA RTP801 і Noxa; 7) димери siRNA RTP801 і Puma; 8) димери siRNA RTP801 (REDD1) і RTP801L (REDD2); 9) siRNA RTP801, siRNA Fas і будь-яка з siRNA RTP801L, siRNA p53, siRNA Bax, siRNA Noxa або siRNA Puma для утворення тримерів або полімерів (тобто тандемних молекул, які кодують три siRNA).

Дегенерація жовтої плями (MD), діабетична ретинопатія (DR), пошкодження спинного мозку: фармацевтичні композиції для лікування MD, DR і пошкодження спинного мозку можуть складатись з наступних комбінацій сполук: 1) siRNA, комбінована з siRNA VEGF, siRNA VEGF-R1, siRNA VEGF-R2, siRNA PKCбета, siRNA MCP1, siRNA eNOS, siRNA KLF2, siRNA RTP801L (фізично змішані або в тандемній молекулі); 2) siRNA RTP801 в комбінації з двома або більше siRNA наведеного вище переліку (фізично змішані або в тандемній молекулі, що кодує три siRNA, або їх комбінація).

ХОХЛ і респіраторні порушення: фармацевтична композиція для лікування респіраторних порушень може складатись з наступних комбінацій сполук: siRNA RTP801, об'єднана з siRNA одного або декількох з наступних генів: еластаз, металопроtease позаклітинного матриксу, фосфоліпаз, каспаз, сфінгомелінази і церамідсинтази.

Крім того, siRNA RTP801 або будь-яка молекула нуклеїнової кислоти, яка містить або кодує siRNA RTP801, може бути пов'язана (ковалентно або нековалентно) з антитілами для досягнення посиленого націлювання для лікування описаних тут захворювань згідно з наступним:

ARF: анти-Fas-антитіло (переважно, нейтралізуючі антитіла).

Дегенерація жовтої плями, діабетична ретинопатія, пошкодження спинного мозку: анти-Fas-антитіло, анти-MCP1-антитіло, анти-VEGF-R1- і анти-VEGF-R2-антитіло. Ці антитіла повинні бути, переважно, нейтралізуючими антитілами.

Будь-які молекули, такі як, наприклад, антисмислові молекули ДПК, які містять послідовності siRNA, описані тут, (з відповідними модифікаціями нуклеїнових кислот) є особливо бажаними і можуть бути використані з тією ж самою ефективністю, що і їх відповідні siRNA, для всіх описаних тут застосувань і способів.

Даний винахід включає також спосіб лікування пацієнта, який страждає від порушення, такого як описані тут порушення, що передбачає введення пацієнту вищезгаданих композицій або сполуки у терапевтично ефективній дозі таким чином, щоб лікувати цього пацієнта.

Під терміном «антисмисловий» (AS) або «антисмисловий фрагмент» мається на увазі полінуклеотидний фрагмент (який містить дезоксирибонуклеотиди, рибонуклеотиди або їх суміш), що має інгібуючу антисмислову активність, причому вказана активність спричиняє зменшення експресії ендегенної геномної копії відповідного гена (в цьому випадку RTP801). AS-полінуклеотид є полінуклеотидом, який містить послідовні нуклеотиди, що мають послідовність достатньої довжини і гомології відносно послідовності, присутньої в послі-

довності гена RTP801, представленої в SEQ ID NO:1, для створення можливості гібридизації цього AS з цим геном. Послідовність AS сконструйована таким чином, щоб бути комплементом мРНК-мішені, яка представляє інтерес, і утворювати дуплекс РНК:AS. Це утворення дуплексу може запобігати процесингу, сплайсингу, транспорту або трансляції релевантної мРНК. Крім того, деякі AS-нуклеотидні послідовності можуть індукувати активність клітинної РНКазы Н при гібридизації з їх мРНК-мішенню, приводячи до деградації мРНК (Calabretta et al., 1996: Antisense strategies in the treatment of leukemias. *Semin Oncol.* 23(1): 78-87). В цьому випадку РНКазы Н буде розщеплювати РНК-компонент цього дуплексу і може потенційно вивільняти AS для додаткової гібридизації з додатковими молекулами РНК-мішені. Додатковий механізм дії відбувається з взаємодії AS з геномною ДНК з утворенням потрійної спіралі, яка може бути транскрипційно неактивною. Конкретними AS-фрагментами є AS ДНК, що кодує конкретні фрагменти описаного тут RTP801.

Багато які огляди охоплюють основні аспекти антисмислової (AS) технології і її терапевтичний потенціал (Wright & Anazodo, 1995. Antisense Molecules and Their Potential For The Treatment Of Cancer and AIDS. *Cancer J.* 8:185-189). Є огляди з хімічних аспектів цієї технології. (Crooke, 1995. Progress in antisense therapeutics, *Hematol. Pat. hoi.* 2:59; Uhlmann and Peyman, 1990. Antisense Oligonucleotides: A New Therapeutic Principle. *Chem Rev* 90(4): 543-584.), cellular (Wagner, 1994. Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 372:333) and therapeutic (Hanania, et al 1995. Recent advances in the application of gene therapy to human disease. *Am. J. Med.* 99:537; Scanlon et al., 1995. Oligonucleotides-mediated modulation of mammalian gene expression. *FASEB J.* 9:1288; Gewirtz, 1993. Oligodeoxynucleotide-based therapeutics for human leukemias, *Stem Cells Dayt.* 1 1:96).

Антисмислове втручання в експресію конкретних генів може бути досягнуте з використанням синтетичних послідовностей AS-олігонуклеотидів (див. M! Lefebvre-d'Hellencourt et al, 1995. Immunomodulation by cytokine antisense oligonucleotides. *Eur. Cytokine Netw.* 6:7; Agrawal, 1996. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials, *TIBTECH.* 14:376; Lev-Lehman et al., 1997. Antisense Oligomers in vitro and in vivo. In *Antisense Therapeutics*, A. Cohen and S. Smicek, eds (Plenum Press, New York)). AS-олігонуклеотидні послідовності сконструйовані таким чином, щоб бути комплементом мРНК-мішені, яка представляє інтерес, і утворювати дуплекс РНК:AS. Це утворення дуплексу може запобігати процесингу, сплайсингу, транспорту або трансляції релевантної мРНК. Крім того, деякі AS-нуклеотидні послідовності можуть індукувати активність клітинної РНКазы Н при гібридизації з їх мРНК-мішенню, приводячи до деградації мРНК (Calabretta et al., 1996: Antisense strategies in the treatment of leukemias. *Semin Oncol.* 23(1): 78-87). В цьому випадку РНКазы Н буде розщеплювати РНК-компонент цього дуплексу і може потенційно вивільняти AS для додаткової гібридизації з додатковими молекулами РНК-

мішені. Додатковий механізм дії відбувається з взаємодії AS з геномною ДНК з утворенням потрійної спіралі, яка може бути транскрипційно неактивною.

Послідовність сегмента-мішені для антисмислового олігонуклеотиду вибрана таким чином, що ця послідовність проявляє відповідні пов'язані з енергією характеристики, важливі для утворення олігонуклеотидного дуплексу з їх комплементарними матрицями і виявляє низький потенціал у відношенні самодимеризації або самокомплементарності (Anazodo et al., 1996). Наприклад, комп'ютерна програма OLIGO (Primer Analysis Software, Version 3.4) може бути використана для визначення точки плавлення антисмислової послідовності, властивостей вільної енергії і наближеного визначення властивостей потенційного утворення самодимерів і самокомплементарності. Ця програма дозволяє робити кількісну оцінку цих двох параметрів (потенційного утворення самодимерів і самокомплементарності) і забезпечує показники «немає потенціалу» або «деякий потенціал» або «по суті повний потенціал». З використанням цієї програми звичайно відбирають сегменти-мішені, які мають оцінки «немає потенціалу» в цих параметрах. Однак можуть бути використані сегменти, які мають «деякий потенціал», в одній з цих категорій. Баланс цих параметрів використовують в цьому відборі, як це відоме в даній галузі. Крім того, ці олігонуклеотиди відбирають по мірі необхідності таким чином, що аналогічна заміна по суті не впливає на функцію.

Фосфоротіоатні антисмислові олігонуклеотиди звичайно не виявляють значущої токсичності в концентраціях, які є ефективними, і проявляють достатні фармакодинамічні напівперіоди існування у тварин (Agrawal, 1996. Antisense oligonucleotides: towards clinical trials, *TIBTECH.* 14:376) і є резистентними до нуклеаз. Антисмислові індуковані фенотипи з втратою функції, пов'язаної з клітинним розвитком, були показані для гліального фібрилярного кислого білка (GFAP), для встановлення утворення тектальної пластинки у курчат (Galileo et al., 1991. *J. Cell. Biol.* 112:1285) і для білка N-мус, відповідального за збереження клітинної гетерогенності в нейроектодермальних культурах (епітеліальних клітин у порівнянні з нейробластними клітинами, які відрізняються за їх колонієутворювальною активністю, онкогеністю і прикріпленням) (Rosolen et al., *Cancer Res.* 50:6316; Whitesell et al., 1991. Episome-generated N-myc antisense RNA restricts the differentiation potential of primitive neuroectodermal cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 11:1360). Інгібування антисмисловим олігонуклеотидом основного фактора росту фібробластів (bFGF), що має мітогенні і ангіогенні властивості, придушувало 80% зростання в клітинах гліоми (Morrison, 1991. Suppression of basic fibroblast growth factor expression by antisense oligonucleotides inhibits the growth of transformed human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 266:728) насичуючим і специфічним чином. Будучи гідрофобними, антисмислові олігонуклеотиди добре взаємодіють з фосфоліпідними мембранами (Akhter et al., 1991. Interactions of antisense DNA oligonucleotide analogs with phospholipid membranes (liposomes)

Nuc. Res. 19:5551-5559). Після їх взаємодії з клітинними плазматичними мембранами вони активно (або пасивно) транспортуються в живі клітини (Loke et al., 1989. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. PNAS USA 86:3474) в механізмі, що насичується, який, як передбачено, включає специфічні рецептори (Yakubov et al., 1989. PNAS USA 86:6454).

«Рибозим» є молекулою РНК, яка має РНК-каталітичну здатність (див. Сеч відносно огляду) і розщеплює специфічний сайт в РНК-мішені.

Згідно з даним винаходом, рибозими, які розщеплюють мРНК RTP801, можуть бути використані як інгібітори RTP801. Це може бути необхідним у випадках, коли антисмислова терапія обмежена стехіометричними міркуваннями (Sarver et al., 1990. Gene Regulation and Aids. pp. 305-325). Потім можуть бути використані рибозими, які націлені на послідовність RTP801. Кількість молекул РНК, які розщеплюються рибозимом, більше, ніж кількість, передбачена стехіохімією (Hampel and Tritz, 1989; Uhlenbeck, 1987).

Рибозими каталізують розщеплення фосфодієфірного зв'язку РНК. Були ідентифіковані декілька структурних сімейств рибозимів, що включають інтрони Групи I, РНКазу Р, рибозим вірусу гепатиту дельта, молотоголові рибозими і шпильковий рибозим, спочатку одержаний з негативного ланцюга сателітної РНК вірусу кільцевої плямистості тютюну (sTRSV) (Sullivan, 1994; U.S. Pat. No. 5225347, стовпці 4-5). Два останніх сімейства одержані з віроїдів і вірусоїдів, в яких, як вважається, рибозим відділяє мономери від олігомерів, що створюються під час реплікації типу «кільця, що котиться» (Symons, 1989 і 1992). Мотиви молотоголових і шпилькових рибозимів є такими, що найчастіше адаптуються для транс-розщеплення мРНК для генотерапії (Sullivan, 1994). Тип рибозиму, що використовується в даному винаході, вибирають, як відомо в даній галузі. Шпилькові рибозими знаходяться в цей час у клінічному дослідженні і є рибозимами переважного типу. Звичайно цей рибозим має довжину 30-100 нуклеотидів. Доставка рибозимів схожа з доставкою AS-фрагментів і/або молекул siRNA.

Потрібно зазначити, що всі полінуклеотиди, які повинні використовуватись в даному винаході, можуть зазнавати модифікацій для поліпшення терапевтичних властивостей. Модифікації або аналоги нуклеотидів можуть бути введені для поліпшення терапевтичних властивостей полінуклеотидів. Поліпшені властивості включають збільшену стійкість до нуклеаз і/або збільшену здатність проникати через клітинні мембрани. Стійкість до нуклеаз, коли вона необхідна, забезпечується будь-яким відомим в даній галузі способом, який не заважає біологічній активності AS-полінуклеотиду, siRNA, кДНК і/або рибозимів, необхідних для даного способу застосування і доставки (Iyer et al., 1990; Eckstein, 1985; Spitzer and Eckstein, 1988; Shaw et al., 1991). Модифікації, які можуть бути зроблені в олігонуклеотидах для збільшення стійкості до нуклеаз, включають модифікацію гетероатому фосфору або кисню в фосфатному скелеті. Вони включають приготування метилфосфонатів, фосфоротіоатів, фосфородитів

оатів і олігомерів морфоліно. В одному варіанті здійснення це забезпечується використанням фосфоротіоатних зв'язків для зв'язування чотирьох-шести нуклеотидних основ 3'-кінця. Альтернативно, фосфоротіоатні зв'язки зв'язують всі нуклеотидні основи. Можуть бути використані інші модифікації, відомі в даній галузі, при яких зберігається біологічна активність, але стабільність до нуклеаз є істотно збільшеною.

Всі аналоги або модифікації полінуклеотиду можуть бути використані з даним винаходом, за умови, що вказані аналог або модифікація по суті не впливають на функцію цього полінуклеотиду. Ці нуклеотиди можуть бути вибрані з основ, що природно зустрічаються, або синтетично модифікованих основ. Основи, що природно зустрічаються, включають аденін, гуанін, цитозин, тимін і урацил. Модифіковані основи включають інозин, ксантин, гіпоксантин, 2-аміноаденін, 6-метил-, 2-пропіл- та інші алкіладеніни, 5-галогенурацил-5-галогенцитозин, 6-азацитозин і 6-азатимін, псевдоурацил, 4-тіоурацил, 8-галогенаденін, 8-аміноаденін, 8-тіоладенін, 8-тіоалкіладеніни, 8-гідроксиладенін, та інші 8-заміщені аденіни, 8-галогенгуаніни, 8-аміногуаніни, 8-тіолгуанін, 8-тіоалкілгуанін, 8-гідроксигуанін та інші заміщені гуаніни, інші аза- і деазааденіни, інші аза- і деазагуаніни, 5-трифторметилурацил і 5-трифторцитозин.

Крім того, можуть бути одержані аналоги полінуклеотидів, в яких структура нуклеотиду фундаментально змінена і які більш підходять як терапевтичні або експериментальні реагенти. Прикладом аналога нуклеотиду є пептиднуклеїнова кислота (ПНК), в якій дезоксирибоза- (або рибоза)-фосфатний скелет в ДНК (або РНК) замінений поліамідним скелетом, який схожий зі скелетом, що виявляється у пептидах. Було показано, що ПНК-аналоги стійкі до деградації ферментами і мають пролонговані періоди існування *in vivo* і *in vitro*. Крім того, було показано, що ПНК сильніше зв'язуються з комплементарною послідовністю ДНК, ніж молекула ДПК. Це спостереження зв'язують з відсутністю відштовхування зарядів між ланцюгом ПНК і ланцюгом ДНК. Інші модифікації, які можуть бути вироблені у відношенні олігонуклеотидів, включають полімерні скелети, циклічні скелети або ациклічні скелети молекул.

Поліпептиди, що використовуються в даному винаході, можуть бути також модифіковані, не обов'язково хімічно модифіковані, для поліпшення їх терапевтичної активності. «Хімічно модифікований», при посиленні на поліпептиди, означає поліпептид, в якому щонайменше один з амінокислотних залишків модифікований або природними процесами, такими як процесинг або інші посттрансляційні модифікації, або хімічними способами модифікації, які добре відомі в даній галузі. Серед численних відомих модифікацій типові, але не виняткові, приклади включають: ацетилювання, ацилювання, амідування, АДФ-рибозилування, глікозилування, утворення GPI-якора (глікозилфосфатидилінозит-якора), ковалентне приєднання ліпиду або похідного ліпиду, метилування, міристилування, ПЕГілування, пренілування

ня, фосфорилювання, убіквітинування або будь-який подібний процес.

Додаткові можливі поліпептидні модифікації (такі як ті, що походять зі зміни нуклеїнових кислот) включають наступні модифікації:

«Консервативна заміна» - означає заміну амінокислоти в одному класі амінокислот амінокислотою того ж самого класу, де клас визначається звичайними фізико-хімічними властивостями бічних ланцюгів амінокислот і високими зустрічностями заміни в гомологічних поліпептидах, що виявляються в природі, які визначаються, наприклад, з використанням стандартної матриці амінокислотних заміни Дайхоффа або матриці BLOSUM. Були виділені шість основних класів бічних ланцюгів амінокислот, які включають: Клас I (Cys); Клас II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Клас III (Asn, Asp, Gln, Glu); Клас IV (His, Arg, Lys); Клас V (Ile, Leu, Val, Met); і Клас VI (Phe, Tyr, Trp). Наприклад, заміна залишком Asp іншого залишку класу III, такого як Asn, Gln або Glu, є консервативною заміною.

«Неконсервативна заміна» - означає заміну амінокислоти в одному класі амінокислотою з іншого класу: наприклад, заміну Ala, залишком класу II, залишком класу III, таким як Asp, Asn, Glu або Gln.

«Делеція» - означає зміну в нуклеотидній або амінокислотній послідовності, в яких відсутні один або декілька нуклеотидів або амінокислотних залишків, відповідно.

«Інсерція» або «додавання» - означає зміну у нуклеотидній або амінокислотній послідовності, яке привело до додавання одного або декількох нуклеотидів або амінокислотних залишків, відповідно, у порівнянні з послідовністю, що природно зустрічається.

«Заміна» - заміна одного або декількох нуклеотидів або амінокислотних залишків іншими нуклеотидами або амінокислотами, відповідно. Що стосується амінокислотних послідовностей, ця заміна може бути консервативною або неконсервативною.

У додатковому варіанті здійснення даного винаходу поліпептид або поліпептид RTP801 може бути використаний для діагностики або детектування дегенерації жовтої плями в суб'єкті. Спосіб детектування може звичайно включати аналіз мРНК RTP801 або поліпептиду RTP801 в пробі, одержаній з суб'єкта.

«Детектування (детекція)» означає спосіб детектування захворювання. Цей термін може стосуватись детектування схильності до захворювання або до детектування тяжкості захворювання.

Під «гомологом/гомологією», в даному контексті, мають на увазі щонайменше приблизно 70%, переважно щонайменше приблизно 75% гомологію, переважно щонайменше приблизно 80% гомологію, більш переважно щонайменше приблизно 90% гомологію, навіть більш переважно щонайменше приблизно 95% гомологію, наприклад, щонайменше приблизно 97%, приблизно 98%, приблизно 99% або навіть приблизно 100% гомологію. Даний винахід розглядає також те, що ці поліпептиди і поліпептиди можуть бути використані таким же чином, що і описані тут і вище зазначені поліпептиди і поліпептиди.

Альтернативно або додатково, «гомологія», відносно послідовностей, може стосуватись кількості положень з ідентичними нуклеотидами або амінокислотними залишками, поділений на кількість нуклеотидів або амінокислотних залишків в більш короткій з цих двох послідовностей, причому зіставлення цих двох послідовностей може бути виконане відповідно до алгоритму Вільбура і Ліпмана ((1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:726): наприклад, з використанням розміру вікна 20 нуклеотидів, довжини слова 4 нуклеотида і штрафу за гел 4, і аналіз та інтерпретація даних послідовностей, в тому числі зіставлення з використанням комп'ютера, можуть бути зручним чином виконані із застосуванням комерційно доступних програм (наприклад, *Intelligenetics™ Suite*, *Intelligenetics Inc.*, CA). Коли говориться, що послідовності є схожими або мають деяку міру ідентичності або гомології з послідовностями ДНК, тимідин (T) в цій послідовності ДНК розглядається як рівний урацилу (U) в послідовності РНК. РНК-послідовності в рамках даного винаходу можуть бути одержані з ДНК-послідовностей або їх комплементів заміною тимідину (T) в ДНК-послідовності урацилом (U).

Додатково або альтернативно, схожість або гомологія амінокислотних послідовностей можуть бути визначені з використанням програми BlastP (Altschul et al., *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402), доступної в NCBI. Наступні посилання забезпечують алгоритми для порівняння відносної ідентичності або гомології амінокислотних залишків двох поліпептидів, і додатково або альтернативно, що стосується попередніх описів, описи в цих посиланнях можуть бути використані для визначення процентної гомології Smith et al., (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489; Smith et al., (1983) *Nucl. Acids Res.* 11:2205-2220; Devereux et al., (1984) *Nucl. Acids Res.* 12:387-395; Feng et al., (1987) *J. Molec. Evol.* 25:351-360; Higgins et al., (1989) *CABIOS* 5:151-153; and Thompson et al., (1994) *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.

«Ті, що мають щонайменше X% гомологію» - відносно двох амінокислотних або нуклеотидних послідовностей означає процент залишків, які є ідентичними в цих двох послідовностях при оптимальному зіставленні цих послідовностей. Таким чином, ідентичність 90% амінокислотних послідовностей означає, що 90% амінокислот в двох або більше оптимально зіставлених поліпептидних послідовностях є ідентичними.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу стосується фармацевтичної композиції, яка містить інгібітор RTP801 у терапевтично ефективній кількості як активний інгредієнт і фармацевтично прийнятний носій. Цим інгібітором може бути біологічний інгібітор, органічна молекула, хімічна молекула і т.д., вказана фармацевтична композиція може містити інгібітор RTP801, який є поліпептидом, який містить послідовні нуклеотида, що мають послідовність, яка є антисмисловою послідовністю відносно послідовності, поданої на Фіг. 1 (SEQ ID NO:1). Крім того, інгібітором RTP801 може бути вектор, що містить ці поліпептиди. Крім того, інгібітором RTP801 може бути моноклональне антитіло, яке специфічно зв'язується з епітопом, що містить 4-25 амінокислот, представленим

на Фігурі 2 (SEQ ID NO:2), або молекула РНК, яка націлена на мРНК гена RTP8013, така як молекула siRNA (необов'язково зображена в таблицях А-С, і, зокрема, siRNA з номерами 22, 23, 25, 27, 39, 41, 42, 49 і 50 таблиці А) або рибозим.

Активні інгредієнти фармацевтичної композиції можуть включати олігонуклеотиди, які є стійкими до нуклеаз, необхідні для застосування на практиці даного винаходу, або їх фрагмент, який, як показано, має ту ж саму дію, націлений проти відповідної послідовності (відповідних послідовностей), або рибозим. Можуть бути використані комбінації активних інгредієнтів, описаних в даному винаході, в тому числі комбінації антисмислових послідовностей.

Додатковий варіант здійснення даного винаходу забезпечує застосування терапевтично ефективного дози інгібітору RTP801 для приготування лікарського засобу для стимуляції видужання в пацієнтові, який страждає від захворювання або пошкодження спинного мозку. В одному варіанті здійснення цим інгібітором є переважно siRNA. В іншому варіанті здійснення цим інгібітором є переважно Структура А, зображена тут.

Даний винахід був описаний ілюстративним чином, і повинно бути зрозуміло, що термінологія, яка була використана, призначена для опису, а не для обмеження.

Очевидно, що багато які модифікації і варіації даного винаходу можливі в світлі наведених вище описів. Таким чином, повинно бути зрозуміло, що в межах обсягу прикладеної формули винаходу даний винахід може бути використаний на практиці іншим чином, ніж він конкретно описаний.

У всій цій заявці, різні публікації, в тому числі патенти США, використовуються з наведенням автора і року, а патенти з наведенням номера. Описи цих публікацій і патентів і заявок на патент в їх повному вигляді включені тим самим як посилання в цю заявку для більш повного опису стану галузі, якої стосується цей винахід.

Короткий опис фігур

Фіг. 1 описує детально кодуючу послідовність гена RTP801 (SEQ ID NO:1):

Фіг. 2 описує детально амінокислотну послідовність поліпептиду RTP801 (SEQ ID NO:2):

Фіг. 3 є діаграмою, що зображає екзони, CDS, SNP людини і положення різних молекул нуклеїнових кислот, які є специфічними для людини або специфічними для людини, миші і щурів паралельно;

Фіг. 4А-Н зображає панель Вестерн-блот-аналізу, одержану після застосування різних дволанцюгових нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу до першої лінії клітин людини, причому цей експеримент проводили двічі, з позначенням цих експериментів як експеримент 1 і експеримент 2, причому рівень експресії р110а і р85 представлений як контролі нанесення, та інтенсивність (щільність) смуги RTP801 є мірою інгібуючої активності конкретної застосованої дволанцюгової нуклеїнової кислоти;

Фіг. 5А-Р зображає панель Вестерн-блот-аналізу, одержану після застосування різних дволанцюгових нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу до другої лінії клітин людини, при-

чому цей експеримент проводили двічі, з позначенням цих експериментів як експеримент 1 і експеримент 2, причому рівень експресії р110а і р85 представлений як контролі нанесення, та інтенсивність (щільність) смуги RTP801 є мірою інгібуючої активності конкретної застосованої дволанцюгової нуклеїнової кислоти;

Фіг. 6А-С зображає панель Вестерн-блот-аналізу, одержану після застосування різних дволанцюгових нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу до першої лінії клітин людини при різних концентраціях, а саме 10 нМ (5А), 5 нМ (5В) і 1 нМ (5С) причому цей експеримент проводили двічі, з позначенням цих експериментів як експеримент 1 і експеримент 2, причому рівень експресії р110а і р85 представлений у вигляді контролів нанесення, та інтенсивність (щільність) смуги RTP801 є мірою інгібуючої активності конкретної застосованої дволанцюгової нуклеїнової кислоти;

Фіг. 7 зображає панель Вестерн-блот-аналізу, одержану із застосуванням різних дволанцюгових нуклеїнових кислот відповідно до даного винаходу до мишачої клітинної лінії, причому цей експеримент проводили двічі, з позначенням цих експериментів як експеримент 1 і експеримент 2, причому рівень експресії р110а і р85 представлений у вигляді контролів нанесення, та інтенсивність (щільність) смуги RTP801 є мірою інгібуючої активності конкретної застосованої дволанцюгової нуклеїнової кислоти;

Фіг. 8 показує результати експерименту в мишачій модельній системі AMD;

Фіг. 9 показує результати додаєкових експериментів в мишачій модельній системі AMD;

Фіг. 10 показує результати експериментів в модельній системі AMD примату не людини;

Фіг. 11А-В показує результати додаткових експериментів в модельній системі AMD примату не людини;

Фіг. 12А-В показує результати додаткових експериментів в модельній системі AMD примату не людини;

Фіг. 13А-В представляє аналіз експериментальних результатів, одержаних в моделі AMD примату не людини;

Фіг. 14 представляє додатковий аналіз експериментальних результатів, одержаних в моделі AMD примату не людини;

Фіг. 15А-С показує результати експерименту з використанням інстиляції RTP801-експресуючої плазмиди у мишей;

Фіг. 16А-С показує результати моделі короткострокового (7 днів) впливу сигаретним димом у мишах з нокаутом RTP801 (KO) і мишах дикого типу (WT);

Фіг. 17А-С показує результати моделі впливу сигаретним димом у мишах дикого типу (WT), яким вводили інстиляцією активну анти-RTP801 (REDD14) і контрольну (REDD8) siRNA;

Фіг. 18 показує результати експериментів з мишами KO з нокаутом RTP801 в довгостроковій моделі CS;

Фіг. 19 показує результати експериментів в мишачій моделі ARF;

Фіг. 20 показує результати експериментів в мишачій модельній системі діабетичної ретинопатії;

Фіг. 21 показує результати додаткових експериментів в мишачій модельній системі діабетичної ретинопатії;

Фіг. 22 показує результати додаткових експериментів в мишачій модельній системі діабетичної ретинопатії;

Фіг. 23 показує результати експериментів комбінованого інгібування RTP801/VEGF в мишачій моделі CNV;

Фіг. 24 показує результати додаткових експериментів комбінованого інгібування RTP801/VEGF в мишачій моделі CNV;

Фіг. 25 показує результати експериментів, що досліджують дію siRNA RTP801 на експресію гена в RPE і нейроретині;

Фіг. 26A-B показує додаткові результати експериментів, що досліджують дію siRNA RTP801 на експресію гена в RPE і нейроретині;

Фіг. 27 показує результати експериментів, які демонструють, що RTP801NP є таким же активним, що і RTP801.

