



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009145502/10, 09.05.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
09.05.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.05.2007 JP 2007-125045

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2011 Бюл. № 17

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: WO 2003/070881 A2, 28.08.2003. WO
2005/014810 A1, 17.02.2005. RU 2003119457 A,
20.12.2004. US 20060051789 A1, 09.03.2006(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 09.12.2009(86) Заявка РСТ:
JP 2008/058990 (09.05.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/140126 (20.11.2008)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Большая Спасская, 25, стр.
3, ООО "Юридическая фирма "Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

АБЕ Хирочи (JP),
ИТО Йосихиро (JP),
АБЕ Наоко (JP),
ТОЙОБУКУ Хидеказу (JP)

(73) Патентообладатель(и):

РИКЕН (JP),
ОЦУКА ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.
(JP)

(54) ОДНОЦЕПОЧЕЧНАЯ КОЛЬЦЕВАЯ РНК И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

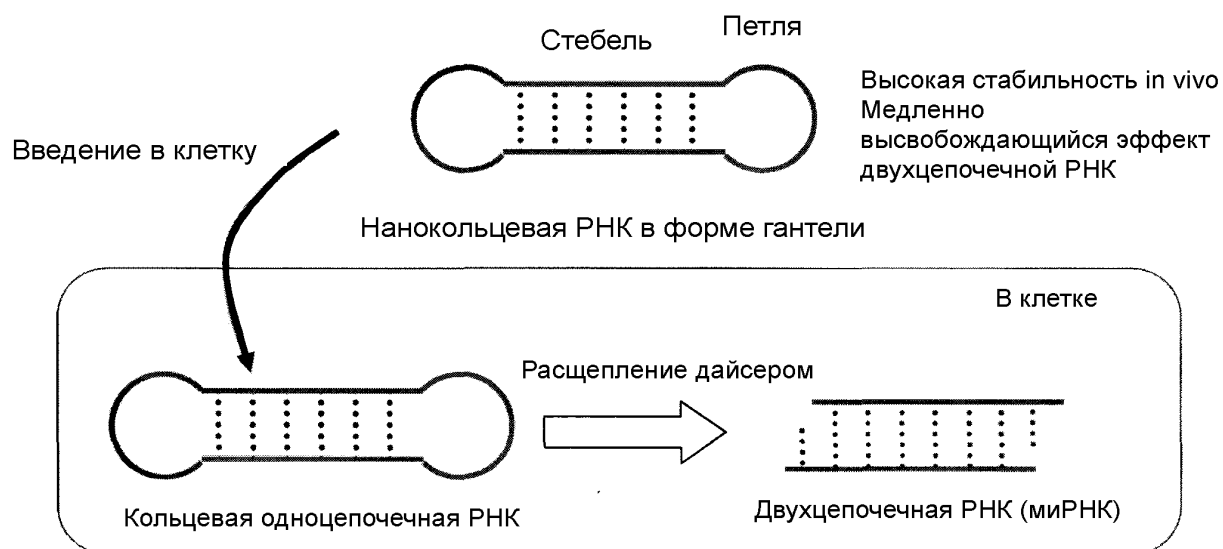
(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии, в частности к способу получения одноцепочечной кольцевой РНК. Способ включает синтез смысловой цепи и антисмысловой цепи, содержащих нуклеотидную последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце и 3'-конце, и одновременно лигирование нуклеотида на 5'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в смысловой цепи с нуклеотидом на 3'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в антисмысловой цепи и, наоборот, с использованием лигазы. Нуклеотидная

последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце смысловой цепи и нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 3'-конце антисмысловой цепи связаны друг с другом с образованием петли. Нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 3'-конце смысловой цепи и нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце антисмысловой цепи также связаны друг с другом с образованием петли. Смысловая и антисмысловая цепи спарены с образованием

стебля. Длина петли составляет 9 нуклеотидов, а
длина стебля составляет от 19 до 31 нуклеотида.

2 з.п. ф-лы, 9 ил., 5 пр.



ФИГ.1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01)*C12N 15/10* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2009145502/10, 09.05.2008**(24) Effective date for property rights:
09.05.2008

Priority:

(30) Convention priority:
09.05.2007 JP 2007-125045(43) Application published: **20.06.2011 Bull. № 17**(45) Date of publication: **20.07.2014 Bull. № 20**(85) Commencement of national phase: **09.12.2009**(86) PCT application:
JP 2008/058990 (09.05.2008)(87) PCT publication:
WO 2008/140126 (20.11.2008)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja, 25, str. 3,
OOO "Juridicheskaja firma "Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**ABE Khirosi (JP),
ITO Josikhiro (JP),
ABE Naoko (JP),
TOJOBUKU Khidekazu (JP)**

(73) Proprietor(s):

**RIKEN (JP),
OTsUKA FARMAS'JUTIKAL KO., LTD. (JP)**(54) **SINGLE-STRANDED CIRCULAR RNA AND METHOD FOR PRODUCING IT**

(57) Abstract:

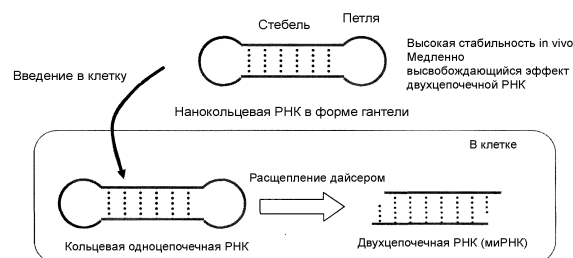
FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biochemistry, particularly to a method for producing a single-stranded circular RNA. The method involves a synthesis of a sense chain and an anti-sense chain containing a nucleotide sequence with unpaired nucleotides on 5'-terminal and 3'-terminal, in a combination with a ligation of the nucleotide on 5'-terminal of the nucleotide sequence with the unpaired nucleotides in the sense chain with the nucleotide on 3'-terminal of the nucleotide sequence with the unpaired nucleotides in the anti-sense chain and vice versa with using lygase. The nucleotide sequence with the unpaired nucleotides on 5'-terminal of the sense chain and the nucleotide sequence with the unpaired nucleotides on 3'-terminal of the anti-sense chain are looped together. The nucleotide sequence with the unpaired nucleotides on 3'-terminal of the sense chain and the nucleotide sequence with the unpaired

nucleotides on 5'-terminal of the anti-sense chain are also looped together. The sense and anti-sense chains are stemmed together. The loop length makes 9 nucleotides, while the stem length makes 19 to 31 nucleotides.

EFFECT: producing the single-stranded circular RNA.

3 cl, 9 dwg, 5 ex



ФИГ.1

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к одноцепочечной кольцевой РНК, к способу получения такой РНК и к фармацевтической композиции, содержащей такую РНК.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Обычные способы интерференции РНК, как правило, разделяют на две группы: способ с использованием химически синтезированных двухцепочечных РНК и способ с использованием плазмидных векторов. Способ интерференции РНК с использованием плазмидных векторов широко используется в области биотехнологии, главным образом в фундаментальных биологических экспериментах. Однако когда способ интерференции РНК применяется для разработки фармацевтических препаратов, способ с использованием плазмидных векторов связан с проблемой безопасности для человеческого организма. Таким образом, вероятно, более предпочтительным является использование химически синтезированных двухцепочечных РНК.

Однако с химически синтезированными двухцепочечными РНК связана проблема, состоящая в том, что они нестабильны *in vivo*, а именно восприимчивы к деградации ферментами (нуклеазами) в клетках. Для решения этой проблемы были разработаны цепочки РНК с искусственными нуклеиновыми кислотами для увеличения стабильности двухцепочечных РНК в клетках; однако существует другая проблема, состоящая в том, что их биологическая активность снижается, несмотря на то, что стабильность повышается. Более того, не известна токсичность, вызванная искусственными нуклеиновыми кислотами. Поэтому сохраняется трудность в применении в фармацевтических препаратах.

Формы двухцепочечной РНК, используемые в способе интерференции РНК, включают двухцепочечную РНК, обладающую тупыми концами или липкими концами, РНК, обладающую шпильчатой структурой с петлей на любом конце двухцепочечной РНК (JP2003-502012A), кольцевую нуклеиновую кислоту, которая содержит приблизительно 19 пар оснований, две петли, и необязательно химически модифицированные полинуклеотиды (JP2006-271387A), и тому подобное. Однако эту кольцевую нуклеиновую кислоту не подвергали тестированию на эффект интерференции РНК.

Кроме того, описана химерная РНК-ДНК нуклеиновая кислота в форме гантели (JP11-137260A(1999)). Эта нуклеиновая кислота не предназначена для использования для интерференции РНК. Рибонуклеиновая часть нуклеиновой кислоты в форме гантели расщепляется ферментом в клетках, и полученная антисмысловая дезоксирибонуклеиновая часть связывается с мРНК в клетках и ингибирует ее. В JP11-137260A(1999) описана нуклеиновая кислота, которая обладает высокой устойчивостью к ферментам, участвующим в деградации нуклеиновой кислоты в клетках, и остается стабильной в процессе действия рибонуклеазы Н из-за ее структуры в форме гантели. Дополнительно описано, что, так как одноцепочечный олигонуклеотид, содержащий антисмысловую дезоксирибонуклеиновую часть, может быть высвобожден в цитоплазму клетки только после расщепления комплементарной рибонуклеиновой части под действием рибонуклеазы Н, то предполагается увеличение антисмыслового эффекта на дозу.

Кроме того, относительно способа синтеза кольцевой нуклеиновой кислоты, обладающей структурой в форме гантели, например, раскрыто, что синтезированы линейные олигонуклеотиды, стебель и петля шпильки образованы для получения одноцепочечного разрыва олигонуклеотида в форме гантели, где мишеневый кольцевой олигонуклеотид в форме гантели (противоположный конец вышеупомянутой петли шпильки) в одном месте не связан, и 5'-конец лигирован лигазой для создания кольцевой

нуклеиновой кислоты в форме кольцевой гантели (JP11-137260(1999)).

Целью настоящего изобретения является одноцепочечная кольцевая РНК и способ ее получения.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 В настоящее время авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что одноцепочечная кольцевая РНК может быть получена с высоким выходом посредством
раздельного синтеза смысловой цепи и антисмысловой цепи, обе содержат нуклеотидную
последовательность с неспаренными нуклеотидами на каждом конце, и предоставления
лигазе возможности действовать на нуклеотиды на обоих концах одновременно, и что
10 полученная одноцепочечная кольцевая РНК приводит в действие продолжительный
или медленно высвобождающийся эффект интерференции РНК. Основываясь на этих
научных данных, авторы настоящего изобретения осуществили настоящее изобретение.