Приклади

Автори вважають, що без додаткового роз'яснення фахівець з кваліфікацією в даній галузі може, з використанням попереднього опису, використати даний винахід в його найбільш повній мірі. Таким чином, наступні переважні конкретні варіанти здійснення повинні розглядатись тільки як ілюстративні, а не такі, що обмежують яким-небудь чином заявлений винахід.

Стандартні протоколи молекулярної біології, відомі в даній галузі, не описані конкретно тут, звичайно виконуються по суті, як описано в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989, 1992) і Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Стандартні протоколи органічного синтезу, відомі в даній галузі, не описані конкретно тут, звичайно виконуються по суті, як описано в *Organic syntheses: Vol. 1-79. editors vary*, J. Wiley. New York (1941-2003); Gewert et al., *Organic synthesis workbook*, Wiley-VCH, Weinheim (2000); Smith & March, *Advanced Organic Chemistry*, Wiley-Interscience; 5th edition (2001).

Стандартні способи медичної хімії, відомі в даній галузі, не описані конкретно тут, звичайно виконуються по суті, як описано в серії "Comprehensive Medicinal Chemistry" різними авторами і видавцями. Pergamon, що публікується Press.

Ознаки даного винаходу, описані в цьому описі, формула винаходу і/або рисунки можуть бути як окремо, так і в будь-якій комбінації матеріалом для реалізації цього винаходу в його різних формах.

Приклад 1

Загальні матеріали і способи

Якщо немає інших вказівок, наступні матеріали і способи використали у Прикладах 1-5.

Культура клітин

Першу лінію клітин людини, а саме клітини HeLa (Американська Колекція Типових Культур)

культивували таким чином: клітини HeLa (Американська Колекція Типових Культур) культивували, як описано в Czauderna F et al., (Czauderna, F., Fechtner, M., Aygun, H., Arnold, W.S., Klippel, A., Giese, K. & Kaufmann, J. (2003). *Nucleic Acids Res*, 31, 670-82).

Другою лінією клітин людини була клітинна лінія кератиноцитів людини, яку культивували таким чином: кератиноцити людини культивували при 37°C в модифікованому способом Дульбекко середовищі Ігла (DMEM), що містить 10% ФТС.

Мишачою клітинною лінією була лінія B16V (Американська Колекція Типових Культур), яка культивується при 37°C в модифікованому способом Дульбекко середовищі Ігла (DMEM), що містить 10% ФТС. Умови культивування були такими, як описані в *Methods Find Exp in Pharmacol*. 1997 May; 19(4):231-9.

У кожному випадку ці клітини піддавали описаним тут експериментам при щільності приблизно 50000 клітин на ямку і дволанцюгову нуклеїнову кислоту за даним винаходом додавали при 20 нМ, причому цю дволанцюгову нуклеїнову кислоту об'єднували в комплекс з використанням 1 мкг/мл відповідного ліпиду.

Індукція подібного гіпоксії стану

Клітини обробляли CoCl₂ для індукції подібного гіпоксії стану таким чином: трансфекції siRNA проводили в планшетах 10 см (30-50% конфлюентність), як описано Czauderna et al., 2003; Kretschner et al., 2003). Коротко, siRNA трансфікували додаванням заздалегідь приготованого 10х концентрованого комплексу GB і ліпиду у безсироватковому середовищі до клітин в повному середовищі. Загальний об'єм трансфекції був 10 мл. Кінцева концентрація ліпиду була 1,0 мкг/мл; кінцева концентрація siRNA була 20 нМ, якщо немає іншої вказівки. Індукцію гіпоксичних реакцій проводили додаванням CoCl₂ (100 мМ) безпосередньо до середовища для культури тканини за 24 години перед лізісом.

Приготування клітинних екстрактів та імуноблотинг

Приготування клітинних екстрактів та імуноблот-аналіз проводили по суті, як описано Klippel et al. (Klippel, A., Escobedo, M.A., Wachowicz, M.S., Apell, G., Brown, T.W., Giedlin, M.A. Kavanaugh, W.M., Apell, G., Escobedo, M.A. (Williams, L.T. (1996). *Mol Cell Biol*. 16. 4117-27). Поліклональні антитіла проти повнорозмірного RTP801 і скерували імунізацією кроликів продукуючими рекомбінантний білок RTP801 бактеріями з експресуючого вектора pET19-b (Merck Bioscience GmbH, Schwalbach, Germany). Мишачі моноклональні анти-p110a-антитіла і анти-p85-антитіла були описані Klippel et al. (supra).

Приклад 2

Зменшення експресії RTP801 в першій клітинній лінії людини

Одержували різні дволанцюгові нуклеїнові кислоти. Їх локалізація відносно мРНК і CDS, а також SNP людини в нуклеїновій кислоті, що кодує RTP801 людини (номер доступу банку даних NM_019058), зображена на Фіг. 3. Цю першу клітинну лінію людини контактували з вказаними дволанцюговими нуклеїновими кислотами, як опи-

сано у прикладі 1. Після індукції подібного гіпоксії стану і обробки вказаними дволанцюговими нуклеїновими кислотами ці клітини лізували і клітинні лизати піддавали імуноблотингу. Р110а, який є каталітичною одиницею РІ-кінази, і р85 використали як контроль нанесення. Інтенсивність смуги RTP801, візуалізована з використанням поліклональних антитіл до RTP801, є мірою активності окремих дволанцюгових нуклеїнових кислот на прикладі зменшення рівня експресії RTP801.

Кожну і будь-яку з дволанцюгових нуклеїнових кислот модифікували таким чином, що група 2'-О-Ме була присутньою на першому, третьому, п'ятому, сьомому, дев'ятому, одинадцятому, тринадцятому, п'ятнадцятому, сімнадцятому і дев'ятнадцятому нуклеотиді антисмислового ланцюга, причому та ж сама модифікація, тобто група 2'-О-Ме, була присутньою при другому, четвертому, шостому, восьмому, десятому, дванадцятому, чотирнадцятому, шістнадцятому і вісімнадцятому нуклеотиді смислового ланцюгу. Крім того, потрібно зазначити, що у випадку цих конкретних нуклеїнових кислот за даним винаходом перший сегмент є ідентичним першому ланцюгу, а другий сегмент є ідентичним другому ланцюгу і ці нуклеїнові кислоти мають також затуплені кінці.

Ці експерименти виконували двічі, і окремі результати показані на Фіг. 4А-Н, де ці експерименти позначені як експеримент 1 і експеримент 2, відповідно.

Позначення h, hr і hmr на Фіг. 4А-Н вказують на те, що відповідна дволанцюгова нуклеїнова кислота була сконструйована таким чином, щоб бути націленою на ділянку мРНК RTP801, яка є специфічною для мРНК RTP801 людини (h), щоб бути націленою на ділянку мРНК RTP801, яка є специфічною для мРНК RTP801 людини і щура (hr), і щоб бути націленою на ділянку мРНК RTP801, яка є специфічною для мРНК RTP801 людини, миші і щурів (hmr). Дволанцюгову нуклеїнову кислоту, названу № 40.1, використовували як позитивний контроль, а необроблені клітини (UT+) використовували як негативний контроль.

Відповідно до цих результатів, виявилось, що наступні дволанцюгові нуклеїнові кислоти є особливо застосовними в негативній регуляції експресії RTP801: № 14, № 15, № 20, № 21, № 22, № 23, № 24, № 25, № 27, № 39, № 40, № 41, № 42, № 43, № 44, № 49 і № 50 (див. таблицю А).

Приклад 3

Зменшення експресії RTP801 у другій клітинній лінії людини

Експерименти, описані в зв'язку з Прикладом 2, повторювали з використанням другої клітинної лінії людини, як описано в Прикладі 1, і ці результати зображені на Фіг. 5А-Е.

Як можна зробити висновок з цих фігур, результати, одержані в зв'язку з експериментами, описаними у Прикладі 2, були підтверджені з використанням цієї другої клітинної лінії людини.

Приклад 4

Ефект дози RTP801-специфічних дволанцюгових нуклеїнових кислот

У цьому експерименті досліджували ефект дози RTP801-специфічних дволанцюгових нуклеїнових кислот.

Для цієї мети клітини HeLa обробляли, як у зв'язку з Прикладами 2 і 3, причому концентрація дволанцюгової нуклеїнової кислоти в культуральному бульйоні була 10 нМ, 5 нМ і 1 нМ. Як позитивний контроль, використали дволанцюгову нуклеїнову кислоту № 40.1, як негативний контроль необроблені клітини (UT+). Зчитування було таким же, як описано у зв'язку з Прикладами 2 і 3. Конкретними дволанцюговими нуклеїновими кислотами були нуклеїнові кислоти з внутрішніми посилювальними номерами 14, 22, 23 і 27, які направлені на сегменти мРНК RTP801, які є спільними для людини, миші і щурів, і дволанцюгові нуклеїнові кислоти з внутрішніми посилювальними номерами 39 і 42, які направлені на сегменти мРНК RTP801, специфічні для RTP801 людини.

Ці результати показані на Фіг. 6А-С. З вказаних фігур можна бачити, що є явна концентраційна залежність ефекту дволанцюгових нуклеїнових кислот, специфічних у відношенні RTP801, причому молекули нуклеїнових кислот, які мають внутрішні посилювальні номери 1, 15, 20, 21, 24, 40, 41, 43, 44, 22, 23, 27, 39, 42, 40.1, 44.1 і 14, переважно, 22, 23, 27, 39, 42, 40.1 і 44.1 і, більш переважно, 14, 23 і 27 і, переважно, кожна з вказаних молекул нуклеїнових кислот, що мають конкретні розподіли модифікацій, описані для них в частині Прикладу тут, є особливо ефективними.

Приклад 5

Видова специфічність RTP801-специфічної дволанцюгової нуклеїнової кислоти

Були сконструйовані дволанцюгові нуклеїнові кислоти за даним винаходом проти сегментів мРНК RTP801, які є однаковими або різними в різних видах. Для випробування, чи є видова специфічність RTP801-специфічної дволанцюгової нуклеїнової кислоти, дволанцюгові нуклеїнові кислоти з внутрішніми посилювальними номерами 14, 22, 23 і 27, які направлені на сегмент мРНК RTP801, який є консервативним серед мРНК RTP801 людини, миші і щурів, і дволанцюгові нуклеїнові кислоти з внутрішніми посилювальними номерами 39 і 42, які направлені на сегмент мРНК RTP801, який є специфічним для мРНК RTP801 людини, тобто які направлені на сегмент, який, як такий, не присутній в миші або щурів, порівнювали відносно негативної регуляції RTP801 з використанням того ж самого підходу і зчитування, які описані у Прикладі 1 і 2.

Хоча всі використані дволанцюгові нуклеїнові кислоти є в принципі активними проти мРНК людини і, як показано у попередніх прикладах, є також придатними для негативної регуляції експресії RTP801. після використання мишачої клітинної лінії тільки ті дволанцюгові нуклеїнові кислоти, які є також специфічними відносно мРНК RTP801 миші, ефективно зменшували експресію RTP801, а саме, дволанцюгові нуклеїнові кислоти з номерами 14, 22, 23 і 27.

З цього результату можна зробити висновок, що можна конструювати направлені на RTP801 дволанцюгові нуклеїнові кислоти, які є специфічними тільки відносно одного або декількох видів. Це робить можливим застосування однієї і тієї ж молекули в моделях тварин, а також в людях.

Приклад 6

Експериментальні моделі, способи і результати, що стосуються дегенерації жовтої плями

Спокуси даного винаходу випробовували у наступній моделі хороїдальної неоваскуляризації тварини (CNV). Ця відмітна ознака вологої AMD індукується в моделях тварин лазерною обробкою.

А) Мишача модель

Індукція хороїдальної неоваскуляризації (CNV)

Хороїдальна неоваскуляризація (CNV), відмітна ознака вологої AMD, індукується лазерною фотокоагуляцією (532 нм, 200 мВ, 100 мс, 75 мкм) (OcuLight GL, Iridex, Mountain View, CA), що виконується на обох очах кожної миші в день 0 одним індивідом, якому невідомий розподіл груп лікарських засобів. Лазерні «плями» наносили стандартизованим чином навколо зорового нерва з використанням системи доставки у вигляді щільної лампи і покривного скла у вигляді контактної лінзи.

Групи обробки

CNV індукували у наступних групах мишей (самців у віці 6-8 тижнів):

(1) 12 мишей WT;

(2) 12 мишей з нокаутом RTP801;

(3) 12 мишей WT, ін'єктованих 0,25 мкг синтетичної стабілізованої активної анти-RTP801-siRNA (REDD14) в одному оці і неактивною анти-RTP801-siRNA (REDD8 негативний контроль) в парному оці в дні 0 і 7;

(4) 12 мишей WT, ін'єктованих 0,1 мкг синтетичної стабілізованої активної анти-RTP801-siRNA (REDD14) в одному оці і ЗФР (негативний контроль) в парному оці в дні 0 і 7;

(5) 12 мишей WT, ін'єктованих 0,05 мкг синтетичної стабілізованої активної анти-RTP801-siRNA (REDD14) в одному оці і ЗФР (негативний контроль) в парному оці в дні 0 і 7.

Обидва ока кожної миші обробляли лазером. Ін'єктований об'єм був 2 мкл.

Оцінка

1. Цей експеримент закінчували в день 14. Для оцінки ока повністю видаляли (енуклеювали) з очного яблука і фіксували 4% параформальдегідом протягом 30 хвилин при 4°C. Нейросенсорну сітківку відділяли і відрізали від зорового нерва. Комплекс RPE-хороїд-склера, що залишився, плоско монтували в Immu-Mount (Vectashield Mounting Medium, Vector) і покривали покривним склом. Плоскі препарати досліджували скануючим лазерним конфокальним мікроскопом (TCS SP, Leica, Germany). Судини візуалізували збудженням синім аргонним лазером. Горизонтальні оптичні зрізи (з кроком 1 мкм) одержували з поверхні комплексу RPE-хороїд-склера. Найбільш глибоку фокальну площину, в якій могла бути ідентифікована навколишня хороїдальна судинна сітка, що з'єднується з пошкодженням, оцінювали як дно цього пошкодження. Будь-яка судина в обробленій лазером зоні і зовнішній відносно цієї посилальної площини, оцінювали як CNV. Зображення кожного зрізу зберігали в цифровому вигляді. Площу пов'язану з CNV флуоресценцією вимірювали комп'ютеризованим аналізом зображення з використанням програми Leica TCS SP. Підсумовування всієї флуоресцентної площі в кожному горизонтальному зрізі використали як показник для об'єму CNV.

2. Окремих мишей дикого типу (WT) (5 очей на групу) використали для оцінки експресії мРНК RTP801 в CNV (а також експресії інших генів, що стосуються AMD) (оброблених і не оброблених siRNA) з використанням ПЛР реального часу на РНК, екстрагованих з RPE/хороїдів або з нейроретини.

Результати

1. Миші з нокаутом RTP801 виявляли на 30% менше підтікання кровоносних судин у порівнянні з мишами дикого типу (WT) після індукції CNV; див. Фіг. 8.

2. Синтетична стабілізована siRNA проти RTP801, REDD14, індукувала залежне від дози зменшення об'єму CNV. Максимальне ~70% інгібування у порівнянні з ЗФР-ін'єктованими очима досягалось при дозі 0,25 мкг на око REDD14 (SEQ ID NO:14 в таблиці 1, SEQ ID NO:16 (смислова) і 66 (антисмислова)). При тій же самій дозі як siRNA негативного контролю. REDD8, так і анти-GFP-siRNA виявляли тільки 27% і 33% зменшення об'єму CNV, відповідно, що підтверджує перевершуючу ефективність REDD14, а також специфічність її дії.

В) Модель примату не людини

Індукція CNV

Всім самцям собакоподібних мавп (Macaca fascicularis) у віці 2-6 років використали для цього дослідження. Хороїдальну неоваскуляризацію (CNV) індукували навколомакулярною лазерною обробкою обох очей перед введенням дози. У жовтій плямі вміщували дев'ять пошкоджень лазером [OcuLight GL (532 nm) Laser Photo-coagulator with an IRIS Medical® Portable Slit Lamp Adaptor] і лазерні «плями» в правому оці були дзеркальним відображенням розміщення плям в лівому оці. Приблизні параметри лазера були наступними: розмір плями: діаметр 50-100 мкм; потужність лазера: 300-700 мліват; час експонування: 0,1 секунди.

Обробка

Відразу ж після лазерної обробки обидва ока всіх тварин піддавали єдиній ін'єкції в склоподібне тіло. У ліве око вводили дозу 350 мкг синтетичної стабілізованої siRNA проти RTP801 (тієї ж самої siRNA, яку використали в дослідженні з мишами) в кінцевому об'ємі 50 мкл, тоді як в контралатеральне око вводили 50 мкл ЗФР (носія).

Оцінка

1. Всіх тварин піддавали щоденному обстеженню відносно споживання їжі і вимірюванням маси тіла.

2. Двох мавп евтанізували в день 6 після індукції CNV. Їх очі видаляли з очних яблук і задній полюс кришталика сплющували. Потім вирізали ділянку центральної ямки сітківки і розділяли на хороїди і нейроретину, які окремо заморожували (для кожної тварини) в рідкому азоті для подальшого використання для екстракції РНК і оцінки з використанням ПЛР реального часу експресії RTP801.

3. Флуоресцентні ангіограми виконували перед дослідженням і в кінці тижнів 1, 2 і 3 після індукції CNV. Отримували фотографії з використанням камери fundus (TRC-50EX Retina Camera). Зображення збирали з використанням системи TOPCON IMAGENET™. Флуоресцентний барвник (10% флу-

оресцеїн-натрій, приблизно 0,1 мл/кг) ін'єкували через отвори судинного доступу. Фотографії отримували при декількох інтервалах часу після ін'єкції барвника для включення артеріальної фази, ранньої артеріовенозної фази і декількох пізніх артеріовенозних фаз для оцінки неоваскуляризації і для моніторингу підтікання флуоресцеїну, пов'язаного з пошкодженнями CNV. Інтерпретацію і аналіз флуоресцеїнових ангіограм проводили незалежно два офтальмологи.

Неоваскуляризацію (NV) оцінювали в ранніх ангіограмах і кожному пляму оцінювали згідно з наступною схемою:

- 0 - немає ознак NV
- 0,5 - підозріла пляма
- 1 - «гаряча» пляма
- 2 - NV в лазерному опіку
- 3 - явна NV

Підтікання оцінювали згідно з наступною схемою:

- 0 - немає підтікання
- 0,5 - підозріла пляма
- 1 - явне невелике підтікання плями
- 2 - підтікання, що згодом збільшується
- 3 - підтікання, більше, ніж попередні межі (явно).

Крім того, розмір кожної плями порівнювали між ранньою і пізньою ангіограмами з використанням морфометричних вимірювань і розраховували збільшення розміру плями, що походить з підтікання.

4. Електроретинограми (ERG) реєстрували з використанням електроретинографу Еріс 2000 згідно з Sierra's SOP і специфічними для даного дослідження SOP, що включають використання апарату Ганцфілда, при попередньому дослідженні і в кінці тижня 3. Наведені в таблиці дані ERG оцінювались ветеринаром-офтальмологом.

Це дослідження закінчували в день 21 після індукції CNV. Макроскопічну аутопсію і гістологічне дослідження виконували на органах і тканинах, в тому числі очях.

Результати

1. siRNA проти RTP801 зменшувала експресію RTP801 в RPE-хороїдах оброблених лазером тваринах, як виміряно в день 6 після індукції з використанням ПЛР реального часу (див. Фіг. 10).

2. Порівняння оцінки плям відносно підтікання і неоваскуляризації між парними очима в кожній окремій мавпі виявило, що обидві з цих патологічних характеристик зменшувались в очях, ін'єктованих siRNA RTP801, у порівнянні з контролем (відносно результатів підтікання див. Фіг. 11; відносно результатів неоваскуляризації див. Фіг. 12).

3. Розрахунок загальної кількості плям з більш високими клінічно-релевантними оцінками (2 і 3) підтікання або неоваскуляризації у всіх ін'єктованих siRNA очях знову виявив, що ін'єктовані siRNA очі були менш ураженими (див. Фіг. 13, a+b).

4. Всі дані оцінки відносно підтікання плям і неоваскуляризації піддавали статистичній обробці. Існування відмінностей між обробкою siRNA і контрольними обробками аналізували розрахунком дельта між середніми рангами плям контрольного правого (R) ока та ін'єктованого siRNA лівого (L) ока (дельта=R-L). Значущість цієї відмінності роз-

раховували з використанням непараметричного статистичного методу, критерію знакових рангів Уїлкоксона одностороннього критерію. Пізні фази ангіограм (ранню артеріальну, артеріовенозну і пізню венозну) аналізували окремо протягом кожного тижня (1, 2 і 3).

Таблиця 1 показує значущість (односторонній критерій) рангової відмінності підтікання від 0 для кожної групи (р-величини <0,05 підкреслені). Значуще рангове зменшення підтікання було виявлене в лівих очях (оброблених siRNA) відносно правих (оброблених плацебо) в тижні 2 і 3 в пізніх ангіограмах.

Таблиця 1

| Підтікання | | Величина Р |
|----------------|---------|-------------------------------------|
| Ангіограми | Тиждень | Критерій знакових рангів Уїлкоксона |
| Рання | 1 | 0,2500 |
| | 2 | 0,5000 |
| | 3 | 0,5000 |
| Артеріовенозна | 1 | 0,3438 |
| | 2 | 0,1250 |
| | 3 | 0,2344 |
| Пізня | 1 | 0,1250 |
| | 2 | 0,0313 |
| | 3 | 0,0156 |

Зверніть увагу, що для оцінки параметрів підтікання звичайно використовуються пізні ангіограми.

Таблиця 2 показує значущість (односторонній критерій) рангової відмінності неоваскуляризації (NV) від 0 для кожної групи (р-величини <0,05 підкреслені).

Таблиця 2

| NV | | Величина Р |
|----------------|---------|-------------------------------------|
| Ангіограми | Тиждень | Критерій знакових рангів Уїлкоксона |
| Рання | 1 | 0,0781 |
| | 2 | 0,0313 |
| | 3 | 0,0313 |
| Артеріовенозна | 1 | 0,0625 |
| | 2 | 0,0313 |
| | 3 | 0,1563 |
| Пізня | 1 | 0,2500 |
| | 2 | 0,3438 |
| | 3 | 0,2500 |

Значуще рангове зменшення NV було виявлене в лівих очях відносно правих в тижні 2 і 3 в ранньому періоді і в артеріовенозному періоді в тижні 2.

Зверніть увагу, що для оцінки параметрів неоваскуляризації звичайно використовуються ранні ангіограми.

5. Кількісна морфометрична оцінка збільшення площі плям, що має місце між ранньою (артеріальна фаза) і пізньою (венозна фаза) ангіограмами внаслідок підтікання виявила, що цей параметр значуще зменшувався в лазерних плямах в ін'єк-

тованих siRNA очях (ліві очі, OS) у порівнянні з контролем (праві очі, OD). На Фіг. 14 показані два приклади. Ці діаграми демонструють відносне збільшення (в %) площі кожної плями в лівому і правому оці тварин №3315 і 3300.

Крім того, у всіх вищеописаних дослідженнях зазначалось, що анти-RTP801-siRNA не надавала шкідливих дій на електроретинограми (ERG), гістологію очей або на структуру і функцію інших органів і систем.

Підсумовування наведених вище експериментів і результатів:

1. Як генетичне (RTP801-/-), так і терапевтичне siRNA-інгібування експресії RTP801 в моделі індукованої лазером CNV вологої пов'язаної з віком дегенерації жовтої плями (вологої AMD) приводить до значущого зменшення об'єму CNV.

2. Позитивні результати були одержані в мишачій моделі і моделі примату не людини.

3. Патологічне і ERG-дослідження на мавпах не виявляло ніякої siRNA-опосередкованої токсичності ані в очях, ані в яких-небудь інших органах або системах.

С) Ефективність комбінованої терапії siRNA RTP801 (REDD14) і анти-VEGF-антитіла

Ефективність комбінованої терапії siRNA RTP801 (REDD14) і анти-VEGF-антитіла у лікуванні захворювань, в яких має місце CNV, досліджували в описаній вище мишачій моделі CNV.

А) Дослідження об'єму CNV

Об'єм хороїдальної неоваскуляризації (CNV) через 3 тижні після лазерного пошкодження розраховували з використанням конфокальної флуоресцентної мікроскопії, як описано раніше (Sakurai et al. IOVS 2003; 44:3578-85 і Sakurai et al. IOVS 2003; 44: 2743-2749). У попередніх дослідженнях автори виявили, що анти-VEGF-А-антитіло (Ab) зменшувало об'єм CNV залежним від дози чином. Доза 1 нг VEGF-A-Ab була вибрана для комбінованих досліджень REDD14+VEGF-A-Ab, оскільки ця доза мала проміжну інгібуючу дію: антитіло VEGF-A (Ab) (1 нг) зменшувало розмір CNV на 26,6%.

Головними результатами дослідження REDD14+антитіло VEGF-A (Ab) є:

- Додавання REDD14 при більш низькій дозі 0,05 мкг зменшувало розмір CNV на 27±4% у порівнянні з одним Ab VEGF-A.

- Додавання REDD14 при більш високій дозі 0,25 мкг зменшувало розмір CNV на 55±3% у порівнянні з одним Ab VEGF-A.

В) Дослідження підтікання CNV

Експеримент 1

Цей експеримент планували для ідентифікації потенційної адитивної або синергічної терапевтичної дії інгібування VEGF і RTP801 в моделі індукованої лазером хороїдальної неоваскуляризації в мишах.

Матеріали

- REDD14 (siRNA RTP801)

- REDD8 (негативний контроль)

- Анти-VEGF-антитіла

- Неспецифічний IgG (негативний контроль)

CNV індукували в день 0, як описано вище: тест-матеріал ін'єктували суб'єктам в день 0 і день 7.

Результати оцінювали Флуоресцеїною ангіографією в тижні 1, 3 і за допомогою вимірювання об'ємів CNV при тижні 3. Кожна тест-група складалась з 10 очей.

Експериментальні групи:

- VEGF-Ab 0,5 нг/око

- VEGF-Ab 1 нг/око

- VEGF-Ab 2 нг/око

- VEGF-Ab 4 нг/око

- REDD14 0,05 мкг/око

- REDD14 0,01 мкг/око

- REDD14 0,25 мкг/око

- REDD14 0,05 мкг/око+VEGF-Ab 1 нг/око

- REDD14 0,1 мкг/око+VEGF-Ab 1 нг/око

- REDD14 0,25 мкг/око+VEGF-Ab 1 нг/око

Контрольні групи

- ЗФР

- Неспецифічний IgG 2 нг/око

- REDD8 0,1 мкг/око

- REDD8 0,1 мкг/око+VEGF-Ab 1 нг/око

Результати

Результати наведеного вище експерименту представлені на Фігурах 23-24. Ці результати показують, що одночасне інтравітреальне введення VEGF-Ab і REDD14 приводить до збільшеного і залежного від дози інгібування хороїдальної неоваскуляризації і підтікання хороїдальних кровоносних судин, вираженого у зменшеній зустрічності плям Категорії 4 і зменшеній зустрічності плям Категорії 1.

Ангіограми розподіляли на категорії з використанням модифікації раніше опублікованої схеми напівкількісного розподілу за категоріями (1-4) (Sakurai et al. IOVS 2003; 44: 2743-2749). Пошкодження Категорії 1 розглядали як такі, що ніколи не утворюються, тобто як еквівалент повного запобігання. Пошкодження Категорії 4 розглядали як патологічно значущі, тобто як еквівалент пошкоджень, які могли б лікуватись у пацієнтів. Антитіло (Ab) VEGF-A (1 нг) зменшувало зустрічність пошкоджень Категорії 4 на одне око на 38±8% і збільшувало зустрічність пошкоджень Категорії 1 на одне око на 66±43%.