Более конкретно, настоящее изобретение относится к следующим изобретениям.

(1) Одноцепочечной кольцевой РНК, обладающей продолжительным или медленно
15 высвобождающимся эффектом интерференции РНК, отличающейся тем, что
одноцепочечная кольцевая РНК содержит последовательность смысловой цепи,
последовательность антисмысловой цепи, комплементарную последовательности
смысловой цепи, две одинаковые или отличающиеся последовательности петли между
смысловой цепью и антисмысловой цепью, соединяющие обе цепи, где смысловая цепь
20 и антисмысловая цепь спарены с образованием стебля.

(2) Одноцепочечная кольцевая РНК, как описано в (1), где экспрессия мишеневой
РНК составляет 0,4 или менее 24 часа после введения одноцепочечной кольцевой РНК
в эукариотические клетки, по сравнению с контрольными клетками, уровень экспрессии
в которых мишеневой РНК взят за 1.

25 (3) Одноцепочечная кольцевая РНК согласно вышеупомянутому (1) или (2), где 70%
или более одноцепочечной кольцевой РНК после 8 часов сохраняется в сыворотке
человека.

(4) Способ получения одноцепочечной кольцевой РНК согласно любому из
вышеупомянутых с (1) до (3), включающий синтез смысловой цепи и антисмысловой
30 цепи, которые содержат нуклеотидную последовательность с неспаренными
нуклеотидами на 5'-конце и 3'-конце, и одновременно лигирование нуклеотида на 5'-
конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в смысловой
цепи, с нуклеотидом на 3'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными
нуклеотидами в антисмысловой цепи, и наоборот, используя лигазу,

35 где нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце
смысловой цепи и нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами
на 3'-конце антисмысловой цепи связаны друг с другом с образованием петли,
нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 3'-конце смысловой
цепи и нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце
40 антисмысловой цепи связаны друг с другом с образованием петли, и смысловая цепь,
и антисмысловая цепь спарены с образованием стебля.

(5) Способ согласно вышеупомянутому (4), дополнительно включающий
фосфорилирование каждого 5'-конца нуклеотидной последовательности с неспаренными
нуклеотидами в смысловой цепи и нуклеотидной последовательности с неспаренными
45 нуклеотидами в антисмысловой цепи.

(6) Способ согласно вышеупомянутому (4) или (5), в котором последовательности
петли являются одинаковыми или отличаются друг от друга.

(7) Способ согласно любому из вышеупомянутых с (4) до (6), где длина петли

составляет от 2 до 20 нуклеотидов.

(8) Способ согласно любому из вышеупомянутых с (4) до (7), где длина стебля составляет от 19 до 31 нуклеотида.

5 (9) Способ подавления экспрессии гена, кодирующего белок *in vitro*, включающий введение одноцепочечной кольцевой РНК согласно любому из вышеупомянутых с (1) до (3) в выделенные из человека клетки, и ослабление мишени РНК с помощью одноцепочечной кольцевой РНК для продолжительного ингибирования трансляции мишени РНК в белок.

10 (10) Способ подавления экспрессии гена, кодирующего белок, включающий введение одноцепочечной кольцевой РНК согласно любому из вышеупомянутых с (1) до (3) в животных, отличных от человека, растения или их клетки, и ослабление мишени РНК с помощью одноцепочечной кольцевой РНК для продолжительного ингибирования трансляции мишени РНК в белок.

15 (11) Фармацевтическая композиция, содержащая одноцепочечную кольцевую РНК согласно любому из вышеупомянутых с (1) до (3) в качестве активного ингредиента.

Как используют в настоящем документе, термин «одноцепочечная кольцевая РНК» может обозначать РНК в форме гантели. РНК в форме гантели относится к одноцепочечной кольцевой РНК, в которой смысловая цепь и антисмысловая цепь комплементарно спарены с образованием стебля, петли образованы обеими сторонами
20 стебля с помощью нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами, и полная форма одноцепочечной кольцевой РНК представляет собой гантель.

Может быть эффективно получена синтетическая РНК в форме гантели по настоящему изобретению, которая обладает отличной стабильностью, устойчивостью и медленно высвобождающимся свойством.

25 В частности, РНК в форме гантели для использования в способе интерференции РНК может быть получена циклизацией двух цепочек РНК. Так как оба конца закрыты в петлю, у РНК нет конца и поэтому маловероятно, что она будет служить субстратом для ферментов, экзонуклеазы (РНаза) и тому подобное, за исключением определенных ферментов, таких как дайсер в клетках. Таким образом, она является менее
30 восприимчивой к ферментативной деградаци и обладает значительно увеличенной стабильностью в клетке. В результате, отсутствует необходимость в использовании искусственных нуклеиновых кислот для увеличения стабильности.

Кроме того, РНК в форме гантели специфически распознается ферментами *in vivo*, такими как дайсер в клетках, и петлевые участки на обеих сторонах расщеплены для
35 формирования типа двухцепочечной РНК, встречающегося в природе (фигура 1). В результате, она может обладать активностью, эквивалентной активности двухцепочечной РНК, и приводить в действие более устойчивый или медленно высвобождающийся эффект, чем эффект интерференции РНК с помощью традиционных двухцепочечных РНК.

40 РНК в форме гантели по настоящему изобретению также является более стабильной, чем обычные двухцепочечные РНК в сыворотке человека.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Изобретение поясняется фиг. 1-9

45 На фигуре 1 схематически представлен вид РНК в форме гантели по настоящему изобретению.

На фигуре 2 показана структура РНК и изображение электрофореза каждой РНК.

На фигуре 3 показана структура миРНК и РНК в форме гантели.

На фигуре 4 показаны изображения электрофореза РНК в форме гантели и линейных

двухцепочечных РНК, расщепленных дайсером.

На фигуре 5 показан эффект интерференции каждой РНК в форме гантели через 24 часа после трансфекции.

На фигуре 6 показан устойчивый эффект интерференции РНК для РНК в форме гантели.

На фигуре 7 показана стабильность РНК в форме гантели в сыворотке человека.

НАЛУЧШИЙ ВАРИАНТ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Одноцепочечная кольцевая РНК по настоящему изобретению содержит последовательность смысловой цепи, гомологичную нуклеотидной последовательности мишени РНК или ее части, последовательность антисмысловой цепи, которая комплементарна последовательности смысловой цепи и способна спариваться с ней, и последовательности петель, которые не могут образовывать спаривание между цепями.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь спарены с образованием стебля. Длина стебля конкретно не ограничена и может быть определена в зависимости от типа, структуры мишени РНК и тому подобного. Например, стебель состоит из 19-31 пары оснований, предпочтительно от 21 до 25 пар оснований, более предпочтительно от 22 до 24 пар оснований и еще более предпочтительно 23 пары оснований.

Нуклеотидные последовательности с неспаренными нуклеотидами присутствуют на 5'-конце и 3'-конце как смысловой цепи, так и антисмысловой цепи. Нуклеотид на 5'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в смысловой цепи и нуклеотид на 3'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в антисмысловой цепи лигированы вместе с образованием петли. Нуклеотид на 3'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в смысловой цепи и нуклеотид на 5'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в антисмысловой цепи лигированы вместе с образованием петли. Длина петли, предпочтительно, составляет от 2 до 20 оснований, более предпочтительно, от 6 до 12 оснований. Поэтому целая одноцепочечная кольцевая РНК, предпочтительно, состоит из от 42 до 102 оснований.

Если нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце смысловой цепи представлена как А, то нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 3'-конце антисмысловой цепи представлена как В, нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 3'-конце смысловой цепи представлена как С, и нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце антисмысловой цепи представлена как D, например, если длина петли составляет 20 оснований, то А в длину составляет от 1 до 19 оснований, В в длину составляет от 19 до 1 оснований, С в длину составляет от 19 до 1 основания, и D в длину составляет от 1 до 19 оснований. Поэтому нуклеотид на 5'-конце А и нуклеотид на 3'-конце В лигированы вместе с образованием петли из 20 оснований, и нуклеотид на 3'-конце С и нуклеотид на 5'-конце D лигированы вместе с образованием петли из 20 оснований.

Предпочтительно, последовательности, которые не могут спариваться друг с другом, отличались по длине между А и В, и между С и D, например, на 1 основание, 2 основания или 3 основания или, альтернативно, чтобы последовательности были одинаковой длины. Поэтому, например, если длина петли составляет 8 оснований, предпочтительно, чтобы А составляла от 3 до 5 оснований в длину, В составляла от 5 до 3 оснований в длину, С составляла от 5 до 3 оснований в длину, и D составляла от 3 до 5 оснований в длину. Когда длина петли составляет 9 оснований, предпочтительно, чтобы А составляла от 3 до 6 оснований в длину, В составляла от 6 до 3 оснований в длину, С

составляла от 6 до 3 оснований в длину, и D составляла от 3 до 6 оснований в длину. Когда длина петли составляет 10 оснований, предпочтительно, чтобы A составляла от 4 до 6 оснований в длину, B составляла от 6 до 4 оснований в длину, C составляла от 6 до 4 оснований в длину, и D составляла от 4 до 6 оснований в длину.

5 Кроме того, нуклеотидные последовательности петли, образованной с помощью A и B, и петли, образованной с помощью C и D, могут быть одинаковыми или различными.

Одноцепочечные кольцевые РНК по настоящему изобретению можно использовать в способе интерференции РНК.

10 Интерференция РНК также известна как RNAi и представляет собой феномен, когда маленькая молекула РНК, обладающая последовательностью, комплементарной мишени РНК, связывается с мишени РНК, таким образом деградируя мишени РНК или подавляя трансляцию мишени РНК.

Антисмысловая цепь РНК в форме гантели обладает последовательностью, комплементарной мишени РНК (например, мРНК или ее прекурсорной РНК). Кроме 15 того, нуклеотидные последовательности с неспаренными нуклеотидами включают, но ими не ограничиваясь, UUCAAGAGA и UGUGCUGUC (M. Miyagishi et al., Oligonucleotides 2003, Vol. 13: pp. 1-7).