Головними результатами дослідження підтікання з використанням комбінації REDD14+Ab VEGF-A є:

- Додавання REDD14 при більш низькій дозі 0,05 мкг зменшувало зустрічність пошкоджень Категорії 4 на 66±12% у порівнянні з одним Ab VEGF-A.

- Додавання REDD14 при більш високій дозі 0,25 мкг зменшувало зустрічність пошкоджень Категорії 4 на 60±12% у порівнянні з одним Ab VEGF-A.

- Додавання REDD14 при більш високій дозі 0,25 мкг подвоювало зустрічність пошкоджень Категорії 1 у порівнянні з одним Ab VEGF-A.

Експеримент 2

Цей експеримент планували для дослідження дії REDD14 на експресію гена в RPE і нейроретині.

План експерименту

Групи:

- ЗФР

- REDD14 0.25 мг

Розмір групи був 5 очей. CNV індукували лазерною обробкою, як описано вище, в день 0; тест-

матеріал також ін'єктували в день 0 і дію оцінювали кількісним ПЛР-аналізом експресії гена в RPE і нейроретині в дні 0 і 5.

Результати

Результати описаного вище експерименту представлені на Фігурі 25. Ці результати показують, що введення REDD14 викликає:

- ~40% негативну регуляцію експресії RTP801 нижче фону як в RPE, так і в нейроретині (див. також Фіг. 26);

- ~70% позитивну регуляцію експресії PEDF над фоном в нейроретині (зверніть увагу: у ЗФР-ін'єктованих очах експресія PEDF негативно регулюється на 40% нижче фону);

- ~40% негативну регуляцію експресії VEGF164 нижче фону в RPE (зверніть увагу: у ЗФР-ін'єктованих очах експресія VEGF164 негативно регулюється на 20%);

- ~50% зменшення експресії MCP1 в RPE/хороїдах (Фіг. 26).

Загальні висновки з обох експериментів:

- Одночасне інгібування RTP801 і VEGF посилювало інгібуючу дію на хороїдальну неоваскуляризацію і неоваскулярне підтікання.

- Інгібування експресії RTP801 REDD14 не тільки запобігає негативній регуляції PEDF в моделі CNV, але і підсилює його експресію у порівнянні з фоном.

- Інгібування експресії RTP801 приводить до одночасної негативної регуляції MCP1, яка повинна мати протизапальну дію.

- Без зв'язування себе теорією, автори вважають, що збільшення експресії PEDF REDD14 може лежати в основі об'єднаної дії, що спостерігається, одночасного інгібування VEGF і RTP801.

(Примітка: PEDF є добре відомим антиангіогенним і нейропротективним фактором)

- Без зв'язування себе теорією, автори вважають, що зменшення експресії MCP1 REDD14 може також лежати в основі об'єднаної дії, що спостерігається, одночасного інгібування VEGF і RTP801.

(Примітка: MCP1 є добре відомим прозапальним хемокіном, що бере участь в патогенезі AMD)

Додаткові моделі AMD, які можуть бути використані для випробування способів даного винаходу:

- Ccl-2- або Ccr-2-недостатні тварини - недостатність будь-якого з цих білків викликає розвиток деяких з основних ознак AMD. Тварини, недостатні за цими білками, можуть бути використані для випробування способів даного винаходу.

Відносно додаткової інформації про моделі AMD тварин див.: Chader. Vision research 42 (2002) 393-399; Ambati et al., Nature Medicine 9(11) (2003) 1390-1397; Tolentino et al., Retina 24 (2004) 132-138.

D) Порівняння активності анти-RTP801-siRNA REDD14, що має 3'-фосфатну групу на кожному ланцюгу з активністю тієї ж самої молекули, що не має 3'-фосфату (REDD14NP) в моделі індукованої лазером CNV

Цей експеримент звичайно виконували і оцінювали, як описано вище. Одне око кожної миші (12 на групу) ін'єктували 0,25 мкг siRNA REDD14, тоді як інше око ін'єктували siRNA REDD14NP.

Результати

Обидві siRNA рівним чином ефективно зменшували об'єм CNV (Фігура 27).

Приклад 7

Моделі і результати, пов'язані з ХОХЛ і емфіземою

Сполуки даного винаходу випробовували в наступних моделях тварин:

- Модель індукованої сигаретним димом емфіземи: хронічний вплив сигаретним димом викликає емфізему в декількох іваринах, таких як, *inter alia*, миша, морська свинка.

- Індукована активністю легеневого протеаз емфізема.

- Модель емфіземи з інгібуванням VEGFR.

- Бронхіальна інстиляція з використанням нейтрофілів/панкреатичної еластази в гризунах.

- Індукована MMP (металопротеаза матриксу) емфізема.

- Індукована запаленням емфізема.

Крім того, моделі емфіземи можуть бути одержані з використанням генетичних способів (наприклад, миші, які несуть мутацію TSK), та емфізематозні тварини можуть бути одержані з використанням відомих модифікаторів сприйнятливості до емфіземи, таких як, *inter alia*, легенева пошкодження, альвеолярна гіперплазія, гіпероксія, обробка глюкокортикоїдами і харчування.

A. Оцінка впливу відсутності RTP801 на розвиток захворювання в мишачих моделях емфіземи (з використанням мишей з нокаутом RTP801)

(1) Індуковані сигаретним димом (CS) запалення і апоптоз ініціюють в 5 самцях мишей з нокаутом (KO) RTP801 і 5 контрольних мишах дикого типу у віці 4 місяців. Цих мишей піддають інтенсивному CS (як описано в Rangasamy et al., див. вище) протягом 7 днів. Необроблені миші KO і WT з експерименту з інгібуванням VEGFR, описаного вище, можуть служити як необроблені контрольні групи для цього експерименту. Ці легені потім роздувають агарозою, фіксують і заливають в парафін, у окислювальний стрес, що розвивається в мишах KO, оцінюють за допомогою:

a) імуногістохімічної локалізації і кількісного визначення 8-оксо-dG в зрізах легені;

b) імуногістохімічної локалізації і кількісного визначення активної каспази 3 в зрізах легені з використанням специфічних антитіл або кількісної оцінки кількості TUNEL-позитивних клітин;

c) вимірювання концентрації церамідів в легневих екстрактах;

d) вимірювання каспазної активності в легневих екстрактах.

(2) Довгострокова обробка сигаретним димом в мишах KO.

6 самиць мишей KO і 6 самиць мишей WT того ж віку піддавали інтенсивній обробці сигаретним димом (5 годин на день) під час періоду 6 місяців. Потім цих мишей умертвляли і середній інтерсептальний діаметр (параметр розвитку емфіземи) оцінювали з використанням морфометричного підходу.

B. Оцінка впливу відсутності RTP801 на прогресування захворювання в мишачих моделях емфіземи за допомогою інгібування ендogenous RTP801 з використанням внутрішньолегеневої доставки RTP801-інактивуючої siRNA

CS-індуковане запалення індукували 7-денною обробкою димом в 2 групах мишей C57BL6, 10 мишей на групу. Група 1: CS+доставка контрольної siRNA (REDD8); Група 2: CS+siRNA RTP801 (REDD14). Контрольні групи мишей інсталиували будь-яким типом siRNA, але тримали в умовах кімнатного повітря. Цих тварин оцінювали, як в описаному вище експерименті з мишами KO.

Способи

Вплив сигаретним димом (CS)

Вплив проводили (7 год./день. 7 днів на тиждень) спалюванням еталонних сигарет 2R4F (2,45 мг нікотину на одну сигарету), куплених в Tobacco Research Institute, University of Kentucky, Lexington, KY, USA), з використанням апарату, який утворює сигаретний дим (Model TE-10, Teage Enterprises, Davis, CA, USA). Кожна тліюча сигарета пускала клуби диму протягом 2 секунд, один раз кожну хвилину з одержанням всього восьми випусків диму, при швидкості струму 1,05 л/хв. з одержанням стандартного випуску диму 35 см³. Ця машина для утворення сигаретного диму пристосована для утворення суміші диму бічного потоку (89%) і диму основного потоку (11%) спалюванням п'яти сигарет одночасно. Атмосферу камери піддають моніторингу на загальні зважені частинки і монооксид вуглецю, з концентраціями 90 мг/м³ і 350 м.ч., відповідно.

Морфологічний і морфометричний аналізи

Після піддавання мишей дії CS або інстиляції експресуючої RTP801 плазмиди мишей анестезують галотаном і легені роздувають 0,5% низькокиплячою агарозою при постійному тиску 25 см, як описано раніше. Роздуті легені фіксують в 10% забуференому формаліні і заливають в парафін. Зрізи (5 мкм) забарвлюють гематоксиліном і еозином. Середній альвеолярний діаметр, альвеолярну довжину і середні лінійні перегородки визначають морфометрією за допомогою комп'ютера з використанням програми Image Pro Plus (Media Cybernetics, Siher Spring, MD, USA). Зрізи легень в кожній групі шифрують і репрезентативні зображення (15 на один зріз легені) отримує дослідник, якому невідома ідентичність предметного скла, з використанням мікроскопа Nikon E800, об'єктиву 20X.

Бронхоальвеолярний лаваж (BAL) і фенотипування

Після піддавання дії CS або інстиляції експресуючої RTP801 плазмиди мишей анестезують натрій-пентобарбіталом. Рідину BAL, зібрану з легень цих мишей, центрифугують (500 g при 4°C) і осад клітин ресуспендують в забуференому фосфатом сольовому розчині. Загальну кількість клітин в рідині лаважу визначають і 2×10^4 клітин цитоцентрифугують (Shandon Southern Products, Pittsburgh, PA, USA) на скляному предметному склі і забарвлюють барвником Райта-Гімзи. Диференціальний рахунок клітин виконують на 300 клітинах згідно зі стандартними цитологічними способами.

Ідентифікація популяцій альвеолярних апоптотичних клітин в легенях

Для ідентифікації різних типів альвеолярних клітин, що піддаються апоптозу в легенях, імуногістохімічне фарбування активної каспази 3 виконують в зрізах легень з кімнатного повітря (RA), а

також підданих CS мишах. Для ідентифікації епітеліальних апоптотичних клітин типу II в легенях, після мічення активної каспази 3 зрізи легень інкубують спочатку з антитілом проти мишачого сурфактантного білка C (SpC) і потім з антикролячим антитілом з Техаським червоним як маркером. Апоптотичні ендотеліальні клітини ідентифікують інкубуванням зрізів спочатку з антитілом проти мишачого CD 31 і потім з біотинільованим кролячим антимишачим вторинним антитілом. Зрізи легень промивають в ЗФР і потім інкубують з кон'югованим комплексом стрентавідину-Техаського червоного. Апоптотичні макрофаги в легенях ідентифікують інкубуванням зрізів спочатку з щурячим антитілом проти мишачого Mac-3 і потім з антищурячим кон'югованим з Техаським червоним антитілом. Нарешті, на всі зрізи легень наносять барвник DAPI (4,6-діамідино-2-феніліндол), інкубують протягом 5 хвилин, промивають і монтують з використанням середовища для гістологічних препаратів Vectashield HardSet. DAPI і флуоресцеїн візуалізують при 330-380 нм і 465-495 нм, відповідно. Зображення зрізів легень отримують з використанням мікроскопа Nikon E800, об'єктиву 40X.

Імуногістохімічна локалізація активної каспази-3

Імуногістохімічне фарбування в аналізі активної каспази-3 виконують з використанням антитіла проти активної каспази-3 і позитивні відносно активної каспази-3 клітини підраховують з Macro з використанням програми Image Pro Plus. Кількості нормалізують за допомогою суми альвеолярних профілів, названих тут альвеолярною довжиною, і виражають в мкм. Альвеолярні довжини зворотно-корелюють з середнім лінійним проміжком між септами (перегородками), тобто, коли альвеолярні септи (перегородки) руйнуються, середні лінійні проміжки між септами збільшуються у вигляді загальної альвеолярної довжини, тобто загальна альвеолярна септальна довжина зменшується.

Аналіз активності каспази-3

Активність каспази 3/7 вимірюють в екстрактах тканини легень з використанням флуориметричного аналізу відповідно до інструкцій виробника. Швидко заморожену тканину легені (n=3 на групу) гомогенізували з буфером для аналізу з подальшими обробкою ультразвуком і центрифугуванням при 800xg. Після видалення ядер і клітинних залишків супернатант (300 мкг білка) інкубували з про-флуоресцентним субстратом при кімнатній температурі протягом 1 години та інтенсивність флуоресценції вимірювали з використанням приладу Typhoon phosphoimager (Amersham Biosciences, Inc., Piscataway, NJ, USA). Результати виражають у вигляді швидкості розщеплення специфічного субстрату каспази-3, вираженої в одиницях ферментативної активності каспази-3. нормалізованих з використанням загальної концентрації білка. Активну рекомбінантну каспазу-3 використали як стандарт аналізу (0-4 Е). Лізати тканини без субстрату, один буфер для аналізу і лізати з інгібітором каспази-3 використали як негативні контролю.

Імуногістохімічна локалізація 8-оксо-dG

Для імуногістохімічної локалізації і кількісного визначення 8-оксо-dG зрізи легень з мишей, підданих дії CS або інсталюваних експресуючою RTP801 плазмідною, інкубували з анти-8-оксо-dG-антитілом і забарвлювали з використанням набору InnoGenex TM Iso-IHC DAB з використанням мишачих антитіл. 8-оксо-dG-позитивні клітини підраховували з Macro (з використанням Image Pro Plus) і кількості клітин нормалізували з використанням альвеолярної довжини, як описано.

Інстиляція нлазмідної ДНК в легень миші

Експресуючі плазмідну ДНК RTP801 і контрольні вектори готували з використанням набору для виділення ДНК, яка не містить ендотоксинів. Для інтратрахеальної інстиляції 50 мкг плазмідної ДНК доставляють у 80 мкл стерильного перфторвуглецю. Властивості перенесення кисню перфторвуглецем роблять його добре переносимим при цих об'ємах, в той час як його фізико-хімічні властивості роблять можливою надзвичайно ефективну дистальну легеневу доставку при інтратрахеальній інстиляції. Мишей анестезують коротким інгаляційним впливом галотану, язик обережно витягують вперед пінцетом і трахею інстилюють розчином перфторвуглецю, що наноситься при основі язика через тупий ангіокатетер.

Інстиляція siRNA в легень миші

Мишей анестезують внутрішньочеревинною ін'єкцією Кетаміну/Ксилазину (115/22 мг/кг). 50 мкг siRNA інстилюють інтраназально в об'ємі 50 мкл 0,9% NaCl доставкою п'яти послідовних порцій по 10 мкл. В кінці інтраназальної інстиляції голову миші втримують в прямому положенні протягом 1 хвилини для гарантії того, що весь інсталюваний розчин стікає всередину.

Відносно додаткової інформації, див. Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa, RK, Zhen L, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tudor RM, Biswal S. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. Submitted to Journal of Clinical Investigation: Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Carlyne D. Cool, David A. Lynch, Sonia C Flores, and Norbert F. Voelkel, Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema. Am J Respir Crit Care Med Vol 163. pp 737-744, 2001; Yasunori Kasahara, Rubin M. Tudor, Laimute Taraseviciene-Stewart, Timothy D. Le Cras, Steven Abman, Peter K. Hirth, Johannes Waltenberger, and Norbert F. Voelkel, Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema. J. Clin. Invest. 106:1311-1319 (2000); and a review on the topic: Robin M. Tudor, Sharon McGrath and Enid Neptune, The pathological mechanisms of emphysema models: what do they have in common?, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2002.

Результати

1. Інстиляція експресуючої RTP801 плазміди приводить до емфіземи-подібного фенотипу в легнях миші, що доводиться (і) збільшенням кількостей клітин в бронхоальвеолярному лаважі (Фіг. 15a); апоптозом легневих септальних клітин (Фіг. 15b) і збільшенням альвеолярного діаметра (Фіг. 15c).

2. Інстиляція siRNA RTP801 (REDD14) приводить до зменшення експресії RTP801 в легнях (Фіг. 17b).

3. Миші з нокаутом RTP801 (KO) захищені від розвитку емфіземи після 6 місяців впливу сигаретним димом, що доводиться відсутністю збільшення альвеолярного діаметра (Фіг. 18).

4. Миші з нокаутом RTP801 (KO) захищені від індукованого впливом сигаретного диму запалення, що доводиться зменшеною кількістю запальних клітин в бронхоальвеолярному лаважі після 1 тижня впливу сигаретним димом (Фіг. 16, a-b).

5. Миші з нокаутом RTP801 (KO) захищені від індукованого впливом сигаретного диму апоптозу септальних клітин, що доводиться фарбуванням легневих зрізів на активовану каспазу (Фіг. 16c).

6. Інсталювані REDD14 миші частково захищені від індукованого впливом сигаретного диму запалення, що доводиться зменшеною кількістю запальних клітин в бронхоальвеолярному лаважі після 1 тижня впливу сигаретним димом (Фіг. 17a).

Приклад 8

Моделі і результати, що стосуються мікросудинних порушень

Сполуки даного винаходу випробовували в моделях тварин діапазону мікросудинних порушень, описаного нижче.

1. Діабетична ретинопатія

RTP801 стимулює аіонтоз нервових клітин і генерування молекулярних частинок активного кисню *in vitro*. Автор даного винаходу також знайшов, що в мишах з нокаутом RTP801 (KO), підданих моделі ретролєтальної фіброплазії (ROP), патологічна неоваскуляризація NV зменшувалась при гіпоксичних умовах, незважаючи на підвищення VEGF, в той час як цей ген не впливав на фізіологічну неонатальну ретинальну NV. Крім того, в цій моделі відсутність RTP801 була також протективною проти гіпоксичного апоптозу нейронів і гіпероксичної облітерації судин.

Експеримент 1

Діабет індукували у 8-тижневих однопоносних мишах з нокаутом RTP801 (KO) і мишах дикого типу (WT) C57/129sv внутрішньочеревинною ін'єкцією STZ. Через 4 тижні одержували ERG (єдиний білий спалах, $1,4 \times 10^4$ фґи-свічок. 5 мс) з лівого ока після 1 години темрявної адаптації. RVP оцінювали з обох очей з використанням способу проникнення Evans-blue-альбуміну.

Результати

Глюкоза крові не відрізнялась ані між діабетичними мишами (DM) WT і DM KO (495 ± 109 проти 513 ± 76 мг/дл), ані між недіабетичними мишами (NDM) WT і KOP (130 ± 10 проти 135 ± 31 мг/дл, відповідно). RVP в групі DM WT збільшувалась на 138% ($51,2 \pm 37,9$ мкл/г/год., $n=8$) у порівнянні з NDM WT ($21,5 \pm 18,8$ мкл/г/год., $n=6$, $p=0,055$). На відміну від цього, RVP зменшувався на 80% в DM KO ($9,5 \pm 8,5$ мкл/г/год., $n=6$, $p=0,023$) у порівнянні з мишами DM WT, що приводило до 140% зменшення RVP, що індукується діабетом. В мишах DM WT спостерігали пролонгування ($p<0,05$) неясних періодів коливального потенціалу для OP2 (11%), OP3 (12%) і OP4 (14%) і для В-хвилі (23%) у порівнянні з NDM WT. А-хвиля не була значуще змінена. Ці зміни нормалізували ~100% в DM KO для

OP3 і OP4 і 65% для В-хвилі у порівнянні з NDM KO. Висновок: Нокаут RTP801 зменшує індуковані діабетом RVP- і ERG-відхилення від норми в мишах, що дозволяє передбачити, що цей індукований гіпоксією ген може грати важливу роль в патогенезі раннього діабетичного захворювання сітківки.

Експеримент 2

Діабет індукували в мишах з нокаутом RTP801 і в контрольних мишах дикого типу з відповідним генетичним фоном. Крім того, його індукували в мишах C57B16, яких потім використали для внутрішньовенної ін'єкції стрептозотоцином (STZ 90 мг/кг протягом 2 днів після нічного голодування). Фізіологію тварин піддавали моніторингу протягом цього дослідження на глюкозу крові, масу тіла і гематокрит. Ін'єктовані носієм миші служили як контролю. Відповідних тварин обробляли інтравіт-реальними ін'єкціями 1 мкг анти-RTP801-siRNA REDD14 або 1 мкг контрольної анти-GFP-siRNA. siRNA ін'єктували двічі в ході цього дослідження в день 0, коли виконували першу ін'єкцію STZ, і в день 14 після ін'єкції STZ.

Ретинальне судинне підтікання вимірювали з використанням способу з барвником Evans-blue (EB) на тваринах після 4-тижневого строку діабету. Миші мали катетер, імплантований в праву яремну вену за 24 години перед вимірюваннями Evans blue (EB). Вимірювання проникності сітківки в обох очах кожної тварини виконували згідно зі стандартним протоколом з використанням барвника Evans blue.

Результати

1. Підтікання кровоносних судин сітківки зменшувалось на 70% в діабетичних мишах з нокаутом RTP801 (KO) у порівнянні з діабетичними мишами дикого типу (див. Фіг. 20).

2. Нокаут RTP801 нормалізує ERG-відхилення від норми в мишах: в мишах DM WT було пролонгування ($p < 0,05$) неявищих періодів коливального потенціалу для OP2 (11%), OP3 (12%) і OP4 (14%) і для В-хвилі (23%) у порівнянні з NDM WT. А-хвиля не була значуще змінена. Ці зміни нормалізували ~100% в мишах DM з KO RTP801 для OP3 і OP4 і 65% для В-хвилі у порівнянні з мишами NDM KO RTP801 (див. Фіг. 21).

3. Подібно результатам в мишах KO, підтікання кровоносних судин сітківки зменшувалось на 50%) в діабетичних мишах, ін'єктованих інтравіт-реально siRNA проти RTP801 REDD14 у порівнянні з діабетичними мишами, ін'єктованими інтравіт-реально контрольною siRNA проти GFP (див. Фіг. 22).

2. Ретролетальна фіброплазія

Ретролетальну фіброплазію індукували піддаванням тест-тварин гіпоксичним і гіпероксичним умовам і потім тестуванням дій на сітківку. Результати показали, що миші KO RTP801 були захищені від ретролетальної фіброплазії, що валідизувало захисну дію інгібування RTP801.

3. Інфаркт міокарда

Інфаркт міокарда індукували лігуванням лівої передньої низхідної артерії в мишах, як короткостроково, так і довгостроково. Результати: зменшення рівнів фракції TnT і CPK-MB при 24 годинах після інфаркту в крові і поліпшена ехокардіограма

(об'єм фракції викиду) при 28 днях після інфаркту в мишах з нокаутом RTP801 (KO).

4. Мікросудинні ішемічні стани

Моделі тварин для оцінки ішемічних станів включають:

1. Закрите пошкодження голови (CHI) Експериментальна TBI індукує ряд подій, сприяючих нейрологічним і нейрометаболічним каскадам, які пов'язані з мірою і тривалістю біхевіористичних (поведінкових) порушень. CHI індукують під анестезією, коли гіри дають падати вільно із заздалегідь фіксованої висоти (Chen et al, J. Neurotrauma 13, 557, 1996) на відкритий череп, що охоплює ліву півкулю в площині.

2. Часову оклюзію середньої мозкової артерії (MCAO) - 90-120-хвилинну часову осередкову ішемію виконують у дорослих самцях щурів Sprague-Dawley, 300-370 г. Застосований спосіб являє собою MCAO з використанням інтралюмінального шовного матеріалу (Longa et al., Stroke, 30, 84, 1989 і Dogan et al., J. Neurochem. 72, 765, 1999). Коротко, під анестезією галотаном 3-0-найлоновий шовний матеріал, покритий полі-L-лізином, вставляють в праву внутрішню сонну артерію (ICA) через отвір в зовнішній сонній артерії. Пайлонову нитку проштовхують в ICA до початку правої MCA (20-23 мм). Через 90-120 хвилин цю нитку витягують, тварину зашивають і дають їй прийти в нормальний стан.

3. Перманентну оклюзію середньої мозкової артерії (MCAO) - оклюзія є перманентною, односторонньо індукованою електрокоагуляцією MCA. Обидва способи приводять до осередкової ішемії головного мозку іспілатеральної сторони кори головного мозку, із залишенням інтактною контралатеральної сторони (контролю). Ліву MCA оголяють за допомогою скроневої резекційної трепанації черепа, як описано для щурів Tamura A. et al., J Cereb Blood Flow Metab. 1981; 1:53-60). MCA і її лентикуло-стриатальне відгалуження (відгалуження до кришталика і смугастого тіла) закупорюють проксимально відносно медіальної межі нюхового тракту мікробіполярною коагуляцією. Рану зашивають і тварин повертають в їх клітку у приміщенні, що нагрівається при 26°C-28°C. Температуру тварин підтримують весь час за допомогою автоматичного термостату.

5. Гостра ниркова недостатність (ARF)

Випробування активної siRNA для лікування ARF може бути виконане з використанням індукованої сепсисом ARF або індукованої ішемією-реперфузією ARF.

1. Індукована сепсисом ARF

Дві прогностичні моделі тварин індукованої сепсисом ARF описані Miyaji T, Hu X, Yuen PS, Muramatsu Y, Iyer S, Hewitt SM, Star RA, 2003, Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice, Kidney Int. Nov; 64(5): 1620-31. Ці дві моделі одержують введенням ліпополісахариду і слинокишковою лігуючою пункцією в мишах, переважно в старих мишах.

2. Індукована ішемією-реперфузією ARF

Ця прогностична модель тварини описана Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, Dagher PC, 2003 January, P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion:

protective role of p53 inhibitor, *J Am Nephrol.*;14(1):128-38.

Ішемічне-реперфузійне пошкодження індукували в щурах після 45 хвилин білатерального передавлювання артерій нирок і подальшого припинення передавлювання для створення можливості 24-годинної реперфузії. 250 мкг siRNA REDD14 або GFP (негативний контроль) ін'єктували в яремну вену за 2 години до і 30 хвилин після цього передавлювання. Додаткові 250 мкг вводили через хвостову вену при 4 і 8 годинах після передавлювання. siRNA проти GFP слугувала як негативний контроль. Прогресування ARF піддавали моніторингу за допомогою вимірювання сироваткових рівнів креатиніну до і через 24 години після хірургії. В кінці цього експерименту щурів реперфузували через постійну стегову лінію теплим ЗФР і потім 4% параформальдегідом. Ліві нирки видаляли і зберігали в 4% параформальдегіді для подальшого гістологічного аналізу. Гостра ниркова недостатність часто визначається як різке збільшення рівня креатиніну в сироватці відносно фону. Збільшення щонайменше 0,5 мг на дл або 44,2 мкмоль на л сироваткового креатиніну вважається вказівкою на гостру ниркову недостатність. Сироватковий креатинін вимірюють при часі 0 до хірургії і при 24 годинах після хірургії ARF.

Для дослідження розподілу siRNA в нирці щура СуЗ-мічені 19-мірні затуплені молекули siRNA (2 мг/кг), що мають О-метил-модифікацію, що чергується, в цукрових залишках, вводили iv протягом 3-5 хвилин, після чого проводили візуалізацію *in vivo* з використанням двофотонної конфокальної мікроскопії. Аналіз з використанням конфокальної мікроскопії виявив, що основна частина siRNA в нирках сконцентрована в ендосомному компартменті проксимальних канальцевих клітин. Як ендосомна, так і цитоплазматична флуоресценція siRNA є відносно стабільною під час перших 2 годин після доставки і зникає при 24 годинах.

Як видно з Фігури 19, було десятиразове збільшення рівня сироваткового креатиніну після 45-хвилинної обробки білатерального затиснення артерій (обробки ЗФР). Чотири ін'єкції siRNA RTP801 (REDD14, SEQ ID NO: 16 і 66) (за 2 години до і при 30 хв., 4 год, і 8 год. після затиснення) значуще зменшували рівень креатиніну в сироватці на 30% ($P < 0.02$). Ці результати передбачають, що siRNA RTP801 може захищати ниркову тканину від дій ішемічного-реперфузійного пошкодження і, отже, зменшувати серйозність ARF.