Кроме того, петля в РНК в форме гантели может быть химически модифицирована. Например, стабильность РНК в форме гантели *in vivo* может быть увеличена 20 посредством модификации полиэтиленгликолем, молекулярная масса которого составляет приблизительно от 2000 до 5000. Петля РНК в форме гантели расщепляется ферментом, подобным дайсеру, в клетках, подлежащих удалению. Поэтому полагают, что полиэтиленгликоль обладает небольшим эффектом, если стебель приводит в действие свой эффект интерференции РНК в виде мРНК или мкРНК.

25 С РНК в форме гантели по настоящему изобретению, экспрессия мишени РНК в клетках, в которые была введена РНК в форме гантели, предпочтительно составляет 0,4 или менее через 24 часа после введения РНК в форме гантели в клетки, по сравнению с контрольными клетками (без введенной РНК в форме гантели), в которых уровень экспрессии мишени РНК взят за 1.

30 В соответствии с настоящим изобретением клетки представляют собой эукариотические клетки, предпочтительно клетки животных и клетки растений.

Экспрессия мишени РНК может быть подтверждена, например, трансформацией клеток репортерным геном (например, геном люциферазы, β -галактозидазы, β -глюкуронидазы или зеленого флуоресцентного белка (GFP)), и измерением окраски или 35 флуоресценции белка, полученного из репортерного гена, для проверки уровня ингибирования экспрессии мишени РНК с помощью РНК в форме гантели, где мРНК репортерного гена можно использовать в качестве мишени РНК.

Кроме того, РНК в форме гантели по настоящему изобретению отличается тем, что 70% или более РНК в форме гантели сохраняется без деградации после 8 часов в 40 сыворотке человека. Например, это может быть подтверждено инкубацией РНК в форме гантели в сыворотке человека и измерением молекулярной массы с использованием электрофореза и тому подобное для проверки деградации с течением времени.

Способ получения одноцепочечной кольцевой РНК в форме гантели по настоящему 45 изобретению относится к синтезу смысловой цепи и антисмысловой цепи, содержащих нуклеотидную последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце и 3'-конце, и одновременно лигированию нуклеотида на 5'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в смысловой цепи с нуклеотидом на 3'-конце

нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в антисмысловой цепи, и наоборот, с использованием лигазы.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть сконструированы для подавления функции мишеневого гена, основанного на нуклеотидной последовательности мишеневого гена. Конструкции могут быть подтверждены посредством синтеза множества смысловых и антисмысловых цепей и тестирования каждой на эффективность подавления. Например, может быть использован алгоритм конструирования с использованием конструкции миРНК или подобной (ссылки: J. A. Jaeger et al., *Methods in Enzymology* (1989) 183: 281-306; D. H. Mathews et al., *J. Mol. Biol.* (1999) 288: 911-940). При конструировании предпочтительно, чтобы цепи не подавляли экспрессию генов, отличных от мишеневого гена, генов, обладающих последовательностями, сходными с мишеневым геном (что известно как неспецифический эффект). Длины смысловой и антисмысловой цепей предпочтительно разработаны, например, в диапазоне от 19 до 31 основания, предпочтительно от 21 до 25 оснований, более предпочтительно от 22 до 24 оснований и даже более предпочтительно 23 основания.

Мишеневый ген включает, но ими не ограничивается, ген лейкемии *abl/bcr*, ген VEGF возрастной дегенерации желтого пятна и HCV ген гепатита.

Последовательность, которая впоследствии образует петлю, например вышеупомянутая последовательность UUCAAGAGA, разделена на два фрагмента в случайном положении с образованием нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами (где последовательность состоит из 9 оснований и когда разделена на два фрагмента, как описано выше, разница по длине предпочтительно находится в диапазоне от 1 до 3 оснований). Последовательность сконструирована так, чтобы один фрагмент был лигирован к 3'-концу антисмысловой цепи и другой лигирован к 5'-концу смысловой цепи. Тем же способом другая последовательность сконструирована так, чтобы один фрагмент был лигирован к 3'-концу смысловой цепи, другой лигирован к 5'-концу антисмысловой цепи. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты, обладающие этими двумя сконструированными последовательностями, синтезируются отдельно. При выполнении этого предпочтительно осуществить фосфорилирование 5'-конца с использованием химического фосфорилирующего агента. Кроме того, предпочтительно сконструировать последовательность с образованием петли, длина которой составляет, например, от 2 до 20 оснований, и, предпочтительно, от 6 до 12 оснований.

Существуют различные способы синтеза нуклеиновых кислот, такие как способ транскрипционного синтеза *in vitro*, способы с использованием плазмид или вирусных векторов и способы с использованием ПЦР кассет. Хотя способ синтеза нуклеиновых кислот конкретно не ограничен, способ химического синтеза является предпочтительным с точки зрения высокой чистоты, возможности производить большие количества, безопасности использования *in vivo*, возможности химической модификации и тому подобное. Примеры способа химического синтеза включают, но ими не ограничиваются, способ с Н-фосфонатом и способ с фосфорамидитом. Для этой цели можно использовать коммерчески доступные автоматические синтезаторы нуклеиновых кислот.

Концы нуклеотидных последовательностей с неспаренными нуклеотидами на обоих концах смысловой цепи и антисмысловой цепи лигированы лигазой (например, T4 РНК лигазой или T4 ДНК лигазой) с образованием двух петель одновременно. Условия реакции включают, например, инкубирование в буфере, содержащем полиэтиленгликоль (ПЭГ), БСА и тому подобное в течение 20 часов при низкой температуре.

Синтезированная одноцепочечная кольцевая РНК в форме гантели может быть собрана

и очищена с помощью обычных способов (например, высокоэффективной жидкостной хроматографией и способом с электрофорезом в полиакриламидном геле).

Кроме того, одноцепочечная кольцевая РНК может быть химически модифицирована с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) или тому подобного, когда химическая модификация предпочтительно выполняется в области петли. Для связывания оба конца ПЭГ модифицированы для введения функциональной группы, реагирующей с аминоклассами в основаниях, таких как формильная группа или N-гидроксисукцинимидэфирная группа.

Кроме того, в настоящем документе описывается способ интерференции РНК с использованием РНК в форме гантели, полученной вышеуказанным способом.

Согласно настоящему изобретению одноцепочечная кольцевая РНК по настоящему изобретению может вводиться в клетки и ослаблять мишеневую РНК для продолжительного ингибирования трансляции мишеневой РНК в белок, где клетки человека или не относящегося к человеку животного или клетки растения можно использовать в качестве клеток.

Когда способ интерференции РНК осуществляется *in vitro*, РНК в форме гантели вводят в клетки, например, способом электропорации, способом микроинъекции, способом липофекции или трансфекцией с фосфатом кальция.

Когда способ интерференции РНК осуществляется *in vivo*, сначала образец, содержащий РНК в форме гантели, подвергают диализу, регулировке рН или тому подобное для того, чтобы позволить ему приспособиться к живому организму. Способы введения РНК в форме гантели в организм животного или растения включают, но ими не ограничиваются, местное введение, внутривенное введение и способ с использованием генной пушки. При использовании для человека, использование микроорганизмов и тому подобное не является предпочтительным с точки зрения безопасности.

РНК в форме гантели, введенная в клетки, расщепляется дайсером в клетках для создания двухцепочечной РНК (миРНК), которая обладает эффектом интерференции РНК (фигура 1). Концы миРНК могут быть или тупыми концами или липкими концами. миРНК превращается в отдельную цепь с образованием РНК-нуклеазного комплекса (РНК-индуцированный сайленсинг комплекс (RISC)), который распознает мишеневую мРНК, обладающую последовательностью, комплементарной для миРНК, и деградирует мишеневую мРНК, таким образом подавляя экспрессию соответствующего мишеневого гена.

Одноцепочечную кольцевую РНК по настоящему изобретению можно использовать на любых растениях, животных (например, людях, комнатных животных, млекопитающих, включая домашних животных) и их клетках. Ожидается широкое применение в области медицины и сельского хозяйства. Например, одноцепочечную кольцевую РНК по настоящему изобретению можно использовать для различных целей, включая объяснение функции определенного гена или белка в растениях или животных, или на клеточном уровне у растений и животных, с использованием, например, способа нокаута.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей одноцепочечную кольцевую РНК в качестве активного ингредиента.

Количество одноцепочечной кольцевой РНК, введенной в состав фармацевтической композиции, может быть подобрано в соответствии с типом и целью композиции. Например, количество РНК включает, но ими не ограничивается, 1 % масс., 3 % масс., 5 % масс., 10 % масс., 20 % масс., 30 % масс., 40 % масс., 50 % масс., 60 % масс., 70 % масс., 80 % масс., 90 % масс. или 100 % масс. по отношению к общему количеству

композиции.

Примеры фармацевтической композиции по настоящему изобретению включают жидкие препараты (такие как раствор, суспензия, эмульсия), твердые препараты (такие как лиофилизированные препараты, допускающие восстановление перед использованием), препараты, инкапсулированные в липосомы (предпочтительно, катионные липосомы). Кроме того, предпочтительным путем введения является парентеральное введение, которое включает, например, местное введение с применением препарата прямо в пораженный участок, чрезлегочное введение, чресслизистое введение, такое как назальное введение, и внутривенное введение.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать в себя эксципиенты (солевой раствор, стерилизованная вода, раствор Рингера и тому подобное), буферные вещества, тонические средства, стабилизаторы и тому подобное, в зависимости от составов или лекарственных форм.

Кроме того, дозировка фармацевтической композиции по настоящему изобретению может меняться в зависимости от пола, веса, возраста, тяжести, симптомов пациента или подобного.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению применима, например, при лечении заболеваний, таких как раковые опухоли (например, подавление функций генов или белков, которые специфически экспрессируются в злокачественных клетках).

В дальнейшем настоящее изобретение будет описано более конкретно с помощью следующих примеров. Однако следует понимать, что объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными примерами.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение РНК в форме гантели

Все 5'-фосфорилированные РНК, служащие в качестве сырого материала для РНК в форме гантели, были синтезированы на ДНК синтезаторе (GeneWorld H8-SE) в соответствии со способом с фосфоамином. Защищенные TBDMS (Proligo Corp.) использовали для РНК амидитов, и химический фосфорилирующий реактив (Glen Research Corp.) использовали для 5'-фосфорилирования. Защитные группы снимали обычным способом, с последующей очисткой электрофорезом в полиакриламидном геле. Последовательности синтезированных РНК показаны в SEQ ID NO:1 (смысловая цепь, 28 мономерных звеньев полимера), SEQ ID NO:2 (антисмысловая цепь, 28 мономерных звеньев полимера), SEQ ID NO:3 (56 мономерных звеньев полимера), и на фигуре 2. Кроме того, в последовательности РНК, показанной на фигуре 2, подчеркнутые последовательности представляют собой последовательности, которые образуют область петли РНК в форме гантели.