Приклад 9

Одержання siRNA

З використанням патентованих алгоритмів і відомої послідовності гена RTP801 (SEQ ID NO:1) генерували послідовності багатьох потенційних siRNA. Молекули siRNA відповідно до наведених вище описів, одержували по суті, як описано тут.

siRNA даного винаходу можуть бути синтезовані будь-яким зі способів, які добре відомі в галузі синтезу рибонуклеїнових (або дезоксирибонуклеїнових) олігонуклеотидів. Наприклад, може бути використаний комерційно доступний прилад (доступний, *inter alia*, з Applied Biosystems): олігонуклеотиди одержують відповідно до описаних тут послідовностей. Пари хімічно синтезованих

фрагментів, що перекриваються, можуть бути лігвані з використанням способів, добре відомих в даній галузі (наприклад, див. Патент США № 6121426). Ланцюги синтезують окремо і потім випалюють один з одним в пробірці. Потім ці дволанцюгові siRNA відділяють від одноланцюгових олігонуклеотидів, які не випалились (наприклад, внаслідок надлишку одного з них), за допомогою ВРХ. Що стосується siRNA або фрагментів siRNA даного винаходу, дві або більше таких послідовностей можуть бути синтезовані і пов'язані разом для застосування в даному винаході.

Молекули siRNA цього винаходу можуть бути синтезовані з використанням процедур, відомих в даній галузі, наприклад, процедур, описаних в Usman et al., 1987, *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 7854; Scaringe et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 5433; Wincott et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23, 2677-2684; і Wincott et al., 1997, *Methods Mol. Bio.*, 74, 59, і можуть використовувати звичайні захисні і зв'язувальні групи нуклеїнових кислот, такі як диметокситритил на 5'-кінці і фосфорамідити на 3'-кінці. Необов'язково включені модифіковані (наприклад, 2'-О-метильовані) нуклеотиди і немодифіковані нуклеотиди.

Альтернативно, молекули нуклеїнових кислот даного винаходу можуть бути синтезовані окремо і з'єднані разом після синтезу, наприклад, лігуванням (Moore et al., 1992, *Science* 256, 9923; Draper et al., International PCT publication No. WO93/23569; Shabarova et al., 1991, *Nucleic Acids Research* 19, 4247; Bellon et al., 1997, *Nucleosides & Nucleotides*, 16, 951; Bellon et al., 1997, *Bioconjugate Chem.* 8, 204) або гібридизацією після синтезу і/або виділенням захисних груп.

Молекули siRNA цього винаходу можуть бути також синтезовані з використанням методології тандемного синтезу, описаного в публікації заявки на патент США з номером US2004/0019001 (McSwiggen), де обидва ланцюги синтезують у вигляді єдиного суміжного олігонуклеотидного фрагмента або єдиного ланцюга, що розділяється лінкером, який розщеплюється, який потім розщеплюють з одержанням окремих фрагментів siRNA або ланцюгів, які гібридизуються і роблять можливим очищення цього siRNA-дуплексу. Цим лінкером може бути полінуклеотидний лінкер або нуклеотидний лінкер. Відносно додаткової інформації див. Публікацію PCT з номером WO 2004/015107 (ATUGEN).

Як описано вище, siRNA таблиці А (нижче) конструювали таким чином, що цукри, які чергуються, мають 2'-О-метил-модифікацію, тобто нуклеотиди, що чергуються, були таким чином модифіковані. У цих переважних варіантах здійснення в одному ланцюгу цієї siRNA модифікованими нуклеотидами були номери 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 і 19, а в протилежному ланцюгу модифікованими нуклеотидами були номери 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, і 18. Таким чином, ці siRNA є затупленими на кінцях 19-мірними молекулами РНК з 2'-О-метил-модифікаціями, що чергуються, описаними вище. siRNA таблиць 2 і 3 (нижче) конструюють також подібним чином; siRNA таблиці В є затупленими на кінцях 19-мірними молекулами РНК з 2'-О-метил-модифікаціями, що чергуються: siRNA таб-

лиці С є затупленими на кінцях 21-мірними молекулами РНК з 2'-О-метил-модифікаціями, що чергуються.

Таблиця А детально описує нові молекули siRNA, які були генеровані і потім синтезовані для гена RTP801. Два останніх стовпці показують результати двох експериментів, виконаних для випробування активності цих нових молекул. Коротко, клітини HeLa або HaCat трансфікували конкретною новою siRNA, яка підлягала випробуванню. Потім експресію поліпептиду RTP801 визначали Вестерн-блотингом з використанням ан-

титла проти поліпептиду RTP801. У двох правих стовпцях таблиці А «-» означає неактивну або маючу низьку активність молекулу (яка по суті не інгібує експресію гена RTP801); «+» означає молекулу siRNA з деякою інгібуючою активністю (експресії гена RTP801), «++» означає молекулу з більш високою інгібуючою активністю, і т.д. Будь-яка з молекул siRNA, описаних тут, і, зокрема, активні молекули, детально описані в таблиці А, є новими і також розглядаються як частина даного винаходу.

Таблиця А

| Номер | Ідентифікаційний номер (ID) (по серії) | Пристосування | Місце розташування | Позиція | Антисмисловий (AS) танцюг (5'-3') | Смисловий (SS) танцюг (5'-3') | HeLab 20 нМ | HaCat 20 нМ |
|-------|--|---------------|--------------------|---------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------|-------------|
| 1 | REDD1 | h | 5' UTR | 128 | UAGAAGCCGCGCAGCUGCGC | GCGCUGCUGCGGCUUCUA | + | + |
| 2 | REDD2 | hmr | CDS | 337 | UCCGAGCUCUCCAGGCUCG | CGAGCCUGGAGAGCUCGGA | - | - |
| 3 | REDD3 | hmr | CDS | 360 | UGCUGCUGUCCAGGGACUC | GAGUCCUGGACAGCAGCA | - | - |
| 4 | REDD4 | hmr | CDS | 478 | AGCAGCUGCAUCAGGUUGG | CCAACCGAUGCAGCUGCU | - | - |
| 5 | REDD5 | h | CDS | 728 | UGAGUCCAGGCGCAGCACG | CGUGCUGCGCCUGGACUCA | - | - |
| 6 | Redd6 | hmr | 5' UTR | 119 | CAGCUAGCGCGGUCAGCGA | UCGCUAGCCGCGCUGCUG | - | - |
| 7 | Redd7 | hmr | 5' UTR | 122 | CCGCGAGCUAGCGCGGUCAG | CUGACCGCGCUAGCUGCGG | - | - |
| 8 | Redd8 | hmr | 5' UTR | 125 | AAGCCGCGCAGCUAGCGCGU | ACCGCGCUAGCUGCGGCUU | - | - |
| 9 | Redd9 | hmr | CDS | 339 | AGUCCGAGCUCUCCAGGCU | AGCCUGGAGAGCUCGGACU | - | - |
| 10 | Redd10 | hmr | CDS | 341 | GCAGUCCGAGCUCUCCAGG | CCUGGAGAGCUCGGACUGC | - | - |
| 11 | Redd11 | hmr | CDS | 363 | UGUUGCUGCUGUCCAGGGA | UCCUGGACAGCAGCAACA | - | - |
| 12 | Redd12 | hmr | CDS | 369 | AGCCACUGUUGCUGCUGUC | GACAGCAGCAACAGUGGCU | - | - |
| 13 | Redd13 | hmr | CDS | 370 | AAGCCACUGUUGCUGCUGU | ACAGCAGCAACAGUGGCUU | - | - |
| 14 | Redd14 | hmr | CDS | 475 | AGCUGCALCAGGUUGGCAC | GCGCCAACCGAUGCAGCU | +++ | +++ |
| 15 | Redd15 | hmr | CDS | 481 | UGCAGCAGCUGCAUCAGGU | ACCUGAUGCAGCUGCUGCA | + | + |
| 16 | Redd16 | hmr | CDS | 486 | UCUCCUGCAGCAGCUGCAU | AUGCAGCUGCUGCAGGAGA | - | - |
| 17 | Redd17 | hmr | CDS | 610 | CCCCGCGAGGCGCACGGCU | AGCCGUGCGGCCUGCGGGG | - | - |
| 18 | Redd18 | hmr | CDS | 750 | CCUGGAUCUUGGGCCAGAG | CUCUGGCCCAAGAUCAGG | - | - |
| 19 | Redd19 | hmr | CDS | 809 | CAGCGUCAGGGACUGGCUG | CAGCCAGUCCUGACGCUG | - | - |
| 20 | Redd20 | hmr | 3' UTR | 1097 | AUGCUACAGUACUGAGGGG | CCCCUCAGUACUGUAGCAU | + | + |
| 21 | Redd21 | hmr | 3' UTR | 1419 | GUCUGUAAGAUAGCUGCCU | AGGCAGCUAUCUACAGAC | + | + |
| 22 | Redd22 | hmr | 3' UTR | 1617 | UUCUAGAUGGAAGACCCAG | CUGGCUCUCCAUCUAGAA | ++ | ++ |
| 23 | Redd23 | hmr | 3' UTR | 1670 | UUGAACAUCAAGUGJAUUC | GAUJACACUUGAUGUCAA | ++ | ++ |
| 24 | Redd24 | hmr | 3' UTR | 1693 | AAAUUAUUGCAUAGGUCUUA | UAAGACCUAUGCAAUAUUU | + | + |
| 25 | Redd25 | hmr | 3' UTR | 1695 | AAAAUAUUGCAUAGGUCU | AGACCUAUGCAAUAUUUUU | ++ | ++ |
| 26 | Redd26 | hmr | CDS | 349 | AGGGACUCGCGAGUCCGAGC | GCUCGGACUCGCGAGUCCU | - | - |
| 27 | Redd27 | hmr | 3' UTR | 1673 | UACUUGAACAUCAAGUGUA | UACACUUGAUGUUAAGUA | ++ | ++ |
| 28 | Redd28 | hmr | 3' UTR | 1717 | AAACAUUUUAUUAAGAAA | UUUUUAUAUAACAUUUU | - | - |
| 29 | Redd29 | h | 5' UTR | 99 | AACUGCUAAGACAAGUGCG | CGCACUUGUCUUAAGCAGUU | - | - |
| 30 | Redd30 | h | CDS | 213 | ACGACGACGAGAAGCGGUC | GACCGCUUCUCGUCGUCU | - | - |
| 31 | Redd31 | h | CDS | 393 | AAGCCGUGUCUUCUCCGG | CCGGAGGAAGACACGGCUU | - | - |
| 32 | Redd32 | h | CDS | 453 | AGUGUUAUCCUCAGGGUC | GACCCUGAGGAUGAACACU | - | - |
| 33 | Redd33 | h | CDS | 521 | AGGGGUCGAGAGCCAGC | GCUGGGCUCUCGACGCCU | - | - |
| 34 | Redd34 | h | CDS | 535 | AUCAGCAGGCGCGCAGGGC | GCCUGCGCGCCUGCUGAU | - | - |
| 35 | Redd35 | h | CDS | 571 | AGUUCUUUGCCCACCUGGC | GCCAGGUGGGCAAGAACU | - | - |
| 36 | Redd36 | h | CDS | 597 | ACGGCUCGCUUAGGCCAG | CUGGCCUACAGCGAGCCU | - | - |
| 37 | Redd37 | h | CDS | 625 | ACGUCCAGCAGCGCCCCC | GGGGGCGCUGCUGGACGU | - | - |
| 38 | Redd38 | h | CDS | 829 | AUGACUCGGAAGCCAGUGC | GCACUGGCUUCCAGUCAU | - | - |

| | | | | | | | | |
|----|----------|-----|--------|------|---------------------|---------------------|----|----|
| 39 | Redd39 | h | 3' UTR | 1046 | AACUCAAUGAGCUUCCUGG | CCAGGAAGCUCALUGAGUU | ++ | ++ |
| 40 | REDD40 | h | 3' UTR | 1539 | CUCACUCUGCAGUACACG | CGUGUACUGCAGAGUUGAG | + | + |
| 41 | Redd41 | h | 3' UTR | 1317 | AGAUACACAAACCACCUCC | GGAGGUGGUUUGUUAUCU | + | + |
| 42 | Redd42 | h | 3' UTR | 1350 | ACAACAACACACUUGGUC | GACCAAGUGUGULUGUUGU | ++ | ++ |
| 43 | Redd43 | hmr | CDS | 473 | CUGCAUCAGGUUGGCACAC | GUGUGCCAACCUGAUGCAG | + | + |
| 44 | REDD44 | h | 3' UTR | 955 | UCCUGCCUCUAGUCUCCAC | GUGGAGACUAGAGGCAGGA | + | + |
| 45 | Redd45 | hmr | CDS | 476 | CAGCUGCAUCAGGUUGGCA | UGCCAACCUGAUGCAGCUG | - | - |
| 46 | Redd46 | hmr | CDS | 479 | CAGCAGCUGCAUCAGGUUG | CAACCUGAUGCAGCUGCUG | - | - |
| 47 | Redd47 | hmr | CDS | 483 | CCUGCAGCAGCUGCAUCAG | CUGAUGCAGCUGCUGCAGG | - | - |
| 48 | Redd48 | hmr | CDS | 485 | CUCCUGCAGCAGCUGCAUC | GAUGCAGCUGCUGCAGGAG | - | - |
| 49 | REDD40.1 | h | 3' UTR | 1536 | AACUCUGCAGUACACGAUG | CAUCUGUACUGCAGAGUU | ++ | ++ |
| 50 | REDD44.1 | h | 3' UTR | 954 | CCUGCCUCUAGUCUCCACC | GGUGGAGACUAGAGGCAGG | ++ | ++ |

Зверніть увагу, що у наведеній вищ таблиці А смислові ланцюги siRNA 1-50 мають SEQ ID NO:3-52, відповідно, а антисмислові ланцюги siRNA 1-50 мають SEQ ID NO:53-102, відповідно.

Молекула, позначена REDD14 має SEQ ID NO:16 (смисловий ланцюг) і SEQ ID NO:66 (антисмисловий ланцюг).

Таблиця В

| Номер | Джерело | Довжина оно | Смислова siRNA | Антисмислова siRNA | q19506686ref NM_019058.1 (Homo sapiens) | q121312867re fNM_029083.1 (Mmna) | q18376838re fNM_080906.1 (Hlyp) | Перекри- вання з реп (антисмис- лова) |
|-------|-------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|--|--|---------------------------------------|--|
| 51 | Віо шина | 19 | CTAGCCAGTTGGTAAGCCA | TGGCTTACCAACTGGCTAG | [556-574] | - | - | - |
| 52 | Віо шина | 19 | TGATTCCAGTGGTTGGA | TTTCCAACCACTGGAATCA | [984-1002] | - | - | - |
| 53 | Віо шина | 19 | CCAGTGGTTGGAUAAGTGA | TCAGTTTCCAACCACTGG | [989-1007] | - | - | - |
| 54 | Віо шина | 19 | GCTTCCGAGTCATCAAGAA | TTCTTGATGACTCGGAAGC | [835-853] | [763-781] | - | - |
| 55 | Віо шина | 19 | GGAGCTCATTTGAGTTGTG | CACAACCTCAATGAGCTTCC | [1049-1067] | - | - | - |
| 56 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CCATCTGGGCTTCCATCT | AGATGGAAGACCCAGATGG | [1613-1631] | [1569-1583] | [1610-1624] | + |
| 57 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GGATGTGTGTAGCATGT | ACATGCTACACACATCC | [1152-1170] | - | - | - |
| 58 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | ACACATACCCCTCAGTACT | AGTACTGAGGGGTATGTGT | [1090-1108] | - | [1081-1098] | - |
| 59 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | ACATACCCCTCAGTACTGT | ACAGTACTGAGGGGTATGT | [1092-1110] | - | [1082-1100] | - |
| 60 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CACGTGTTTATGAATACACT | AGTGTATTATGAACAGTG | [1660-1678] | [1612-1626] | [1652-1666] | + |
| 61 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CCAGCTGGATGTGTGTGT | TACACACATCCAGCTGG | [1146-1164] | [1099-1114] | [1139-1154] | - |
| 62 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CGGAACAGCTGCTCATTTGA | TCAATGAGCAGCTGTTCCG | [868-886] | [801-814] | [854-867] | - |
| 63 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GAGCTCATTTGAGTTGTGT | ACACAACCTCAATGAGCTTC | [1050-1068] | - | - | - |
| 64 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GGACACATACCCCTCAGTACT | TACTGAGGGGTATGTGTCC | [1088-1106] | - | - | - |
| 65 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GGATCTTGGACATTTGAA | TTTCAAGTGTCAAGATCC | [1483-1501] | [1424-1442] | - | - |
| 66 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GTAGCATGTACCTTATAT | ATATATAGGTACATGCTAC | [1162-1180] | [1112-1128] | - | - |
| 67 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | TCACTGCTGTAGCATGGAA | TTCCATGCTACAGTACTGA | [1101-1119] | - | [1091-1106] | - |
| 68 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | TGTGTAGCATGTACCTTAT | ATAGGTACATGCTACACA | [1159-1177] | [1111-1127] | [1151-1167] | - |
| 69 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CTGATGTGTGTGTAGCAT | ATGCTACACACATCCAG | [1150-1168] | - | - | - |
| 70 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | ACACTGTATGTTCAAGTAT | ATACTTGAACATCAAGTGT | [1674-1692] | [1622-1640] | - | + |
| 71 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GCATGAATGTAAAGTAGG | CCTACTCTTACATTCATGC | [1438-1456] | [1379-1397] | - | - |
| 72 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | AGCAGCAACAGTGGCTTCG | CGAAGCCACTTTGCTGCT | [372-390] | - | [300-318] | - |
| 73 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | ATGAATGTAAAGTAGGAA | TTCTACTCTTACATTCAT | [1440-1458] | [1381-1399] | - | - |
| 74 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CAGCAGCAACAGTGGCTTC | GAAGCCACTTTGCTGCTG | [371-389] | [299-317] | - | - |
| 75 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CATGAATGTAAAGTAGGA | TCCTACTCTTACATTCATG | [1439-1457] | [1380-1398] | - | - |
| 76 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GATGTTCAAGTATTAGAG | GTCTTAATCTTGAACATC | [1680-1698] | [1628-1646] | - | + |
| 77 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | TGATGCAGCTGCTGCAGGA | TCCTGCAGCAGTGCATCA | [484-502] | [412-430] | [465-483] | - |
| 78 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GAATACACTTGTATGTTCAA | TTGAACATCAAGTGTATTC | [1670-1688] | [1618-1636] | - | + |
| 79 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | TGAATACACTTGTATGTTCAA | TGAACATCAAGTGTATTC | [1669-1687] | [1617-1635] | [1657-1675] | + |
| 80 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | ATACACTTGTATGTTCAAGT | ACTTGAACATCAAGTGTAT | [1672-1690] | [1620-1638] | [1660-1678] | + |
| 81 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CATGAATACACTTGTATGTT | AACATCAAGTGTATTCATG | [1667-1685] | [1615-1633] | [1655-1673] | + |
| 82 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CTGGACAGCAGCAACAGTG | CACCTGTTGCTGCTGCCAG | [366-384] | [294-312] | [347-365] | - |
| 83 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | GTTTATGAATACACTTGTAT | ATCAAGTGTATTATGAAC | [1664-1682] | [1612-1630] | [1652-1670] | + |
| 84 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | TCATGAATACACTTGTATGT | ACATCAAGTGTATTATGA | [1666-1684] | [1614-1632] | [1654-1672] | + |
| 85 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | TGGACAGCAGCAACAGTGG | CCACTGTTGCTGCTGCCA | [367-385] | [295-313] | [348-366] | - |
| 86 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | TGTGTGCCAACCTGATGCA | TGCATCAGTGTGGCACACA | [472-490] | [400-418] | [453-471] | - |
| 87 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | TTCATGAATACACTTGTATG | CATCAAGTGTATTATGAA | [1665-1683] | [1613-1631] | [1653-1671] | + |
| 88 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | AACCTGATGCAGCTGCTGC | GCAGCAGCTGCATCAGGTT | [480-498] | [408-426] | [461-479] | - |
| 89 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | AGTCCCTGGACAGCAGCAA | TTGCTGCTGCCAGGAGCT | [361-379] | [289-307] | [342-360] | - |
| 90 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CCCTCAGTACTGTAGCATG | CATGCTACAGTACTGAGGG | [1098-1116] | [1048-1066] | [1088-1106] | - |
| 91 | Віо шина, собоного юна з шина | 19 | CCTGGACAGCAGCAACAGT | ACGTGCTGCTGCTCCAGG | [365-383] | [293-311] | [346-364] | - |

| | | | | | | | | |
|-----|---------------------------------------|----|-------------------------|----------------------|-------------|-------------|-------------|---|
| 92 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | TGTGCCAACCTGATGCGAG | GCTGCATCAGGTGGCACA | [474-492] | [402-420] | [455-473] | - |
| 93 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | AATACACTTGAATGTTCAAG | CTTGAACATCAAGTGATTT | [1671-1689] | [1619-1637] | [1659-1677] | - |
| 94 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | ATGAATACACTTGAATGTTCAAG | GAACATCAAGTGATTTCAAT | [1668-1686] | [1616-1634] | [1656-1674] | - |
| 95 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | TGATGCGAGCTGCTGCGAGA | TCTGCGAGCTGCTGATCA | [484-502] | - | [465-483] | - |
| 96 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | AGAAGCTGTTTACATGAAGA | TCTTCATGTAAACAGTTCT | [1632-1650] | - | [1625-1643] | + |
| 97 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | ATCTAGAAGCTGTTTACATGA | CATGTAAACAGTTCTAGAT | [1628-1646] | - | [1621-1639] | + |
| 98 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | CCATGCCATAGCTCTTTGGGA | TCCCAAGGCTAGGCTAGG | [196-214] | - | [186-204] | - |
| 99 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | CTAGAAGCTGTTTACATGAAG | TTCATGTAAACAGTTCTAG | [1630-1648] | - | [1623-1641] | + |
| 100 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | GAAGCTGTTTACATGAAGAT | ATCTTCATGTAAACAGTTCT | [1633-1651] | - | [1626-1644] | + |
| 101 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | GGTCTTCCATCTAGAAGCTG | CAGTCTTAGGTGGAAGACC | [1620-1638] | - | [1613-1631] | + |
| 102 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | CCATCTAGAAGCTGTTTACGA | TGTAACAGCTTCTAGATGG | [1626-1644] | - | [1619-1637] | + |
| 103 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | CTTCCATCTAGAAGCTGTTT | AAACAGTCTAGATGGAAG | [1623-1641] | - | [1616-1634] | + |
| 104 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | TAGAAGCTGTTTACATGAAG | CTTCATGTAAACAGTTCTA | [1631-1649] | - | [1624-1642] | + |
| 105 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | TCTTCCATCTAGAAGCTGTT | AACAGTCTAGATGGAAGA | [1622-1640] | - | [1615-1633] | + |
| 106 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | CATCTAGAAGCTGTTTACAT | ATGTAAACAGTTCTAGATG | [1627-1645] | - | [1620-1638] | + |
| 107 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | GGGTCTTCCATCTAGAAGCTG | AGTCTAGATGGAAGACCC | [1619-1637] | - | [1612-1630] | + |
| 108 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | TCCATCTAGAAGCTGTTTAC | GTAACAGTCTAGATGGA | [1625-1643] | - | [1618-1636] | + |
| 109 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | TCTAGAAGCTGTTTACATGA | TGATGTAAACAGTTCTAGA | [1629-1647] | - | [1622-1640] | + |
| 110 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | TCCATCTAGAAGCTGTTTAC | TAAACAGTCTAGATGGA | [1624-1642] | - | [1617-1635] | + |
| 111 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | GTCTTCCATCTAGAAGCTG | ACAGTCTAGATGGAAGAC | [1621-1639] | - | [1614-1632] | + |
| 112 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 19 | CAAGTATTAAAGCACTATGC | GCATAGGTCTTAATCTTG | [1686-1704] | [1634-1652] | - | + |
| 113 | Людина, миша | 19 | GTAATTAAGCACTATGCAT | ATTGATTAAGGTCTTAATAC | [1689-1707] | [1637-1655] | - | + |
| 114 | Людина, миша | 19 | AGTATTAAAGCACTATGCAT | TTCATAGGTCTTAATAC | [1688-1706] | [1636-1654] | - | + |
| 115 | Людина, миша | 19 | AGTATTAAAGCACTATGCAT | GGTCTTAATCTAGAACAT | [1681-1699] | [1629-1647] | - | + |
| 116 | Людина, миша | 19 | CACCTGATCTTAAGCACTAT | AATCTTGAACATCAAGTG | [1675-1693] | [1623-1641] | - | + |
| 117 | Людина, миша | 19 | CCAAAGTCCAGGGCTGTT | AACAGCCCTGGATCTTG | [757-775] | [685-703] | - | - |
| 118 | Людина, миша | 19 | CTTCAAGTATTAAAGCACTA | TAGGTCTTAATCTTGAC | [1683-1701] | [1631-1649] | - | + |
| 119 | Людина, миша | 19 | TCAAGTATTAAAGCACTATG | CATAGGTCTTAATCTTGA | [1685-1703] | [1633-1651] | - | + |
| 120 | Людина, миша | 19 | AAGTATTAAAGCACTATGCA | TGCATAGGTCTTAATCTT | [1687-1705] | [1635-1653] | - | + |
| 121 | Людина, миша | 19 | TGTTCAAGTATTAAAGCACT | AGGTCTTAATCTTGACCA | [1682-1700] | [1630-1648] | - | + |
| 122 | Людина, миша, шур | 19 | TGGGTCTTCCATCTAGAAG | GTCTAGATGGAAGACCCA | [1618-1636] | [1570-1588] | [1611-1629] | + |

Зверніть увагу, що у наведеній вище таблиці В смислові ланцюги siRNA 51-122 мають SEQ ID NO:103-122, відповідно, а антисмислові ланцюги siRNA 51-122 мають SEQ ID NO:175-246, відповідно.