Впоследствии ферментативную реакцию проводили в смеси из 2 мкМ двухцепочечной РНК, 2,0 единиц/мкл Т4 РНК лигазы, 0,006% БСА, 25% ПЭГ6000, 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT и 1 мМ АТФ в конечном объеме 25 мкл.

Более конкретно, сначала 5'-фосфорилированную двухцепочечную РНК растворили в 12,5 мкл буфера (2 × буфер), содержащего 100 мМ трис-НСl (рН 7,5), 20 мМ MgCl₂, 20 мМ DTT и 2 мМ АТФ, при концентрации 4 мкМ. Раствор нагревали при 65°C в течение 5 минут, и затем медленно охлаждали до комнатной температуры. Впоследствии раствор БСА, раствор ПЭГ6000 и Т4 РНК лигазу (Takara Bio Inc.) добавляли для образования вышеупомянутого состава и реакционного объема. Затем раствор инкубировали при 11°C в течение 20 часов. РНК собирали преципитацией этанолом и анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле.

На каждой дорожке электрофореза в полиакриламидном геле на фигуре 2

присутствуют следующие образцы.

Дорожка 1: смесь смысловой цепи из 28 оснований и антисмысловой цепи из 28 оснований (маркер)

Дорожка 2: РНК из 57 оснований (маркер)

5 Дорожка 3: РНК в форме гантели, образованная из смысловой цепи из 28 оснований и антисмысловой цепи из 28 оснований

Дорожка 4: РНК в форме гантели, образованная из 56 оснований (одноцепочечная)

Дорожка 5: смысловая цепь из 28 оснований, обработанная РНК-лигазой (эталон)

Дорожка 6: антисмысловая цепь из 28 оснований, обработанная РНК-лигазой (эталон)

10 РНК в форме гантели на дорожке 4 изготовили синтезом одинарной цепи, содержащей 56 оснований (SEQ ID NO:3), образующих область стебля и область шпильки, и лигированием первого нуклеотида и последнего нуклеотида T4 лигазой.

Полоса, обведенная в круг на дорожке 3 представляет РНК в форме гантели, изготовленную способом по настоящему изобретению, и выход составил приблизительно 80%. РНК в форме гантели на дорожке 4 имела выход приблизительно 5% или менее.

Пример 2: Проверка длины стебля РНК в форме гантели

РНК, представленные в SEQ ID NO:4-13, были синтезированы с помощью вышеупомянутого ДНК синтезатора. SEQ ID NO:4 и 5 образуют двухцепочечную РНК, которая образует 18 пар оснований (миРНК-1), SEQ ID NO:6 и 7 образуют РНК в форме гантели, длина стебля которой составляет 19 оснований (Db-19), SEQ ID NO:8 и 9 образуют РНК в форме гантели, длина стебля которой составляет 23 основания (Db-23), SEQ ID NO:10 и 11 образуют РНК в форме гантели, длина стебля которой составляет 27 оснований (Db-27), и SEQ ID NO:12 и 13 образуют РНК в форме гантели, длина стебля которой составляет 31 основание (Db-31) (фигура 3).

25 Ферментативную реакцию проводили в составе из 2 мкМ двухцепочечной РНК, 1,0 единицы/мкл Т4 РНК лигазы, 0,006% БСА, 25% ПЭГ6000, 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ DTT и 1 мМ АТФ в реакционном объеме в диапазоне от 1,5 до 2,5 мл.

Более конкретно, 5'-фосфорилированную двухцепочечную РНК растворяли в буфере (2×буфер, половина от объема конечного реакционного раствора), содержащем 100 мМ трис-НСl (рН 7,5), 20 мМ MgCl₂, 20 мМ DTT и 2 мМ АТФ, при концентрации 4 мкМ.

30 Раствор нагревали при 65°C в течение 5 минут и затем медленно охлаждали до комнатной температуры. Впоследствии, раствор БСА, раствор ПЭГ6000 и Т4 РНК лигазу (Takara Bio Inc.) добавляли для образования вышеупомянутого состава и реакционного объема. Затем раствор инкубировали при 11°C в течение 20 часов.

35 РНК собирали преципитацией спиртом из реакционного раствора, и циклические продукты выделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Полосы, содержащие мишени, визуализировали способом ультрафиолетового оттенения, вырезали, дробили на маленькие кусочки и экстрагировали 3 раза в 4 мл буфера для элюирования (0,2 М NaCl, 1 мМ ЭДТА (рН 8,0)). Экстракт обессаливали с использованием картриджа Sep-Pak (элюированного 6-ю мл 50% ацетонитрила в воде), конденсировали с помощью центробежного испарителя и дополнительно подвергали осаждению спиртом в присутствии ацетата аммония. Количество целей определяли посредством измерения УФ-спектров.