Таблиця С

| Номер | Джерело | Довжина оно | Смислова siRNA | Антисмислова siRNA | g19506686ref NM_019058.1 (Homo sapiens) | g121312867re NM_029083.1 (Mus musculus) | g18376838re NM_080906.1 (Rattus norvegicus) | Перекри- вання з рс1 (антисмис- лова) |
|-------|---------------------------------------|----------------|-------------------------|-----------------------|--|--|--|--|
| 123 | Людина | 21 | CCAGGAAGCTCATTGAGTTGT | ACAAGTCAATGAGCTTCTTGG | [1046-1066] | - | - | - |
| 124 | Людина | 21 | CCATCTGGGTCTTCCATCTAG | TAGATGGAAGACCCAGATGG | [1613-1633] | [1569-1585] | [1610-1626] | + |
| 125 | Людина | 21 | GGATGTGTGTGATGATGATAC | GTACATGCTACACACACATCC | [1152-1172] | [1102-1122] | [1142-1161] | + |
| 126 | Людина | 21 | CAAGTGTGTGTGTGTGTGT | AACAACACAAACACACATTTG | [1353-1373] | - | - | - |
| 127 | Людина | 21 | CCTCAGTACTGTAGCATGGGA | TTCATGCTACAGTACTGAGG | [1099-1119] | [1049-1066] | [1089-1106] | - |
| 128 | Людина | 21 | GACCAAGTGTGTGTGTGTGT | AAACAACAAACACACTTGGTC | [1350-1370] | - | - | - |
| 129 | Людина | 21 | GCTTCGAGTCAACCAAGTGA | TCTTCTGTAGTCTGGAAGC | [835-855] | [763-783] | - | - |
| 130 | Людина | 21 | GGAGGTGGGGGAATAGTGT | AAACACTATTCGCCACCTCC | [1024-1044] | [976-986] | - | - |
| 131 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | CAGTACTGTAGCATGGAACAA | TGTCTCATGCTACAGTACTG | [1102-1122] | [1052-1072] | - | - |
| 132 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | GAATACACTTGATGTTCAAGT | ACTTGAACATCAAGTGATTC | [1670-1690] | [1618-1638] | [1658-1678] | + |
| 133 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | CAAGTATTAAAGCACTATGCA | ATTCATGAGTCTTAATCTTG | [1686-1706] | [1634-1654] | [1674-1694] | + |
| 134 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | GAAGTCTTGGGTGGAGACATA | TAGTCTCCACCCCAAAAGTTC | [944-964] | - | - | - |
| 135 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | GGACACATACCCCTGATGAT | AGTACTAGGGGTATGTGTCT | [1080-1100] | [1047-1058] | [1081-1098] | - |
| 136 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | GGAGGTGGTTTGTGTATCTTA | TAGATGTACAAACACCTCTCC | [1317-1337] | [1256-1268] | - | - |
| 137 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | GGATCTTGAACACTTGAAGAA | TGTTTCAAGTCTTCAAGATCC | [1483-1503] | [1424-1442] | - | - |
| 138 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | GGTCTTCCATCTAGAAGCTTT | ACAAGTCTAGATGGAAGACC | [1620-1640] | [1572-1598] | [1613-1633] | - |
| 139 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | TGTGTAGCATGACCTTATTA | TAAATAGTACATGCTACACA | [1159-1179] | [1111-1128] | [1151-1169] | - |
| 140 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | CAACAAGGCTTCCAGCTGGAT | ATCCAGCTGGAAGCTTGTG | [1135-1155] | - | - | - |
| 141 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | CACCTGGATCTTGGACATCT | AGTCTCAAGATCCCAAGTG | [1477-1497] | - | - | - |
| 142 | Людина, собачого юва мавпа | 21 | CATCACTACTGACCTTGTGTA | TACAACAGGTCAAGTGTATG | [1399-1419] | [1341-1356] | [1383-1398] | - |
| 143 | Людина, собачого юва мавпа, миша | 21 | GTCTGTGTAGCATGACTCTTA | TAAAGTACATGCTACACACAC | [1156-1176] | [1106-1126] | [1146-1166] | - |
| 144 | Людина, собачого юва мавпа, миша | 21 | GCATGAATGTAAGATGAGGA | TCTTACTCTTACATTCATGC | [1438-1458] | [1379-1399] | - | - |
| 145 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 21 | GCAGCAGCAACAGTGGCTTC | GAAACCACTGTGCTGCTGTC | [369-389] | [297-317] | - | - |
| 146 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 21 | TGATGCGAGCTGCTGCGAGA | TCTCTGAGCAGCTGCATCA | [484-504] | [412-432] | [465-485] | - |
| 147 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 21 | TGAATACACTTGAATGTTCAAG | CTTGAACATCAAGTGTATTCA | [1669-1689] | [1617-1637] | [1657-1677] | + |
| 148 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 21 | CATGAATACACTTGAATGTTCA | TGAACATCAAGTGTATTCA | [1667-1687] | [1615-1635] | [1655-1675] | + |
| 149 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 21 | GGACAGCAGCAACAGTGGCTTC | AAGCCACTGTGCTGCTGTC | [368-388] | [296-316] | [349-369] | - |
| 150 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 21 | GTTCATGAATACACTTGAATGTT | CATCAAGTGTATTCAAGAC | [1664-1684] | [1612-1632] | [1652-1672] | + |
| 151 | Людина, собачого юва мавпа, миша, шур | 21 | TCAATGAATACACTTGAATGTT | GAACATCAAGTGTATTCA | [1666-1686] | [1614-1634] | [1654-1674] | + |
| 152 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | TCCCTGGACAGCAGCAACAGT | ACTGTGCTGCTGCTCCAGGA | [363-383] | [291-311] | [344-364] | - |
| 153 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | AGTCCCTGGACAGCAGCAAC | TGTGCTGCTGCTCCAGGACT | [361-381] | [289-309] | [342-362] | - |
| 154 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | GAATACACTTGAATGTTCAAGT | ACTTGAACATCAAGTGTATT | [1670-1690] | - | [1658-1678] | + |
| 155 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | TAGAAGCTGTTTACATGAAGA | TCTTCATGTAAACAGTTCTAG | [1630-1650] | - | [1623-1643] | + |
| 156 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | CCATCTAGAAGCTGTTTACATG | CATGTAAACAGTTCTAGATGG | [1626-1646] | - | [1619-1639] | + |
| 157 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | CTTCCATCTAGAAGCTGTTTAC | GTAACAGTCTAGATGGAAG | [1623-1643] | - | [1616-1636] | + |
| 158 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | TCTTCCATCTAGAAGCTGTTT | TAAACAGTCTAGATGGAAGA | [1622-1642] | - | [1615-1635] | + |
| 159 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | CATCTAGAAGCTGTTTACATGA | TGATGTAAACAGTTCTAGATG | [1627-1647] | - | [1620-1640] | + |
| 160 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | GGGTCTTCCATCTAGAAGCTG | ACAGTCTAGATGGAAGACCC | [1619-1639] | - | [1612-1632] | + |
| 161 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | TCCATCTAGAAGCTGTTTACAT | ATGTAAACAGTCTAGATGGA | [1625-1645] | - | [1618-1638] | + |
| 162 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | TCTAGAAGCTGTTTACATGAAG | CTTCATGTAAACAGTTCTAGA | [1629-1649] | - | [1622-1642] | + |
| 163 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | TTCATCTAGAAGCTGTTTACA | TGTAACAGTCTAGATGGA | [1624-1644] | - | [1617-1637] | + |
| 164 | Людина, собачого юва мавпа, шур | 21 | GTCTTCCATCTAGAAGCTGTTT | AAACAGTCTAGATGGAAGAC | [1621-1641] | - | [1614-1634] | + |
| 165 | Людина, миша | 21 | TGATCTCAAGTATTGAAGACC | GGTCTTAATCTTGAACATCA | [1679-1699] | [1627-1647] | - | + |
| 166 | Людина, миша | 21 | GTTCAGATATTGAAGCACTAT | CATAGGTCTTAATCTTGAAC | [1683-1703] | [1631-1651] | - | + |
| 167 | Людина, миша | 21 | TCAAGTATTGAAGCACTATGCA | TGCATAGGTCTTAATCTTGA | [1685-1705] | [1633-1653] | - | + |
| 168 | Людина, миша | 21 | CATGTCTCAAGTATTGAAGACCT | AGGTCTTAATCTTGAACATC | [1680-1700] | [1628-1648] | - | + |
| 169 | Людина, миша | 21 | TTCAGTATTGAAGCACTATGC | GCATAGGTCTTAATCTTGA | [1684-1704] | [1632-1652] | - | + |
| 170 | Людина, миша | 21 | CTGGGTCTTCCATCTAGAAG | ACTTCTAGATGGAAGACCCAG | [1617-1637] | - | [1610-1630] | + |
| 171 | Людина, миша | 21 | TGGGTCTTCCATCTAGAAGCTG | CAGTCTAGATGGAAGACCCA | [1618-1638] | - | [1611-1631] | + |

Зверніть увагу, що у наведеній вище таблиці С смислові ланцюги siRNA 123-171 мають SEQ ID NO:2470295, відповідно, а антисмислові ланцюги siRNA 123-171 мають SEQ ID NO:296-344, відповідно.

Приклад 10

Фармакологія і доставка лікарських засобів

Нуклеотидні послідовності даного винаходу можуть доставлятися або безпосередньо, або вірусними або невірусними векторами. При безпосередній доставці ці послідовності звичайно роблять стійкими до нуклеаз. Альтернативно, ці послідовності можуть бути включені в експресійні

касети або конструкції, так що ця послідовність експресується в клітині, як обговорюється тут нижче. Звичайно ця конструкція містить відповідну регуляторну послідовність або промотор для створення можливості експресії цієї послідовності в клітині-мішені.

Сполуки або фармацевтичні композиції даного винаходу вводять і використовують в дозах відпо-

відно до хорошої медичної практики, з урахуванням клінічного стану індивідуального пацієнта, захворювання, яке підлягає лікуванню, місця і способу введення, схеми введення, віку, статі, маси тіла пацієнта та інших факторів, відомих лікареві-практику.

Таким чином, фармацевтично «ефективна кількість» для наведених тут цілей визначається міркуваннями, відовими в даній галузі. Ця кількість повинна бути ефективною для одержання поліпшення, в тому числі, але не тільки, поліпшеного коефіцієнта виживаності або більш швидкого видужання або поліпшення або усунення симптомів, та інших показників, які вибрані як відповідні критерії фахівцями з кваліфікацією в даній галузі.

Лікування звичайно має тривалість, пропорційну тривалості процесу захворювання і ефективності лікарських засобів і виду пацієнта, що піддається лікуванню. Зазначається, що люди звичайно лікують протягом більш тривалого періоду часу, ніж мишей або інших експериментальних тварин, наведених тут як приклади.

Сполуки даного винаходу можуть вводитись будь-яким із загальноприйнятих способів введення. Потрібно зазначити, що ця сполука може вводитись у вигляді сполуки або у вигляді фармацевтично прийнятної солі і може вводитись окремо або у вигляді активного інгредієнта в комбінації з фармацевтично прийнятними носіями, розчинниками, розріджувачами, ексципієнтами, ад'ювантами або наповнювачами. Ці сполуки можуть вводитись перорально, підшкірно або парентерально, в тому числі внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним, внутрішньом'язовим, внутрішньочеревинним та інтраназальним введенням, а також інтра-текальним (підоболонковим) та інфузійним способами. Застосовні також імпланти. Рідкі форми можуть бути приготовані для ін'єкції, причому цей термін включає підшкірний, трансдермальний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, інтратекальний (підоболонковий) та інші парентеральні способи введення. Рідкі композиції включають водні розчини, з органічними співрозчинниками або без органічних співрозчинників, водні або масляні суспензії, емульсії з придатними в їжу оліями, а також схожими фармацевтично наповнювачами. Крім того, при певних обставинах композиції для застосування в нових способах лікування даного винаходу можуть бути приготовані у вигляді аерозолів для інтраназального і подібного введення. Підлягаючий лікуванню пацієнт є теплокровною твариною і, зокрема, ссавцем, в тому числі людиною. Фармацевтично прийнятними носіями, розчинниками, розріджувачами, ексципієнтами, ад'ювантами і наповнювачами, а також носіями-імплантатами є звичайно інертні, нетоксичні тверді або рідкі наповнювачі, розріджувачі або інкапсулюючий матеріал, які не реагують з активними інгредієнтами даного винаходу.

При парентеральному введенні сполуки за даним винаходом її звичайно готують в уніфікованій (стандартній) дозованій ін'єкційній формі (у формі розчину, суспензії, емульсії). Ці фармацевтичні готові форми, придатні для ін'єкції, включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для відтворення у стерильні ін'єкційні

розчини або дисперсії. Носієм може бути розчинник або диспергуюче середовище, що містить наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропіленгліколь, рідкий поліетиленгліколь, і т.п.), їх відповідні суміші і рослинні олії.

Необхідна текучість може підтримуватись, наприклад, застосуванням покриття, такого як лецитин, підтримуванням необхідного розміру частинок у випадку дисперсії і застосуванням поверхнево-активних речовин. Як системи розчинників для композицій сполук можуть бути також використані неводні носії, такі як бавовняна олія, кунжутна олія, оливкова олія, соєва олія, кукурудзяна олія, соняшникова олія або арахісова олія і ефіри, такі як ізопропілміристат. Крім того, можуть бути додані різні домішки, які підвищують стабільність, поліпшують стерильність та ізотонічність цих композицій, в тому числі антимікробні консерванти, антиоксиданти, хелатоутворювальні агенти і буфери. Запобігання дії мікроорганізмів може гарантуватись різними антибактеріальними і протигрибковими агентами, наприклад, парабенами, фенолом, сорбіновою кислотою, і т.п. В багатьох випадках бажано включати ізотонічні агенти, наприклад, цукор, хлорид натрію, і т.п. Пролонгована абсорбція фармацевтичної форми, яка ін'єкується, може бути одержана застосуванням агентів, які затримують абсорбцію (всмоктування), наприклад, моностеарату алюмінію і желатину. Однак, згідно з даним винаходом, будь-який носій, що використовується, розріджувач або будь-яка домішка, що використовується, повинні бути сумісними із сполуками, що розглядаються.

Стерильні розчини, які ін'єктуються, можуть бути приготовані включенням сполук, що використовуються у застосуванні на практиці даного винаходу, в необхідну кількість відповідного розчинника, необов'язково з різними іншими інгредієнтами.

Фармакологічна композиція даного винаходу може вводитись пацієнту в ін'єкційному препараті, що містить будь-який сумісний носій, такий як різні наповнювачі, ад'юванти, домішки і розріджувачі; або сполуки, що використовуються в даному винаході, можуть вводитись парентерально пацієнту у формі підшкірних імплантатів повільного вивільнення або систем націленої доставки, таких як моноклональні антитіла, векторна доставка, іон(т)офоретична доставка, полімерні матрикси, ліпосоми і мікросфери. Приклади систем доставки, застосовних в даному винаході, включають Патенти США з номерами 5225182; 5169383; 5167616; 4959217; 4925678; 4487603; 4486194; 4447233; 4447224; 4439196 і 4475196. Багато які інші такі імплантати, системи доставки і модулі добре відомі фахівцям з кваліфікацією в даній галузі.

Фармакологічна композиція сполуки, що використовується в даному винаході, може бути введена пацієнту перорально. Застосовні загальноприйняті способи, такі як введення сполуки в таблетках, суспензіях, емульсіях, капсулах, порошках, сиропях і т.п. Переважними є відомі способи, які доставляють сполуки перорально або внутрішньовенно і зберігають її біологічну активність. В одному варіанті здійснення, сполука даного винаходу може вводитись спочатку внутрішньовенно ін'єкцією, щоб довести рівні в крові до відповідного

рівня. Потім ці рівні пацієнта підтримують з використанням пероральної дозованої форми, хоча можуть бути також використані інші форми введення, залежні від стану пацієнта і вказані тут вище.

Звичайно, активна доза сполуки для людей знаходиться в діапазоні 1 нг/кг приблизно 20-100 мг/кг маси тіла на день, переважно приблизно 0,01 мг приблизно 2-10 мг/кг маси тіла на день, в схемі одна доза на день або два рази або три рази або більше на день протягом періоду 1-2 тижнів або протягом більш тривалого часу, переважно протягом 24-48 годин або безперервною інфузією протягом періоду 1-2 тижнів або більше.

Введення сполук даного винаходу в око

Сполуки даного винаходу можуть вводитись в око місцево або у формі ін'єкції, такої як інтравітреальна ін'єкція, субретинальна ін'єкція або білатеральна ін'єкція. Додаткова інформація про введення сполук даного винаходу може бути знайдена в Tolentino et al., Retina 24 (2004) 132-138; Reich et al., Molecular vision 9 (2003) 210-216.

Легеневе введення сполук даного винаходу

Терапевтичні композиції даного винаходу переважно вводять в легеню інгаляцією аерозолі,

що містить ці композиції/сполуки, або інтраназальною або інтратрахеальною інстиляцією вказаних композицій. Приготування цих композицій в ліпосомах може бути корисним для абсорбції. Крім того, ці композиції можуть включати PFC-рідину, таку як перфлуброн, і ці композиції можуть бути приготовані у вигляді комплексу сполук цього винаходу з поліетиленіміном (PEI).

Відносно додаткової інформації відносно легеневої доставки фармацевтичних композицій див. Weiss et al., Human gene therapy 10:2287-2293 (1999); Densmore et al., Molecular therapy 1:180-188 (1999); Gautam et al., Molecular therapy 3:551-556 (2001) і Shahiwala & Misra, AAPS PharmSciTech 5 (2004). Крім того, респіраторні форми для siRNA описані в Заявці на патент США з номером 2004/0063654 Davis et al.

Додаткові готові форми для поліпшеної доставки сполук даного винаходу можуть включати не приготовані у вигляді композиції сполуки, сполуки, ковалентно пов'язані з холестериним, і сполуки, пов'язані з націлюючими антитілами (Song et al., Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors, Nat Biotechnol. 2005 Jun; 23(6):709-17).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Quark Pharmaceuticals, Inc. and Silence Therapeutics AG

<120> ТЕРАПЕВТИЧНІ ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРІВ RTP801

<130> 72958-A-PCT/JPW/JAK

<140> PCT/US05/029236

<141> 2005-08-16

<150> EP 04019405.2

<151> 2004-08-16

<150> US 60/601983

<151> 2004-08-17

<150> US 60/604668

<151> 2004-08-25

<150> US 60/609786

<151> 2004-09-14

<150> US 60/638659

<151> 2004-12-22

<150> US 60/664236

<151> 2005-03-22

<150> US 60/688943

<151> 2005-06-08

<160> 344

<170> Patentin version 3.3

<210> 1

<211> 1782

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

| 113 | 92465 | 114 | |
|--------------------|--|------------|------|
| <400> 1 | | | |
| tttggccctc | gaggccaaga attcggcacg aggggggggag gtgcgagcgt | ggacctggga | 60 |
| cggtctctgg | cggtctctcg tggttggcac gggttcgcac acccattcaa | gcggcaggac | 120 |
| gcacttgtct | tagcagttct cgctgaccgc gctagctgcg gcttctacgc | tccggcactc | 180 |
| tgagttcatc | agcaaacgcc ctggcgctctg tcttcaccat gcctagcctt | tgggaccgct | 240 |
| tctcgtcgtc | gtccacctcc tcttcgcctt cgctccttgc ccgaactccc | accccagatc | 300 |
| ggccgcgcgc | ctcagcctgg gggtcggcga cccgggagga ggggtttgac | cgctccacga | 360 |
| gcctggagag | ctcggactgc gagtccctgg acagcagcaa cagtggcttc | gggcgggagg | 420 |
| aagacacggc | ttacctggat ggggtgtcgt tgcccgactt cgagctgctc | agtgaccctg | 480 |
| aggatgaaca | cttgtgtgcc aacctgatgc agctgctgca ggagagcctg | gcccaggcgc | 540 |
| ggctgggctc | tcgacgcctt gcgcgcctgc tgatgcctag ccagttggta | agccagggtg | 600 |
| gcaaagaact | actgcgcctg gcctacagcg agcctgctcg cctgcggggg | gcgctgctgg | 660 |
| acgtctgcgt | ggagcagggc aagagctgcc acagcgtggg ccagctggca | ctcgacccca | 720 |
| gcctggtgcc | caccttcacg ctgacctcgt tgctgcgcct ggactcacga | ctctggccca | 780 |
| agatccaggg | gctgtttagc tccgccaaact ctcccttcct ccctggcttc | agccagtccc | 840 |
| tgacgctgag | cactggcttc cgagtcacga agaagaagct gtacagctcg | gaacagctgc | 900 |
| tcattgagga | gtgttgaact tcaacctgag ggggccgaca gtgccctcca | agacagagac | 960 |
| gactgaactt | ttgggggtgga gactagaggc aggagctgag ggactgattc | ctgtgggttg | 1020 |
| aaaactgagg | cagccacctc aggtggaggt gggggaatag tgtttccag | gaagctcatt | 1080 |
| gagttgtgtg | cggttggtcg tgcattgggg acacataccc ctgactactg | tagcatgaaa | 1140 |
| caaaggctta | ggggccaaca aggttccag ctggatgtgt gtgtagcatg | taccttatta | 1200 |
| ttttgtttac | tgacagttaa cagtgggtgt acatccagag agcagctggg | ctgctcccg | 1260 |
| cccagcccgg | cccaggggtga aggaagaggc acgtgctcct cagagcagcc | ggagggagg | 1320 |
| gggaggtcgg | aggtcgtgga ggtggtttgt gtatcttact ggtctgaagg | gaccaagtgt | 1380 |
| gtttgttgtt | tgttttgtat cttgtttttc tgatcggagc atcactactg | acctgttgta | 1440 |
| ggcagctatc | ttacagacgc atgaatgtaa gagtaggaag ggggtgggtgt | cagggatcac | 1500 |
| ttgggatctt | tgacacttga aaaattacac ctggcagctg cgtttaagcc | ttccccatc | 1560 |
| gtgtactgca | gagttgagct ggcaggggag gggctgagag ggtgggggct | ggaaccctc | 1620 |
| ccggggagga | gtgccatctg ggtcttccat ctagaactgt ttacatgaag | ataagatact | 1680 |
| cactgttcat | gaatacactt gatgttcaag tattaagacc tatgcaatat | tttttacttt | 1740 |
| tctaataaac | atgtttgtta aaacaaaaaa aaaaaaaaaa aa | | 1782 |
| <210> 2 | | | |
| <211> 232 | | | |
| <212> Білок | | | |
| <213> Homo sapiens | | | |

| 115 | 92465 | 116 |
|---|-------|-----|
| <400> 2 | | |
| Met Pro Ser Leu Trp Asp Arg Phe Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ser | | |
| 1 5 10 15 | | |
| Pro Ser Ser Leu Pro Arg Thr Pro Thr Pro Asp Arg Pro Pro Arg Ser | | |
| 20 25 30 | | |
| Ala Trp Gly Ser Ala Thr Arg Glu Glu Gly Phe Asp Arg Ser Thr Ser | | |
| 35 40 45 | | |
| Leu Glu Ser Ser Asp Cys Glu Ser Leu Asp Ser Ser Asn Ser Gly Phe | | |
| 50 55 60 | | |
| Gly Pro Glu Glu Asp Thr Ala Tyr Leu Asp Gly Val Ser Leu Pro Asp | | |
| 65 70 75 80 | | |
| Phe Glu Leu Leu Ser Asp Pro Glu Asp Glu His Leu Cys Ala Asn Leu | | |
| 85 90 95 | | |
| Met Gln Leu Leu Gln Glu Ser Leu Ala Gln Ala Arg Leu Gly Ser Arg | | |
| 100 105 110 | | |
| Arg Pro Ala Arg Leu Leu Met Pro Ser Gln Leu Val Ser Gln Val Gly | | |
| 115 120 125 | | |
| Lys Glu Leu Leu Arg Leu Ala Tyr Ser Glu Pro Cys Gly Leu Arg Gly | | |
| 130 135 140 | | |
| Ala Leu Leu Asp Val Cys Val Glu Gln Gly Lys Ser Cys His Ser Val | | |
| 145 150 155 160 | | |
| Gly Gln Leu Ala Leu Asp Pro Ser Leu Val Pro Thr Phe Gln Leu Thr | | |
| 165 170 175 | | |
| Leu Val Leu Arg Leu Asp Ser Arg Leu Trp Pro Lys Ile Gln Gly Leu | | |
| 180 185 190 | | |
| Phe Ser Ser Ala Asn Ser Pro Phe Leu Pro Gly Phe Ser Gln Ser Leu | | |
| 195 200 205 | | |

117 92465 118
Thr Leu Ser Thr Gly Phe Arg Val Ile Lys Lys Lys Leu Tyr Ser Ser
210 215 220

| 119 | 92465 | 120 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 7 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 7 | | |
| cgugcugcgc cugcgcuca | | 19 |
| <210> 8 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 8 | | |
| ucgucgaccg cgcuaagcug | | 19 |
| <210> 9 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 9 | | |
| cugaccgcgc uagcugcgg | | 19 |
| <210> 10 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 10 | | |
| accgcgcuaag cugcgcguu | | 19 |
| <210> 11 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 121 | 92465 | 122 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 11 | | |
| agccuggaga gcucggacu | | 19 |
| <210> 12 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 12 | | |
| ccuggaagac ucggacugc | | 19 |
| <210> 13 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 13 | | |
| ucssuggaca gcaagcaaca | | 19 |
| <210> 14 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 14 | | |
| gacagcagca acaugggcu | | 19 |
| <210> 15 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 15 | | |
| acagcagcaa caguggcuu | | 19 |

| 123 | 92465 | 124 |
|---|-------|-----|
| <210> 16 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 16 gugссаасси gaugсaгси | | 19 |
| <210> 17 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 17 ассугаугса gсugсугса | | 19 |
| <210> 18 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 18 augсaгсугс ugсaгgaга | | 19 |
| <210> 19 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 19 agссгугсgg ссугсgggg | | 19 |
| <210> 20 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 125 | 92465 | 126 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 20 | | |
| cucuggcscsa agaucscag | | 19 |
| <210> 21 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 21 | | |
| cagccagucc cugascguc | | 19 |
| <210> 22 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 22 | | |
| ssscucagua cuguagcau | | 19 |
| <210> 23 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 23 | | |
| aggcagcuau cuuacagac | | 19 |
| <210> 24 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 24 | | |
| cugggucuuu caucuagaa | | 19 |

| 127 | 92465 | 128 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 25 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 25 | | |
| gaauacacuu gauguuca | | 19 |
| <210> 26 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 26 | | |
| uaagaccuau gcaauuuu | | 19 |
| <210> 27 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 27 | | |
| agaccuaguc aauuuuuu | | 19 |
| <210> 28 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 28 | | |
| gcucggacug cgaucucu | | 19 |
| <210> 29 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 129 | 92465 | 130 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 29 | | |
| uасасиuгаи гуисаагуа | | 19 |
| <210> 30 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 30 | | |
| uuиисиаааи аасаиуии | | 19 |
| <210> 31 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 31 | | |
| сгсасиугис иагсгги | | 19 |
| <210> 32 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 32 | | |
| гассгсииси сгисгисги | | 19 |
| <210> 33 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 33 | | |
| ссггаггааг асасггси | | 19 |

| 131 | 92465 | 132 |
|---|-------|-----|
| <210> 34 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 34 gaccucgagg augaacacu | | 19 |
| <210> 35 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 35 gcucgggcucu cgaacgsscu | | 19 |
| <210> 36 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 36 gssucgscgcg ccucgucgau | | 19 |
| <210> 37 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 37 gccagguaggg caaagaacu | | 19 |
| <210> 38 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 133 | 92465 | 134 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 38 | | |
| cuggccuaca gscagccgu | | 19 |
| <210> 39 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 39 | | |
| ggggggcgcu gcuaggacgu | | 19 |
| <210> 40 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 40 | | |
| gcacuggcuu ccagagcau | | 19 |
| <210> 41 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 41 | | |
| ccaggaagcu cauuaguu | | 19 |
| <210> 42 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 42 | | |
| cguguacugc agaguugag | | 19 |

| 135 | 92465 | 136 |
|---|-------|-----|
| <210> 43 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 43 ggaggugguu uguguaucu | | 19 |
| <210> 44 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 44 gассааgugu гуиугиуги | | 19 |
| <210> 45 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 45 гугугссаас сугаугсаг | | 19 |
| <210> 46 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 46 гуггагасаа gaggcagga | | 19 |
| <210> 47 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 137 | 92465 | 138 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 47 | | |
| ugssaassug augcagcug | | 19 |
| <210> 48 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 48 | | |
| саассугауг сaгсугсуг | | 19 |
| <210> 49 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 49 | | |
| сугаугсaгс ugсугсaгг | | 19 |
| <210> 50 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 50 | | |
| гаугсaгсуг сугсaггaг | | 19 |
| <210> 51 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 51 | | |
| саусгугaс ugсaгaгuu | | 19 |

| 139 | 92465 | 140 |
|---|-------|-----|
| <210> 52 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 52 gguggagacu agaggsagg | | 19 |
| <210> 53 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 53 uagaagccgc agcuagcgc | | 19 |
| <210> 54 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 54 uccgagcucu ccaggcucg | | 19 |
| <210> 55 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 55 ugcugcuguc cagggacuc | | 19 |
| <210> 56 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 141 | 92465 | 142 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 56 | | |
| agcagcugca ucagguugg | | 19 |
| <210> 57 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 57 | | |
| ugaguccagg cgcagcacg | | 19 |
| <210> 58 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 58 | | |
| cagcuagcgc gcacagcga | | 19 |
| <210> 59 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 59 | | |
| ccgcagcuag cgcggucag | | 19 |
| <210> 60 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 60 | | |
| aagccgcagc uagcgcggu | | 19 |

| 143 | 92465 | 144 |
|---|-------|-----|
| <210> 61 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 61 agusscgagcu cussagggcu | | 19 |
| <210> 62 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 62 gcagusscgag cuscussagg | | 19 |
| <210> 63 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 63 uguugcugcu gussagggga | | 19 |
| <210> 64 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 64 agccsacuguu gcugcuguc | | 19 |
| <210> 65 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 145 | 92465 | 146 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 65 | | |
| aagccacugc ucugcugc | | 19 |
| <210> 66 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 66 | | |
| agcugcauca gguuggcac | | 19 |
| <210> 67 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 67 | | |
| ucgacgacgc gcaucaggu | | 19 |
| <210> 68 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 68 | | |
| ucuccugcag cagcugcau | | 19 |
| <210> 69 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 69 | | |
| cccccagggc cgcacggc | | 19 |

| 147 | 92465 | 148 |
|---|-------|-----|
| <210> 70 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 70 ccuggaucuu gggccagag | | 19 |
| <210> 71 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 71 cagcgcacagg gacugggcug | | 19 |
| <210> 72 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 72 augcuacagu acugagggg | | 19 |
| <210> 73 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 73 gucuguaaga uagcugccu | | 19 |
| <210> 74 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 149 | 92465 | 150 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 74 | | |
| uucuagauugg aagacssag | | 19 |
| <210> 75 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 75 | | |
| uugaacauca aguguauc | | 19 |
| <210> 76 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 76 | | |
| aaaaaauugca uagguuca | | 19 |
| <210> 77 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 77 | | |
| aaaaaauuug cauagguca | | 19 |
| <210> 78 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 78 | | |
| agggacucgc agucsgac | | 19 |

| 151 | 92465 | 152 |
|---|-------|-----|
| <210> 79 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 79 uасиuгааса uсааgиua | | 19 |
| <210> 80 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 80 ааасаgиии аииаgаааа | | 19 |
| <210> 81 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 81 аасиgсиааg асааgиgсg | | 19 |
| <210> 82 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 82 асgасgасga gaаgсgиis | | 19 |
| <210> 83 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 153 | 92465 | 154 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 83 | | |
| aagccguguc uissiccg | | 19 |
| <210> 84 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 84 | | |
| agugucauc ciscagguc | | 19 |
| <210> 85 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 85 | | |
| agggcgucga gagccagc | | 19 |
| <210> 86 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 86 | | |
| aucagcaggc gcgcaggc | | 19 |
| <210> 87 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 87 | | |
| aguucuuuc ccaccugc | | 19 |

| 155 | 92465 | 156 |
|---|-------|-----|
| <210> 88 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 88 acgggcucgcu guagggccag | | 19 |
| <210> 89 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 89 acgucacgca gcgcccccc | | 19 |
| <210> 90 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 90 augacucgga agccagucg | | 19 |
| <210> 91 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 91 aacucaauga gcucuccgg | | 19 |
| <210> 92 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 157 | 92465 | 158 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 92 | | |
| сусаасисцг сагуасасг | | 19 |
| <210> 93 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 93 | | |
| агауасасаа ассассисс | | 19 |
| <210> 94 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 94 | | |
| асаасаааса сасицггис | | 19 |
| <210> 95 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 95 | | |
| сигсаисагг ицггсасас | | 19 |
| <210> 96 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 96 | | |
| иссигссиси агиссисас | | 19 |

| 159 | 92465 | 160 |
|---|-------|-----|
| <210> 97 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 97 cagcugcauc agguuggca | | 19 |
| <210> 98 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 98 cagcagcugc aucsagguug | | 19 |
| <210> 99 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 99 ccugcagcag cugcaucag | | 19 |
| <210> 100 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 100 cuccugcagc agcugcauc | | 19 |
| <210> 101 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 161 | 92465 | 162 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 101 | | |
| аасисигсаг uасасгауг | | 19 |
| <210> 102 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 102 | | |
| ссигссисиа гисиссасс | | 19 |
| <210> 103 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 103 | | |
| суагссагуи gгуаагсса | | 19 |
| <210> 104 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 104 | | |
| угауиссагу gгуиgгааа | | 19 |
| <210> 105 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 105 | | |
| ссагиггуиg gаааасуга | | 19 |

| 163 | 92465 | 164 |
|--|-------|-----|
| <210> 106 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 106 gcuuuccgagu caucaaga | | 19 |
| <210> 107 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 107 ggaagcucacu ugauguug | | 19 |
| <210> 108 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 108 ccaucugggg cuuuccaucu | | 19 |
| <210> 109 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 109 ggaugugugu guagcaugu | | 19 |
| <210> 110 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 165 | 92465 | 166 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 110 | | |
| асасааассс сисагаси | | 19 |
| <210> 111 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 111 | | |
| асаааасссси сагуасиги | | 19 |
| <210> 112 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 112 | | |
| сасигиисаи гаауасаси | | 19 |
| <210> 113 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 113 | | |
| ссасигггаи гугигугаи | | 19 |
| <210> 114 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 114 | | |
| сггаасаси гсисаиуга | | 19 |

| 167 | 92465 | 168 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 115 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 115 | | |
| gaagcacaau gaguugugu | | 19 |
| <210> 116 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 116 | | |
| ggacacaauc cccacagua | | 19 |
| <210> 117 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 117 | | |
| ggaucuuuuga cacuuuaaa | | 19 |
| <210> 118 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 118 | | |
| guagcaugua ccuuauuau | | 19 |
| <210> 119 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 169 | 92465 | 170 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 119 | | |
| усагуасигу агсауггаа | | 19 |
| <210> 120 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 120 | | |
| угугуагсау гуассиуау | | 19 |
| <210> 121 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 121 | | |
| суггаугигу гугуагсау | | 19 |
| <210> 122 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 122 | | |
| асасиугауг иусаагуау | | 19 |
| <210> 123 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 123 | | |
| гсаугааугу аагауагг | | 19 |

| 171 | 92465 | 172 |
|---|-------|-----|
| <210> 124 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 124 агсггсааса гуггсуусг | | 19 |
| <210> 125 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 125 аугааугуаа гагуаггаа | | 19 |
| <210> 126 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 126 сггсггсаас агуггсуус | | 19 |
| <210> 127 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 127 саугааугуа агагуагга | | 19 |
| <210> 128 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 173 | 92465 | 174 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 128 | | |
| gauguusaag uaauaagac | | 19 |
| <210> 129 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 129 | | |
| ugaugcagcu gcugcagga | | 19 |
| <210> 130 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 130 | | |
| gaauacacuu gauguusa | | 19 |
| <210> 131 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 131 | | |
| ugaauacacu ugauguusa | | 19 |
| <210> 132 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 132 | | |
| auacacuuca uguusaagu | | 19 |

| 175 | 92465 | 176 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 133 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 133 | | |
| саугаауаса суугаугуи | | 19 |
| <210> 134 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 134 | | |
| суггасагса гсаасагуг | | 19 |
| <210> 135 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 135 | | |
| гуисаугаау асасуугау | | 19 |
| <210> 136 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 136 | | |
| гуисаугаау асасуугау | | 19 |
| <210> 137 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 177 | 92465 | 178 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 137 | | |
| uggacagcag caacagugg | | 19 |
| <210> 138 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 138 | | |
| ugugugssaa ccugaugca | | 19 |
| <210> 139 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 139 | | |
| uucaugaaac cacucugaug | | 19 |
| <210> 140 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 140 | | |
| aaccugaugc agcugcugc | | 19 |
| <210> 141 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 141 | | |
| agucssugga cagcagcaa | | 19 |

| 179 | 92465 | 180 |
|---|-------|-----|
| <210> 142 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 142 ссссасауас uguagcaug | | 19 |
| <210> 143 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 143 ссуггасагс агсаасагу | | 19 |
| <210> 144 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 144 угугссаасс угагсгсгс | | 19 |
| <210> 145 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 145 аауасасууг аугуусааг | | 19 |
| <210> 146 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 181 | 92465 | 182 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 146 | | |
| augaaucac ucgauguc | | 19 |
| <210> 147 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 147 | | |
| ugaugcagcu gcugcagga | | 19 |
| <210> 148 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 148 | | |
| agaacuguuu acaugaaga | | 19 |
| <210> 149 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 149 | | |
| aucuagaacu guuuacaug | | 19 |
| <210> 150 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 150 | | |
| ccaugccuag csiuuggga | | 19 |

| 183 | 92465 | 184 |
|--|-------|-----|
| <210> 151 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 151 суагаасугу уаасаугаа | | 19 |
| <210> 152 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 152 гаасугууаа саугаагау | | 19 |
| <210> 153 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 153 ггуусууссау суагаасуг | | 19 |
| <210> 154 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 154 ссаусуагаа сугуууаса | | 19 |
| <210> 155 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 185 | 92465 | 186 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 155 | | |
| сииссаусиа гаасигиши | | 19 |
| <210> 156 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 156 | | |
| иагаасигиши иасаугааг | | 19 |
| <210> 157 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 157 | | |
| усииссауси агаасигиши | | 19 |
| <210> 158 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 158 | | |
| саусиагаас игишиасаи | | 19 |
| <210> 159 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 159 | | |
| гггисиисса исиагааси | | 19 |

| 187 | 92465 | 188 |
|---|-------|-----|
| <210> 160 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 160 иссаусиага асигишиас | | 19 |
| <210> 161 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 161 исиагаасиг ишиасауга | | 19 |
| <210> 162 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 162 иссаусиаг асигишиа | | 19 |
| <210> 163 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 163 гисииссаус иагаасиги | | 19 |
| <210> 164 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 189 | 92465 | 190 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 164 | | |
| саагуааааа гасуаугс | | 19 |
| <210> 165 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 165 | | |
| гуаааааааааа сиаугсааи | | 19 |
| <210> 166 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 166 | | |
| агуаааааааааа сиаугсаа | | 19 |
| <210> 167 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 167 | | |
| аугуаааааааааа аааааааааа | | 19 |
| <210> 168 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 168 | | |
| сасуаааааааааа аааааааааа | | 19 |

| 191 | 92465 | 192 |
|---|-------|-----|
| <210> 169 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 169 ссаагаусса ggggсигии | | 19 |
| <210> 170 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 170 гуисаагуаи иаагассиа | | 19 |
| <210> 171 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 171 усаагуаииа агаассиаг | | 19 |
| <210> 172 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 172 аагуаииааг ассиаугса | | 19 |
| <210> 173 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 193 | 92465 | 194 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 173 | | |
| uquucaagua uuaagassu | | 19 |
| <210> 174 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 174 | | |
| ugggucuuiss aucsagaac | | 19 |
| <210> 175 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 175 | | |
| ugggcuuасса acuggcuaq | | 19 |
| <210> 176 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 176 | | |
| uuuссаасса cuग्gaauca | | 19 |
| <210> 177 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 177 | | |
| ucaquuuuiss aaccacugq | | 19 |

| 195 | 92465 | 196 |
|--|-------|-----|
| <210> 178 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 178 uucuugauga cuscggaagc | | 19 |
| <210> 179 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 179 сасаасусаа ugagcuucc | | 19 |
| <210> 180 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 180 agauggaaga cccaugaugg | | 19 |
| <210> 181 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 181 асаугсуаса сасасаусс | | 19 |
| <210> 182 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 197 | 92465 | 198 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 182 | | |
| aguacugagg gguaugugu | | 19 |
| <210> 183 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 183 | | |
| acaguacuga gggguaugu | | 19 |
| <210> 184 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 184 | | |
| aguguaauuca ugaacagug | | 19 |
| <210> 185 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 185 | | |
| uacacacaca uccagcugg | | 19 |
| <210> 186 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 186 | | |
| ucaaugagca gcuguucsg | | 19 |

| 199 | 92465 | 200 |
|--|-------|-----|
| <210> 187 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 187 асасаасуса аугагсуус | | 19 |
| <210> 188 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 188 уасугаgggg уаугугусс | | 19 |
| <210> 189 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 189 ууусаагугу сааагаусс | | 19 |
| <210> 190 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 190 аuaauaaggua асаугсуас | | 19 |
| <210> 191 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 201 | 92465 | 202 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 191 | | |
| uuccaugsua caguacuga | | 19 |
| <210> 192 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 192 | | |
| auaagguasa ugcuasasa | | 19 |
| <210> 193 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 193 | | |
| augcuasasa cасаuuccag | | 19 |
| <210> 194 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 194 | | |
| auacuugaac аuсааgugu | | 19 |
| <210> 195 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 195 | | |
| ccuacucua саuuccaugc | | 19 |

| 203 | 92465 | 204 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 196 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 196 | | |
| сгаагссаси гуугсугси | | 19 |
| <210> 197 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 197 | | |
| уиссиасиси уасауисаи | | 19 |
| <210> 198 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 198 | | |
| гаагссасиг уугсугсиг | | 19 |
| <210> 199 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 199 | | |
| иссиасисии асаиисаиг | | 19 |
| <210> 200 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 205 | 92465 | 206 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 200 | | |
| gucuuuauac uugaасаuc | | 19 |
| <210> 201 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 201 | | |
| uccugcagca gcugcauca | | 19 |
| <210> 202 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 202 | | |
| uugaасаuca aguguauiic | | 19 |
| <210> 203 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 203 | | |
| ugaасаucaа guguauiuca | | 19 |
| <210> 204 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 204 | | |
| асuugaасаu сааguguaui | | 19 |

| 207 | 92465 | 208 |
|---|-------|-----|
| <210> 205 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 205 аасаусаагу гуауусааг | | 19 |
| <210> 206 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 206 сасугуугсу гсугуссаг | | 19 |
| <210> 207 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 207 аусаагуаа уусаагаас | | 19 |
| <210> 208 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 208 асаусаагуа уауусаага | | 19 |
| <210> 209 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 209 | 92465 | 210 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 209 | | |
| ссасигиигс угсигисса | | 19 |
| <210> 210 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 210 | | |
| угсаусаггу угсасаса | | 19 |
| <210> 211 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 211 | | |
| саусааггу аиусаагаа | | 19 |
| <210> 212 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 212 | | |
| гсагсагсиг саусаггуи | | 19 |
| <210> 213 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 213 | | |
| иугсигсиги ссагггаси | | 19 |

| 211 | 92465 | 212 |
|---|-------|-----|
| <210> 214 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 214 саугсуасаг уасугаggg | | 19 |
| <210> 215 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 215 асугуугсуг сугуссаgg | | 19 |
| <210> 216 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 216 гсугсаусаг гууггсаса | | 19 |
| <210> 217 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 217 суугаасаус аагугуаuu | | 19 |
| <210> 218 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 213 | 92465 | 214 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 218 | | |
| gaacaucaag uguauucau | | 19 |
| <210> 219 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 219 | | |
| uccugcagca gcugcauca | | 19 |
| <210> 220 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 220 | | |
| ucuucaugua aacaguucu | | 19 |
| <210> 221 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 221 | | |
| cauguaaaca guucagau | | 19 |
| <210> 222 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 222 | | |
| uccsaaaggc uaggcaugg | | 19 |

| 215 | 92465 | 216 |
|---|-------|-----|
| <210> 223 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 223 uucauguaaa сагуисаг | | 19 |
| <210> 224 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 224 аусиусагу ааасагуис | | 19 |
| <210> 225 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 225 сагуисага uggaagacc | | 19 |
| <210> 226 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 226 uгуааасагу усаагаugg | | 19 |
| <210> 227 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 217 | 92465 | 218 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 227 | | |
| aaacaguucsu agauggaag | | 19 |
| <210> 228 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 228 | | |
| cuucauguuaa acaguucua | | 19 |
| <210> 229 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 229 | | |
| aacaguucua gauggaaga | | 19 |
| <210> 230 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 230 | | |
| auguaaaacag uucuaagaug | | 19 |
| <210> 231 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 231 | | |
| aguucuaagau ggaagaccc | | 19 |

| 219 | 92465 | 220 |
|---|-------|-----|
| <210> 232 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 232 гуааасагуи суагаугга | | 19 |
| <210> 233 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 233 усаугуааас агуиуага | | 19 |
| <210> 234 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 234 уааасагуиу аагаугга | | 19 |
| <210> 235 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 235 асагуиуаг ауггаагас | | 19 |
| <210> 236 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 221 | 92465 | 222 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 236 | | |
| gsauagguu uaauasuuu | | 19 |
| <210> 237 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 237 | | |
| auugsaauaggu ucuaaauac | | 19 |
| <210> 238 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 238 | | |
| uuugsaauaggu cuuaaauacu | | 19 |
| <210> 239 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 239 | | |
| ggucuaaaua cuugaasaui | | 19 |
| <210> 240 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 240 | | |
| aauiasuuuuaa sausaagug | | 19 |

| 223 | 92465 | 224 |
|---|-------|-----|
| <210> 241 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 241 аасаgссссу gгаусиugg | | 19 |
| <210> 242 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 242 uaгgсиuaа uасиuгаас | | 19 |
| <210> 243 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 243 саuаgгсиu ааuасиuга | | 19 |
| <210> 244 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 244 ugсаuаgгс uаааиасиu | | 19 |
| <210> 245 <211> 19 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 225 | 92465 | 226 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 245 | | |
| aggucuuuauu асуугааса | | 19 |
| <210> 246 | | |
| <211> 19 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 246 | | |
| guucuaagaug gaagaccsa | | 19 |
| <210> 247 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 247 | | |
| ccaggaagcu cauugauguu u | | 21 |
| <210> 248 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 248 | | |
| ccaucugguu cuuccaucua g | | 21 |
| <210> 249 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 249 | | |
| ggaugugugu guagcaugua c | | 21 |

| 227 | 92465 | 228 |
|---|-------|-----|
| <210> 250 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 250 саагугугуи uguигуиуи u | | 21 |
| <210> 251 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 251 ссисагуаси гуагсауга а | | 21 |
| <210> 252 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 252 гассаагуи гуиуиуиуи u | | 21 |
| <210> 253 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 253 гсииссгаи саусаагаа а | | 21 |
| <210> 254 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 229 | 92465 | 230 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 254 | | |
| ggaggugggg gaauaguguu u | | 21 |
| <210> 255 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 255 | | |
| сaguасugua gсаugгааса а | | 21 |
| <210> 256 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 256 | | |
| гааuасасuu гаугuuсааg u | | 21 |
| <210> 257 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 257 | | |
| сааguаuuаа гассуаугса а | | 21 |
| <210> 258 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 258 | | |
| гаасuuuuugg gguggagасu а | | 21 |

| 231 | 92465 | 232 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 259 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 259 | | |
| ggacacaaac cccacagac u | | 21 |
| <210> 260 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 260 | | |
| ggaggugguu ugugaaucuu a | | 21 |
| <210> 261 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 261 | | |
| ggaucuuuga cacuagaaa a | | 21 |
| <210> 262 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 262 | | |
| ggucuuucaa cuagaacug u | | 21 |
| <210> 263 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 233 | 92465 | 234 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 263 | | |
| uguguaagsau guassuaau a | | 21 |
| <210> 264 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 264 | | |
| саасааггси уссагсугга u | | 21 |
| <210> 265 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 265 | | |
| сасиугггау сиуугасаси u | | 21 |
| <210> 266 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 266 | | |
| саусасуаси гассигууги a | | 21 |
| <210> 267 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 267 | | |
| гигигугуаг саугуасси a | | 21 |

| 235 | 92465 | 236 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 268 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 268 | | |
| gsaугаауги аагагуагга а | | 21 |
| <210> 269 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 269 | | |
| гасасгасга асагуггсии с | | 21 |
| <210> 270 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 270 | | |
| угаугсасги гсугсасггаг а | | 21 |
| <210> 271 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 271 | | |
| угаауасаси угауиусаа г | | 21 |
| <210> 272 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 237 | 92465 | 238 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 272 | | |
| саугааиаса сиугаугиис а | | 21 |
| <210> 273 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 273 | | |
| ggacagcagc aacaguggcu u | | 21 |
| <210> 274 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 274 | | |
| guucaugaau acacuuugaug u | | 21 |
| <210> 275 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 275 | | |
| ucaugaauac acuuugauiи c | | 21 |
| <210> 276 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 276 | | |
| ucssuggaca gcaгсаасаg u | | 21 |

| 239 | 92465 | 240 |
|--|-------|-----|
| <210> 277 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 277 агиссцгга сарсарсаас а | | 21 |
| <210> 278 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 278 гаауасасиу гаугуусааг и | | 21 |
| <210> 279 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 279 суагаасиги ууасаугааг а | | 21 |
| <210> 280 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 280 ссаусуагаа сигиууасаи г | | 21 |
| <210> 281 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 241 | 92465 | 242 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 281 | | |
| сииссаусиа гаасигиуиа с | | 21 |
| <210> 282 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 282 | | |
| усииссауси агаасигиуи а | | 21 |
| <210> 283 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 283 | | |
| саусиагаас игиуиасауг а | | 21 |
| <210> 284 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 284 | | |
| ггггсиисса усиагаасиг и | | 21 |
| <210> 285 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 285 | | |
| иссаусиага асигиуиаса и | | 21 |

| 243 | 92465 | 244 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 286 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 286 | | |
| уцуагаасуг ууасаугаа g | | 21 |
| <210> 287 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 287 | | |
| уиссаусуаg аасугууиас а | | 21 |
| <210> 288 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 288 | | |
| гусиуиссаус уагаасугуи u | | 21 |
| <210> 289 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 289 | | |
| угаугуиссаа гуауиааgас с | | 21 |
| <210> 290 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 245 | 92465 | 246 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 290 | | |
| guucaaguuu uagassuuu g | | 21 |
| <210> 291 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 291 | | |
| ucaaguuuuu agassuuug a | | 21 |
| <210> 292 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 292 | | |
| gauguucaag uuuuagass u | | 21 |
| <210> 293 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 293 | | |
| uucaaguuuu aagassuuug c | | 21 |
| <210> 294 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 294 | | |
| cuggguuuu саусиагаас u | | 21 |

| 247 | 92465 | 248 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <210> 295 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 295 | | |
| ugggucuuuc aucuagaacu g | | 21 |
| <210> 296 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 296 | | |
| асаасусааи gagcuucsig g | | 21 |
| <210> 297 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 297 | | |
| суагацггаа гасссагауг g | | 21 |
| <210> 298 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 298 | | |
| гуасаугсуа сасасасаус с | | 21 |
| <210> 299 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |

| 249 | 92465 | 250 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 299 | | |
| аасааасаас ааасасасии g | | 21 |
| <210> 300 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 300 | | |
| ииссаииса саиасиуаg g | | 21 |
| <210> 301 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 301 | | |
| ааасаасааа саасиуиgи с | | 21 |
| <210> 302 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 302 | | |
| иуиуиуиуаи гасиисггааg с | | 21 |
| <210> 303 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 303 | | |
| ааасасиаии сссссассис с | | 21 |

| 251 | 92465 | 252 |
|---|-------|-----|
| <210> 304 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 304 uuguuissaug cuasaguasi g | | 21 |
| <210> 305 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 305 асиугаасаи саагуаиу с | | 21 |
| <210> 306 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 306 uugsaauaggu cuaauiasiu g | | 21 |
| <210> 307 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 307 uagucissac cсааааагуи с | | 21 |
| <210> 308 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 253 | 92465 | 254 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 308 | | |
| аgаасgаgg ggааgаgаc с | | 21 |
| <210> 309 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 309 | | |
| ааgааасас ааассассис с | | 21 |
| <210> 310 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 310 | | |
| ииииисааgи gисаааgаис с | | 21 |
| <210> 311 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 311 | | |
| аасаgиисиа gаиggааgас с | | 21 |
| <210> 312 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 312 | | |
| аааааaggиa саиgсиасас а | | 21 |

| | 255 | 92465 | 256 |
|-------|--------------------------|-------|-----|
| <210> | 313 | | |
| <211> | 21 | | |
| <212> | PHK | | |
| <213> | Синтетична послідовність | | |
| <220> | | | |
| <223> | Хімічно синтезована | | |
| <400> | 313 | | |
| | aaccagcugg aagccuuguu g | | 21 |
| <210> | 314 | | |
| <211> | 21 | | |
| <212> | PHK | | |
| <213> | Синтетична послідовність | | |
| <220> | | | |
| <223> | Хімічно синтезована | | |
| <400> | 314 | | |
| | aagugisaaa gaucссаагу g | | 21 |
| <210> | 315 | | |
| <211> | 21 | | |
| <212> | PHK | | |
| <213> | Синтетична послідовність | | |
| <220> | | | |
| <223> | Хімічно синтезована | | |
| <400> | 315 | | |
| | uacaacaggu caguagugau g | | 21 |
| <210> | 316 | | |
| <211> | 21 | | |
| <212> | PHK | | |
| <213> | Синтетична послідовність | | |
| <220> | | | |
| <223> | Хімічно синтезована | | |
| <400> | 316 | | |
| | uaagguasaу gcuaсаса с | | 21 |
| <210> | 317 | | |
| <211> | 21 | | |
| <212> | PHK | | |
| <213> | Синтетична послідовність | | |

| 257 | 92465 | 258 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 317 | | |
| шсссиасисси иасаиисаиг с | | 21 |
| <210> 318 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 318 | | |
| гаагссасиг иигсигсиги с | | 21 |
| <210> 319 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 319 | | |
| исиссигсаг сагсигсаис а | | 21 |
| <210> 320 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 320 | | |
| сиугаасаис аагигуаиис а | | 21 |
| <210> 321 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 321 | | |
| угаасаусаа гигуаиисаи г | | 21 |

| 259 | 92465 | 260 |
|--|-------|-----|
| <210> 322 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 322 аагссасуги угсугсугис с | | 21 |
| <210> 323 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 323 асаусаагуг иаиусаугаа с | | 21 |
| <210> 324 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 324 гаасаусааг игуаиусауг а | | 21 |
| <210> 325 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 325 асугиуусуг сугиссаггг а | | 21 |
| <210> 326 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 261 | 92465 | 262 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 326 | | |
| uguugcugcu guccagggac u | | 21 |
| <210> 327 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 327 | | |
| асиугаасаи саагугуаии с | | 21 |
| <210> 328 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 328 | | |
| усиусаугиа аасагусиуа g | | 21 |
| <210> 329 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 329 | | |
| саугуаааса гуисаагауг g | | 21 |
| <210> 330 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 330 | | |
| гуаааасагуи саагауггаа g | | 21 |

| 263 | 92465 | 264 |
|---|-------|-----|
| <210> 331 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 331 uaaacaguc uagauugaag a | | 21 |
| <210> 332 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 332 ucauguaaac aguucuaau g | | 21 |
| <210> 333 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 333 acagucuaag auggaagac c | | 21 |
| <210> 334 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність <220> <223> Хімічно синтезована <400> 334 auguaaacag uucuaugag a | | 21 |
| <210> 335 <211> 21 <212> РНК <213> Синтетична послідовність | | |

| 265 | 92465 | 266 |
|--------------------------------|-------|-----|
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 335 | | |
| сиисаугаа асагуисаг а | | 21 |
| <210> 336 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 336 | | |
| угааасаги усаугауга а | | 21 |
| <210> 337 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 337 | | |
| аасагуиси агауггаага с | | 21 |
| <210> 338 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 338 | | |
| ггуисааааа сиугаасаис а | | 21 |
| <210> 339 | | |
| <211> 21 | | |
| <212> РНК | | |
| <213> Синтетична послідовність | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 339 | | |
| сауаггуси аауасиугаа с | | 21 |
| 80 | | |
| <220> | | |
| <223> Хімічно синтезована | | |
| <400> 344 | | |
| сагуисаага уггаагассс а | | 21 |

Полінуклеотид RTP801 людини (SEQ ID NO:1)

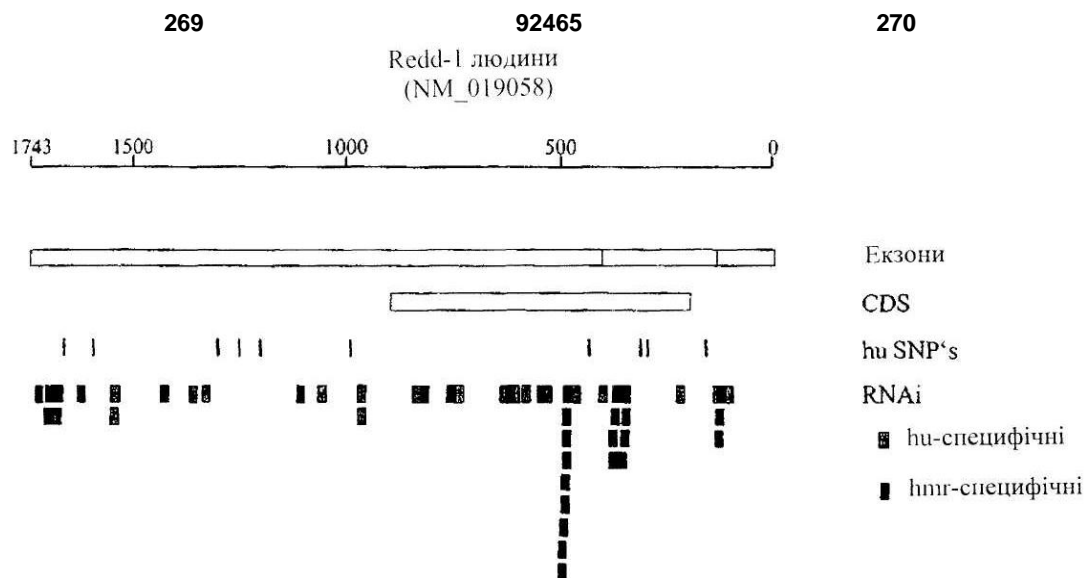
TTTGGCCCTC GAGGCCAAGA ATTGGGCACG AGGGGGGGAG GTGCGAGCGT GGACCTGGGA 60
 CGGGTCTGGG CGGCTCTCGG TGGTTGGCAC GGGTTCGCAC ACCCATTCAA GCGGCAGGAC 120
 GCACTTGTCT TAGCAGTTCT CGCTGACCGC GCTAGCTGCG GCTTCTACGC TCCGGCACTC 180
 TGAGTTCATC AGCAAACGCC CTGGCGTCTG TCCTCACCAT GCCTAGCCTT TGGGACCGCT 240
 TCTCGTCGTC GTCCACCTCC TCTTCGCCCT CGTCCTTGCC CCGAACTCCC ACCCCAGATC 300
 GGC CGCCCGG CTCAGCCTGG GGGTCGGCGA CCCGGGAGGA GGGGTTTGAC CGTCCACGA 360
 GCCTGGAGAG CTCGGACTGC GAGTCCCTGG ACAGCAGCAA CAGTGGCTTC GGGCCGGAGG 420
 AAGACACGGC TTACCTGGAT GGGGTGTCTG TGCCCGACTT CGAGCTGCTC AGTGACCTG 480
 AGGATGAACA CTTGTGTGCC AACCTGATGC AGCTGCTGCA GGAGAGCCTG GCCCAGGCGC 540
 GGCTGGGCTC TCGACGCCCT GCGCGCCTGC TGATGCCTAG CCAGTTGGTA AGCCAGGTGG 600
 GCAAAGAAGT ACTGCGCCTG GCCTACAGCG AGCCGTGCGG CCTGCGGGGG GCGCTGCTGG 660
 ACGTCTCGCT GGAGCAGGGC AAGAGCTGCC ACAGCGTGGG CCAGCTGGCA CTCGACCCCA 720
 GCCTGGTGCC CACCTTCCAG CTGACCCTCG TGCTGCGCCT GGA CTACGA CTCTGGCCCA 780
 AGATCCAGGG GCTGTTTAGC TCCGCCAAGT CTCCCTTCTT CCCTGGCTTC AGCCAGTCCC 840
 TGACGCTGAG CACTGGCTTC CGAGTCATCA AGAAGAAGCT GTACAGCTCG GAACAGCTGC 900
 TCATTGAGGA GTGTTGAAGT TCAACCTGAG GGGGCCGACA GTGCCCTCCA AGACAGAGAC 960
 GACTGAACCT TTGGGGTGA GACTAGAGGC AGGAGCTGAG GGA CTGATT CTGTGGTTGG 1020
 AAAACTGAGG CAGCCACCTA AGGTGGAGGT GGGGGAATAG TGTTCCTCAG GAAGCTCATT 1080
 GAGTTGTGTG CGGGTGGCTG TGCATTGGGG ACACATACCC CTCAGTACTG TAGCATGAAA 1140
 CAAAGGCTTA GGGGCCAACA AGGCTTCCAG CTGGATGTGT GTGTAGCATG TACCTTATTA 1200
 TTTTGTGTAC TGACAGTTAA CAGTGGTGTG ACATCCAGAG AGCAGCTGGG CTGCTCCCGC 1260
 CCCAGCCCGG CCCAGGGTGA AGGAAGAGGC ACGTGTCTCT CAGAGCAGCC GGAGGGAGGG 1320
 GGGAGGTGCG AGGTGCTGGA GGTGGTTTGT GTATCTTACT GGTCTGAAGG GACCAAGTGT 1380
 GTTTGTGTGT TGTTTGTAT CTGTCTTTTC TGATCGGAGC ATCACTACTG ACCTGTTGTA 1440
 GGCAGCTATC TTACAGACGC ATGAATGTAA GAGTAGGAAG GGGTGGGTGT CAGGGATCAC 1500
 TTGGGATCTT TGACACTTGA AAAATTACAC CTGGCAGCTG CGTTTAAGCC TTCCCCATC 1560
 GTGTACTGCA GAGTTGAGCT GGCAGGGGAG GGGCTGAGAG GGTGGGGCT GGAACCCCTC 1620
 CCCGGGAGGA GTGCCATCTG GTCTTCCAT CTAGAACTGT TTACATGAAG ATAAGATACT 1680
 CACTGTTTAT GAATACACTT GATGTTCAAG TATTAAGACC TATGCAATAT TTTTACTTT 1740
 TCTAATAAAC ATGTTTGTTA AAACAAAAAA AAAAAAAAAA AA 1782

Фіг. 1

Поліпептид RTP801 людини (SEQ ID NO:2)

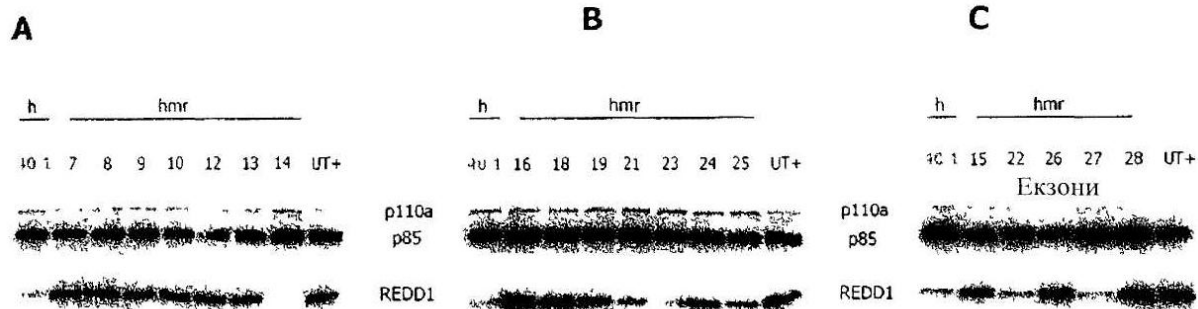
MPSSLWDRFSS SSTSSSPSSL PRTPTPDRPP RSAWGSATRE EGFDRSTSLE 50
 SSDCESLDSS NSGFGPEEDT AYLDGVSLPD FELLSDPEDE HLCANLMQLL 100
 QESLAQARLG SRRPARLLMP SQLVSQVGKE LLRLAYSEPC GLRGALLDVC 150
 VEQGKSCHSV GQLALDPSLV PTFQLTLVLR LDSRLWPKIQ GLFSSANSPP 200
 LPGFSQSLTL STGFRVIKKK LYSSEQLLIE EC 232

Фіг. 2

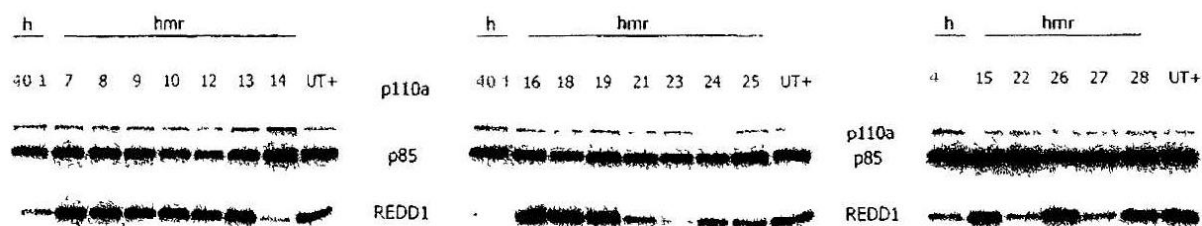


Фіг. 3

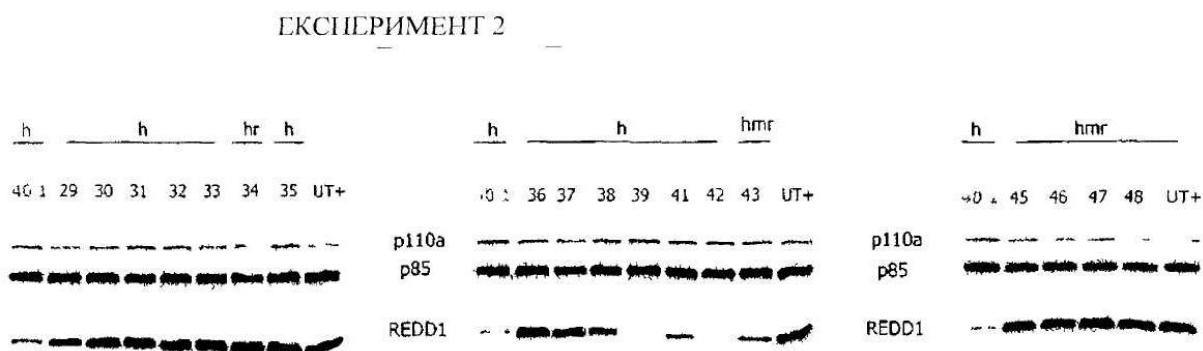
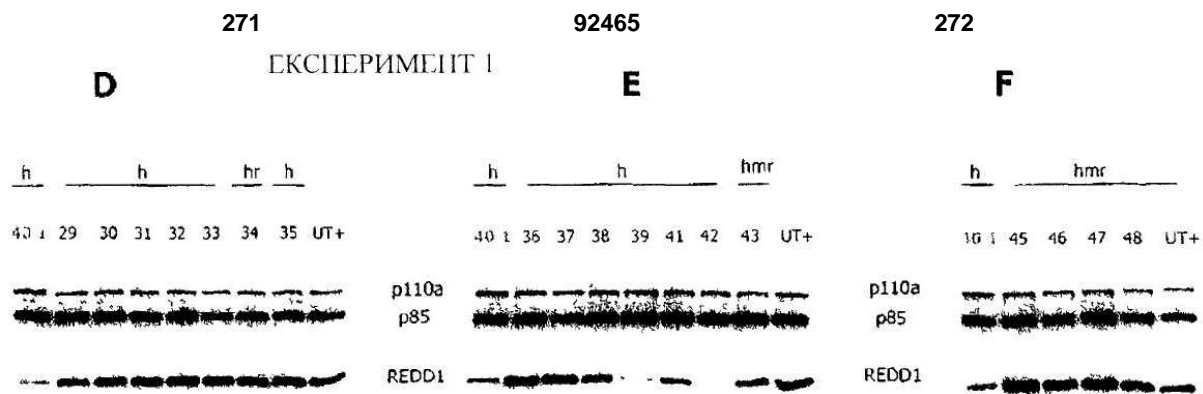
ЕКСПЕРИМЕНТ 1



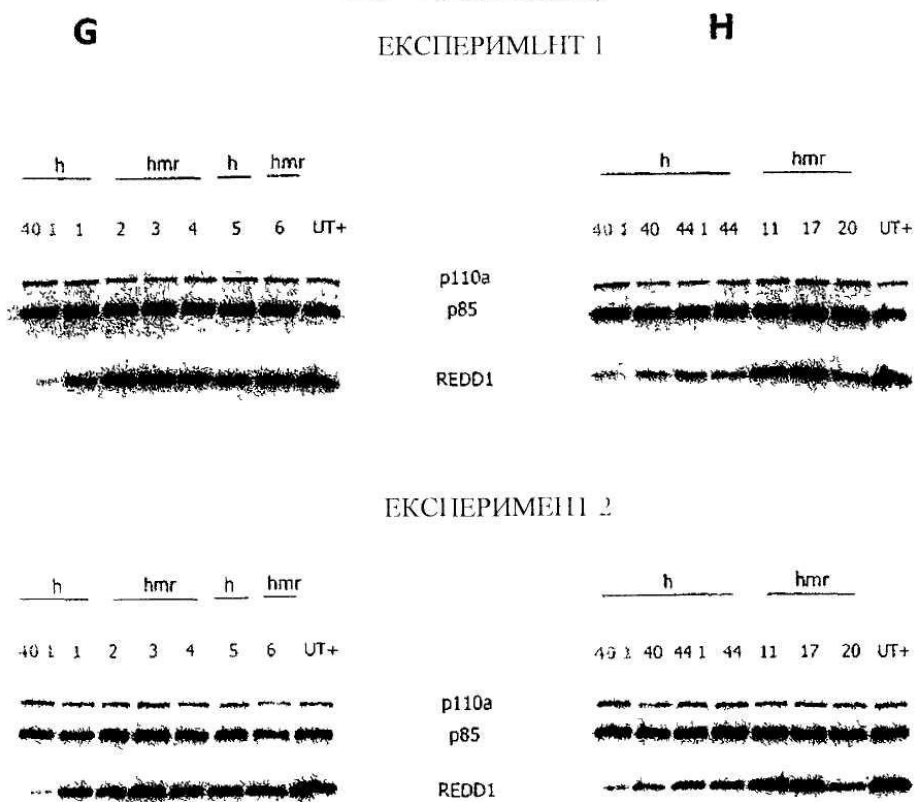
ЕКСПЕРИМЕНТ 2



Фіг. 4 (частина I)



Фіг 4 (частина II)



Фіг 4 (частина III)

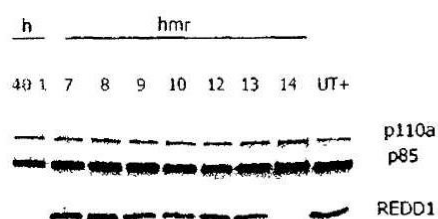
273

92465

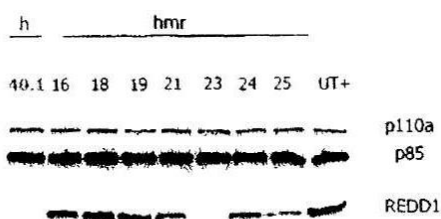
274

ЕКСПЕРИМЕНТ 1

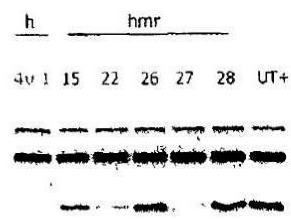
A



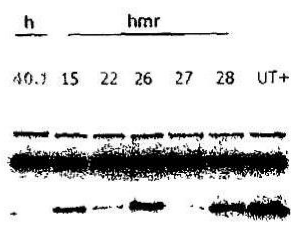
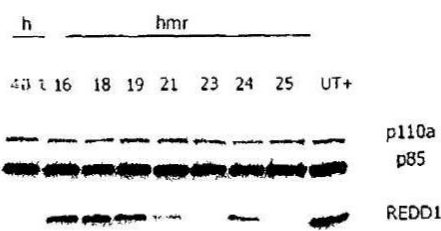
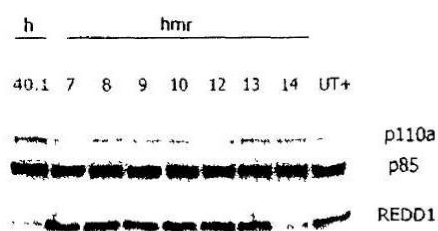
B



C



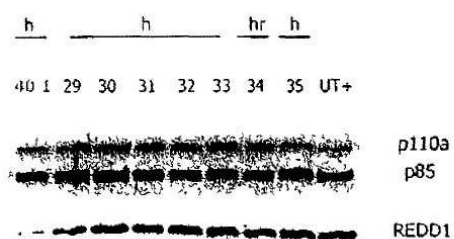
ЕКСПЕРИМЕНТ 2



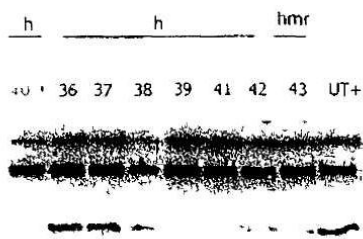
Фіг. 5 (частина I)

D

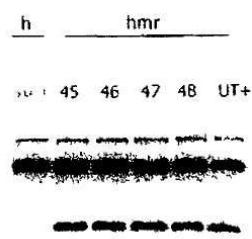
ЕКСПЕРИМЕНТ 1



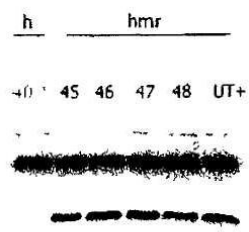
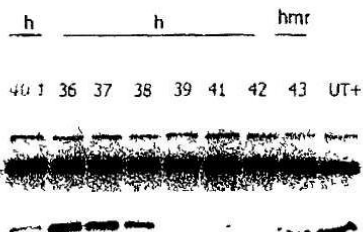
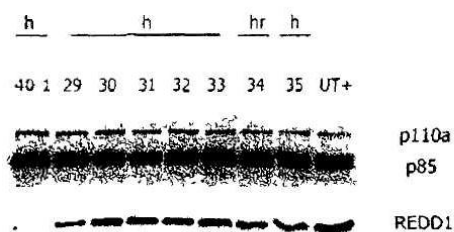
E



F



ЕКСПЕРИМЕНТ 2



Фіг. 5 (частина II)

275

92465

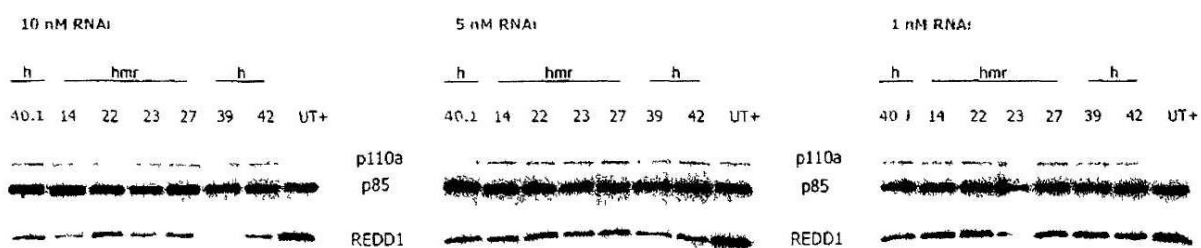
276

ЭКСПЕРИМЕНТ 1

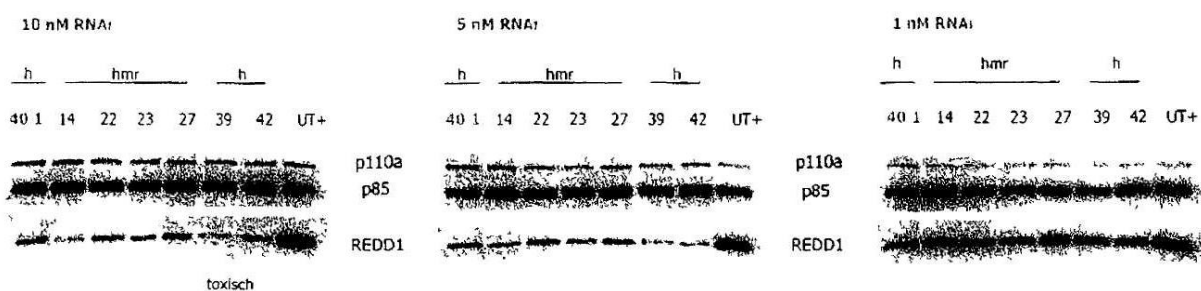
A

B

C

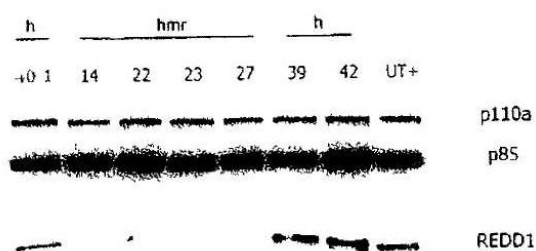


ЭКСПЕРИМЕНТ 2

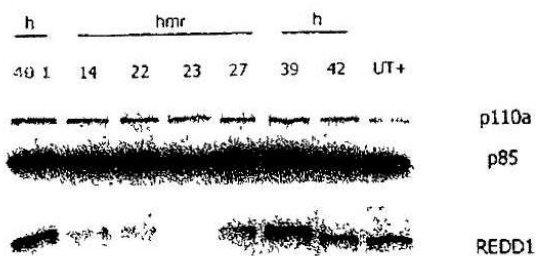


Фиг. 6

ЭКСПЕРИМЕНТ 1

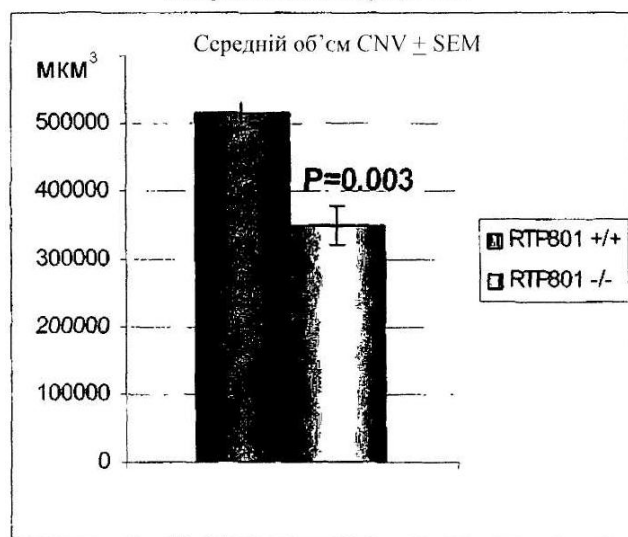


ЭКСПЕРИМЕНТ 2



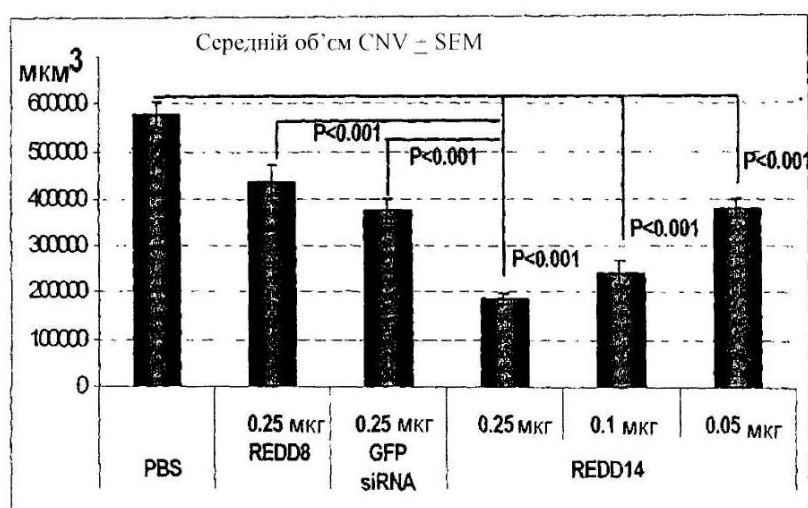
Фиг. 7

Підтікання кровоносних судин у мишей з
нокаутом RTP801 (KO) у порівнянні з
контролем після індукції CNV



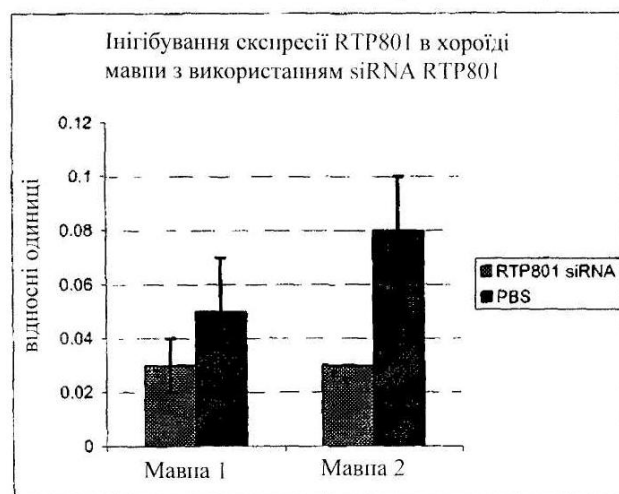
Фіг. 8

Зменшення об'єму CNV у відповідь на siRNA RTP801
(REDD14) у порівнянні з контролями



Фіг. 9

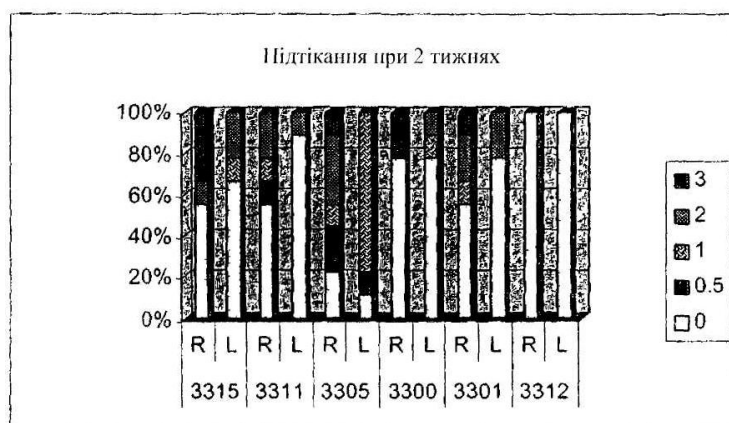
Зменшення експресії RTP801 в хороїдах
оброблених лазером мавп у відповідь на siRNA RTP801
в порівнянні з контролем.
виміряне за допомогою ПЛІР реального часу



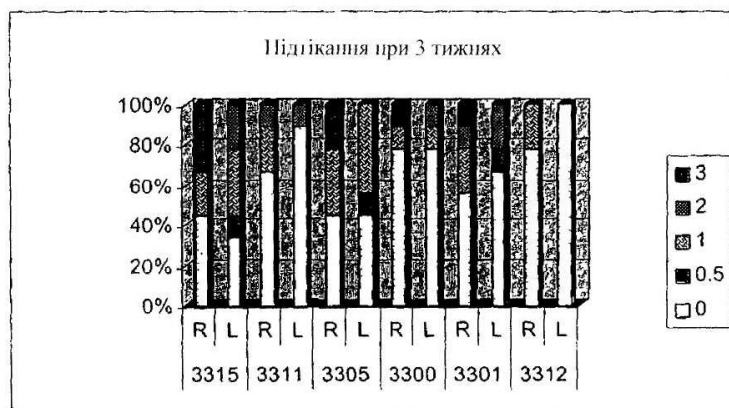
Фіг. 10

Зменшення підтікання в моделі CNV неспримага
у відповідь на siRNA RTP801 у порівнянні з контролем

a)



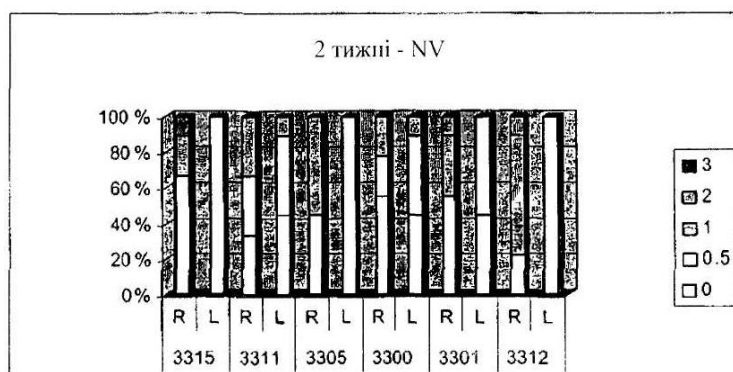
b)



Фіг. 11

Зменшення підтікання в моделі CNV непримата
у відповідь на siRNA RTP801 у порівнянні з контролем

a)



b)

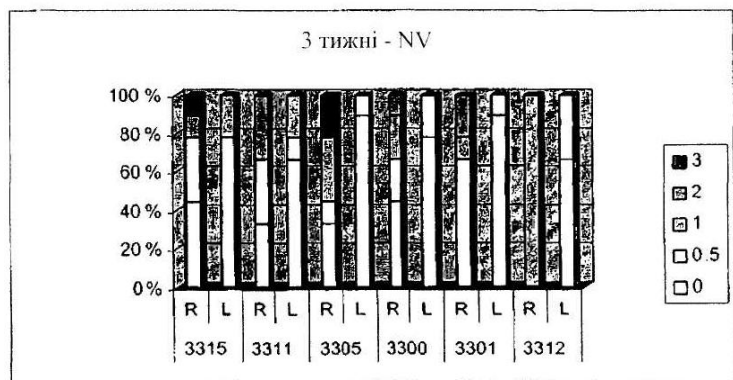
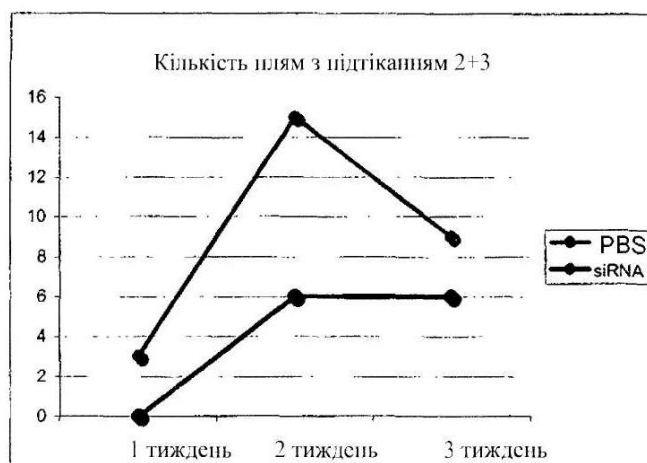
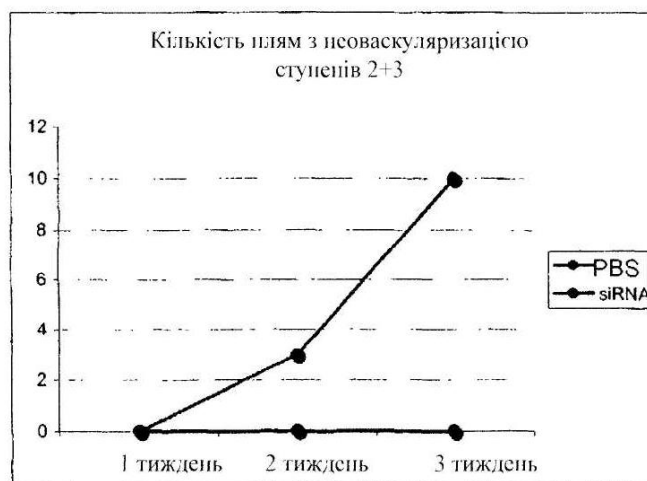


Fig. 12

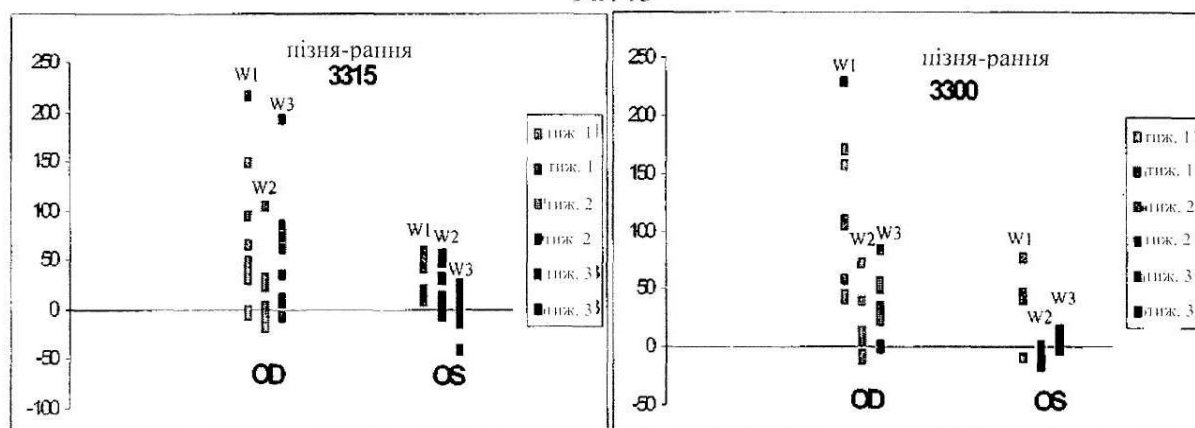
a)



b)



Фіг. 13



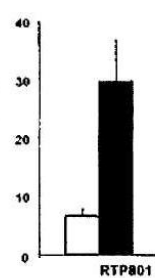
Фіг. 14

a.

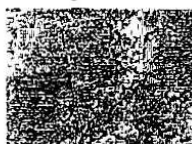


b.

Активна каспаза 3
(число клітин на одне поле зору)



Контроль

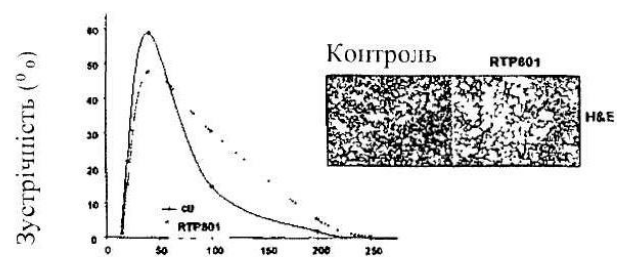


RTP801



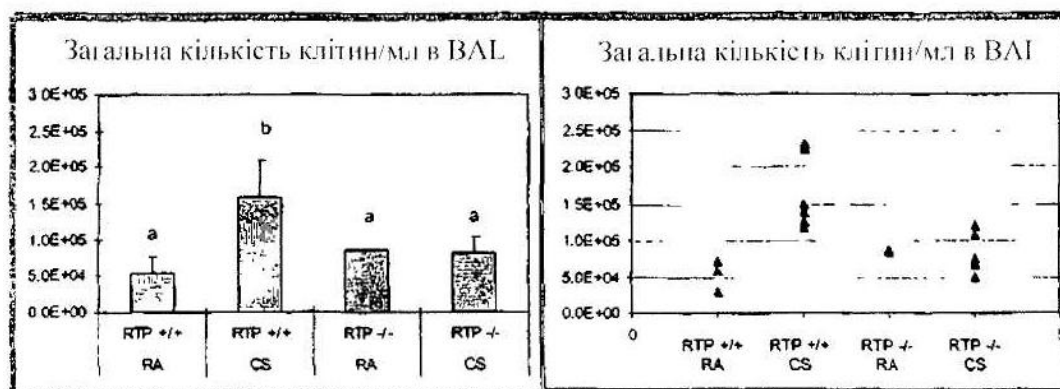
Активна каспаза 3 ППС

c.

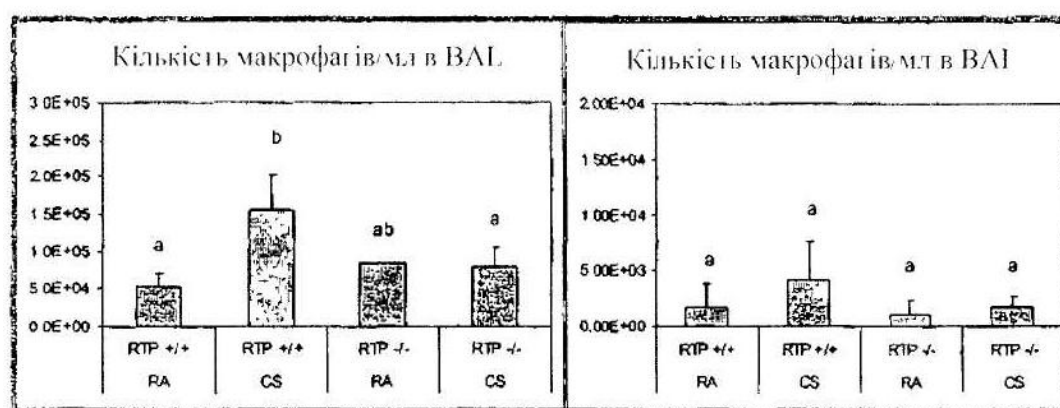


Фіг. 15

a.



b.



c.

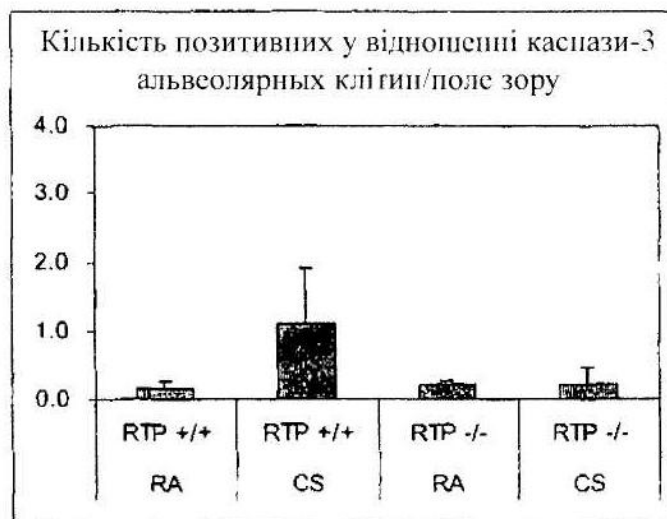


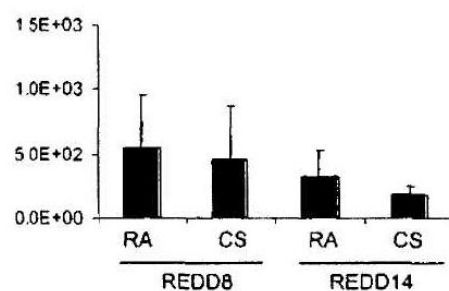
Fig. 16

a.



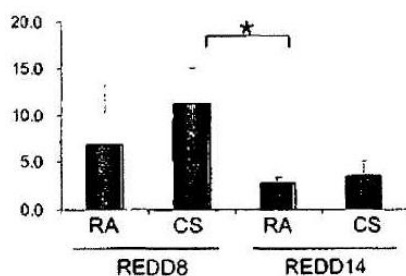
b.

Інтенсивність експресуючих
PRT801 клітин в легені



c.

Експресія активної каспази-3
в легені



Кількість позитивних у
відношенні антитіл проти
активної каспази-3 клітин/поле
зору в легені

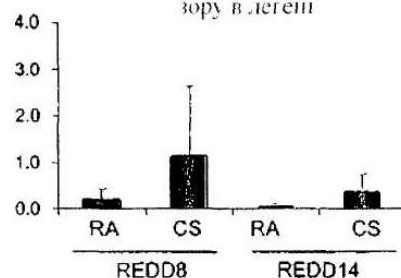
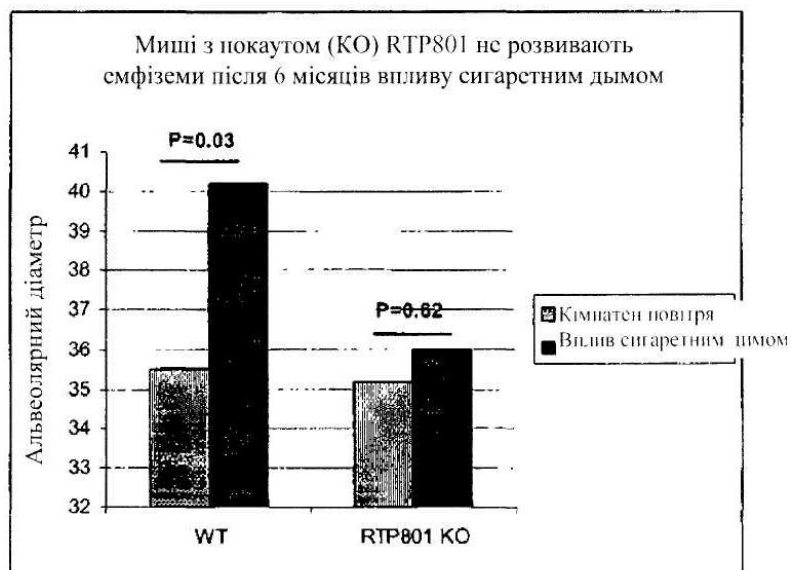
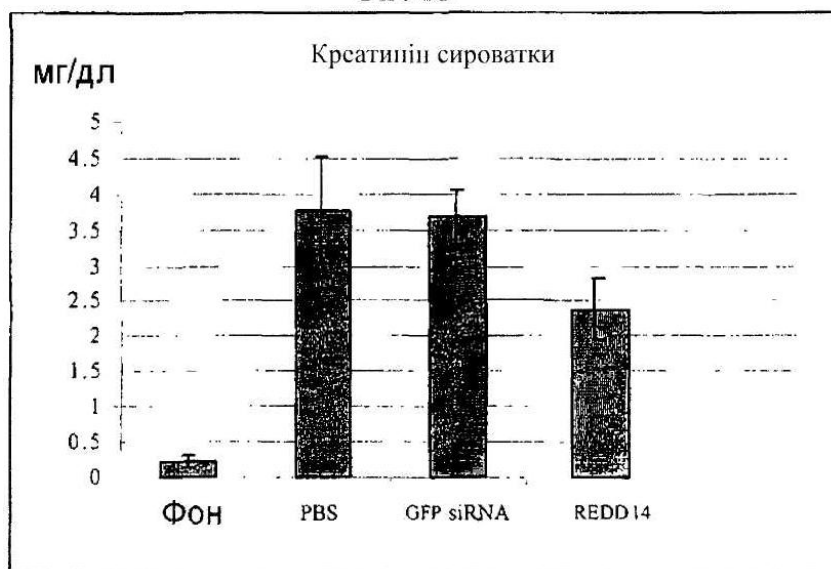


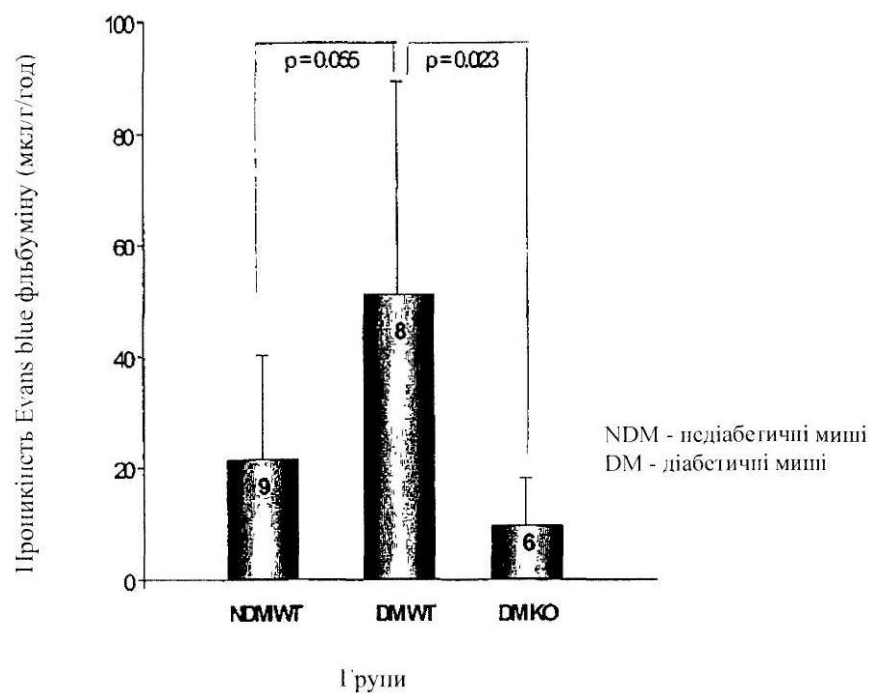
Fig. 17



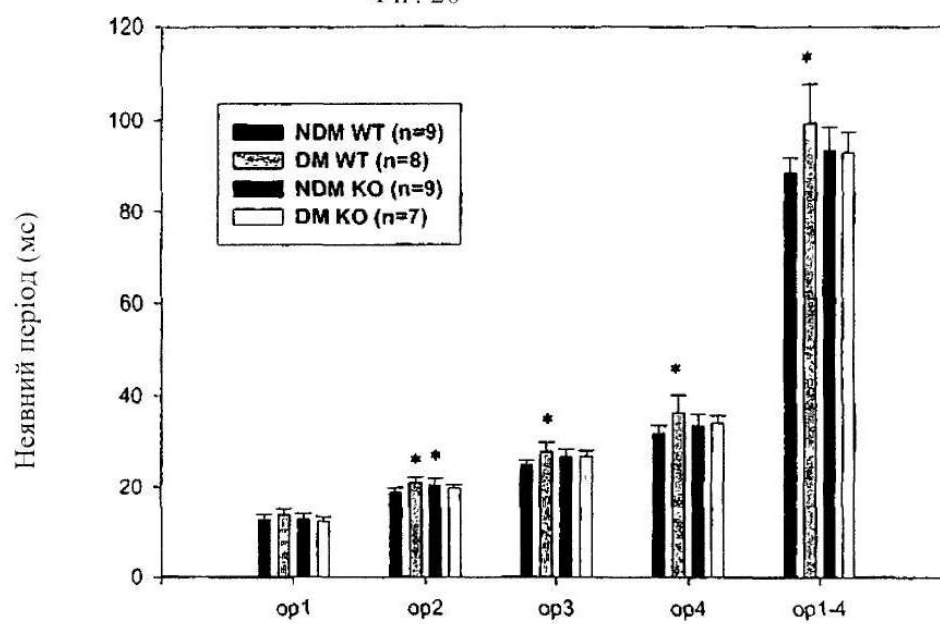
Фіг. 18



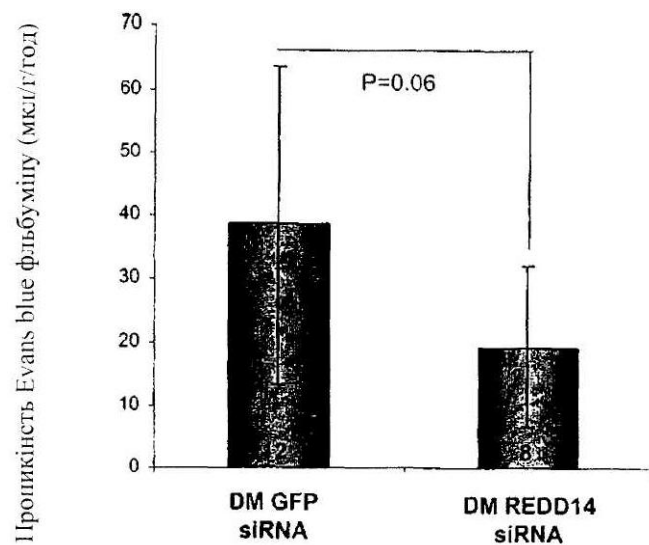
Фіг. 19



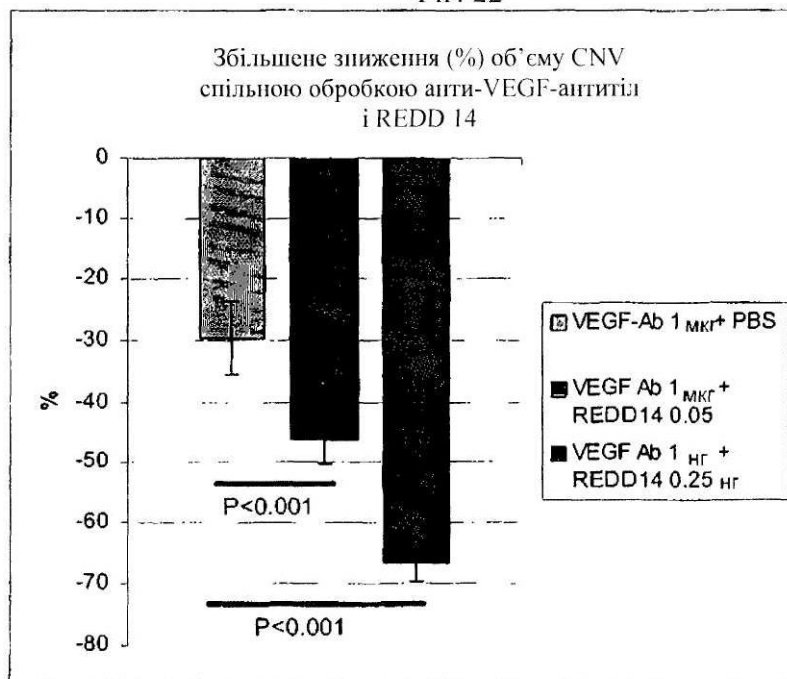
Фіг. 20



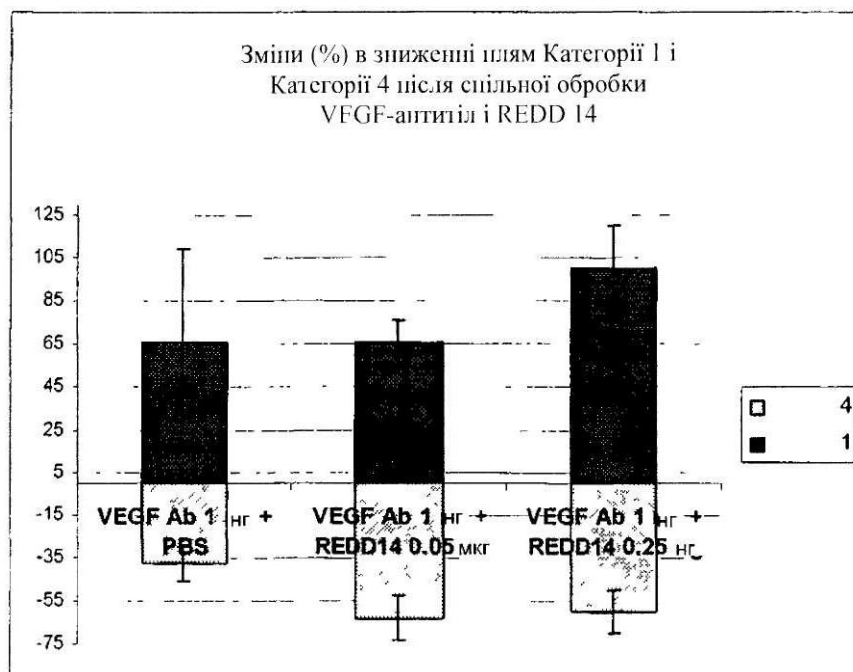
Фіг. 21



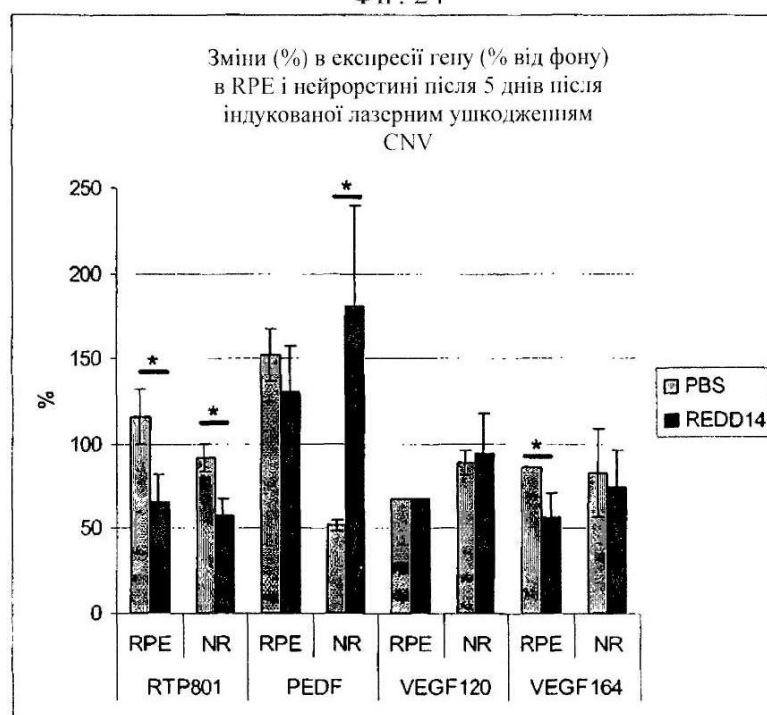
Фіг. 22



Фіг. 23

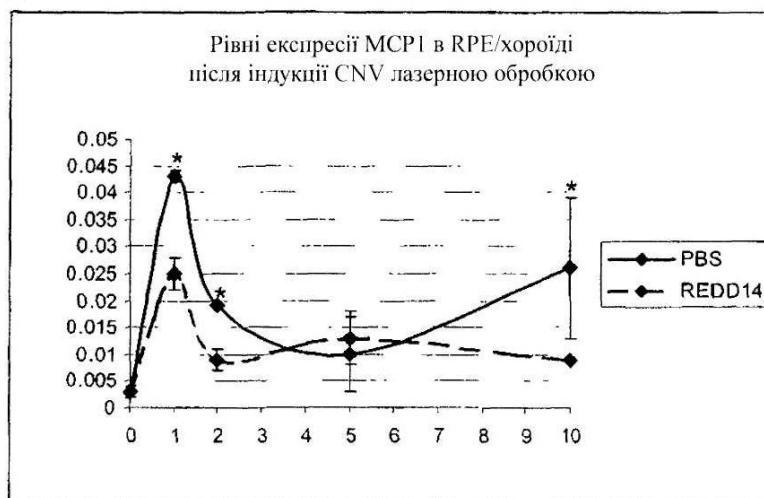


Фіг. 24

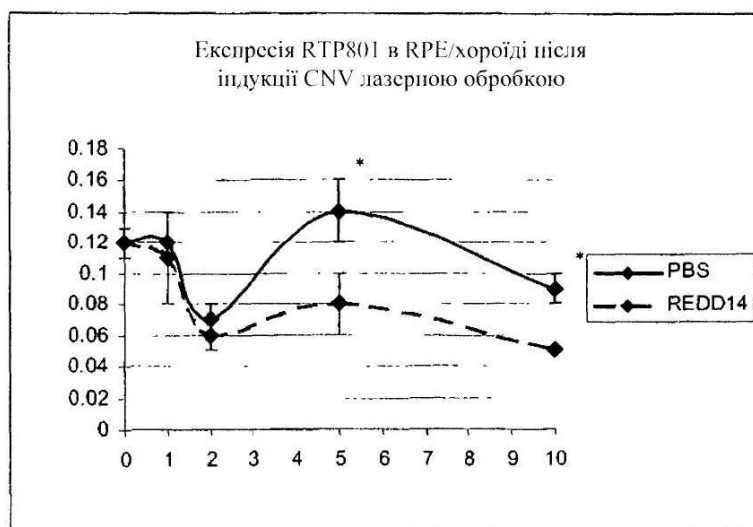


Фіг. 25

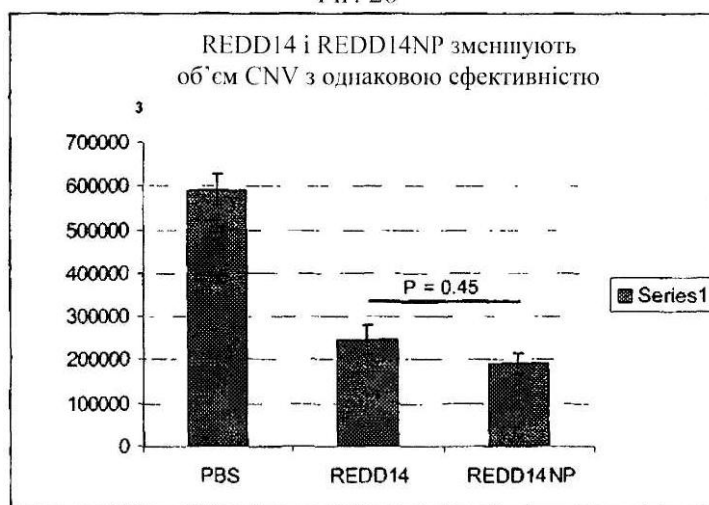
a)



b)



Фіг. 26



Фіг. 27

В описі до патенту на винахід графічні зображення та текст подаються в редакції заявника

Комп'ютерна верстка О. Гапоненко

Підписне

Тираж 28 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601