45 Две единицы ColdShock-DICER (Takara Bio Inc.) добавляли к 2 мкг каждой из вышеупомянутых РНК в форме гантели в буфере, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 8,5), 150 мМ NaCl и 2,5 мМ MgCl₂ (реакционный объем: 20 мкл), и затем полученный раствор инкубировали при 37°C. После 1, 6 и 18 часов 3 мкл реакционного раствора

забирали в качестве образца. Каждый образец смешивали с 2 мкл 120 мМ раствора ЭДТА для остановки ферментативной реакции. Затем их анализировали посредством нативного электрофореза в полиакриламидном геле (электрофорез в 10% полиакриламидном геле, 1×TBE) (после окрашивания в 1×SYBR Green I, образцы визуализировали и количественно оценивали на BioRad Molecular Imager FX).

На фигуре 4 показан электрофорез в полиакриламидном геле каждой РНК в форме гантели. В качестве контроля перед реакцией гантелеобразования реакцию расщепления с использованием двухцепочечной РНК в качестве субстрата проверяли тем же способом. В результате, реакция расщепления Db-19 была выполнена приблизительно на 5% после 1 часа, и синтез двухцепочечных РНК длиной в 20 оснований был подтвержден. Фрагменты расщепления Db-19 в пределах 20 оснований поддерживали почти тот же уровень концентрации после 6 и 18 часов. В отличие от этого почти 100% контроля, содержащего линейную цепь из 19 пар оснований (лайнер), было расщеплено после 1 часа, и наблюдались двухцепочечные РНК длиной в 20 оснований. Впоследствии двухцепочечные РНК продукта деградировали и исчезли со временем. Для Db-23, приблизительно 8% было расщеплено после 1 часа, и были образованы двухцепочечные РНК длиной в 20 оснований. Было подтверждено, что с увеличением длины стебля, скорость расщепления после 1 часа увеличивается на 10% и 20% в Db-27 и Db-31 соответственно. После 18 часов приблизительно 75% Db-19 остаются без изменений, тогда как Db-31 полностью исчезала. На основании этих результатов заключили, что РНК в форме гантели с более короткой длиной стебля является более устойчивой против ферментов.

Пример 3: эффект интерференции РНК для РНК в форме гантели

Эффект интерференции РНК для вышеуказанной РНК в форме гантели (Db-19, Db-23, Db-27 и Db-31) оценивали с помощью эксперимента по ингибированию экспрессии репортерного гена люциферазы светляка pGL3.

Клетки NIH 3T3 (Riken Cell Bank) культивировали в среде DMEM (GIBCO), содержащей 10% ФТС при 37°C в 5% CO₂, и аликвоту культуры в 100 мкл инокулировали в каждую лунку 96-луночного планшета при концентрации 1,6×10⁴ клеток/лунка. Образец дополнительно инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 39 часов, чтобы получить приблизительно 70% степень смыкания монослоя. Затем клетки котрансфецировали 2 типами плазмидных векторов (pGL3-Control и pRL-TK (для внутреннего стандарта), из Promega Corp.) и каждый тип РНК, с использованием реактива для трансфекции GeneSilencer (Genlantis Inc.), в соответствии с протоколом присоединили к реактиву для трансфекции. Состояние концентраций в момент трансфекции было следующим:

0,2 мкг pGL3-Control/0,02 мкг pRL-TK/25 нМ РНК (конечный объем, мкл)

GeneSilencer	1 мкл
Среда DMEM	25 мкл
Разбавленный раствор миРНК	2,5 мкл
Среда DMEM	15 мкл
РНК (5 пмоль/мкл)	0,5 мкл
pGL3-Control (1 мкг/мкл)	0,2 мкл
pRL-TK (0,1 мкг/мкл)	0,2 мкл
	44,4 мкл

После трансфекции культуру инкубировали при 37°C в 5% CO₂ в течение 4 часов. 100 мкл среды DMEM, содержащей 20% сыворотки, добавляли в каждую лунку. После дополнительного инкубирования при 37°C в течение 20 часов клетки растворяли для

измерения уровня экспрессии люциферазы с использованием Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega Corp.) в соответствии с приложенным протоколом (Условия: количество реактива 30 мкл, время задержки 2 секунды, время считывания 10 секунд. Оборудование: Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter).

Для сравнения, контроль (только буфер) оценивали тем же способом. Интенсивность флуоресценции люциферазы светляка была скорректирована по интенсивности флуоресценции люциферазы *genilla* в качестве внутреннего стандарта. Результаты показаны на фигуре 5. После 24 часов, среди РНК в форме гантели, Db-23 показала самую высокую активность и проявила эффект ингибирования, равный всего лишь 0,24. Исходя из этих результатов, наиболее предпочтительной длиной двойной цепи считают 23 основания.

Пример 4: Устойчивость эффекта интерференции РНК

Сравнивали устойчивость эффекта интерференции РНК для Db-23 и миРНК-1.

Клетки NIH 3T3 культивировали в Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco) с добавкой 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС, Invitro/Gibco) в 5% CO₂-увлажненной камере. За 40 часов до трансфекции при 70% степени смыкания

монослоя клетки рассеяли в 96-луночные планшеты при плотности $1,6 \times 10^4$ клеток на лунку (100 мкл). Котрансфекцию репортерными плазмидами и РНК проводили с использованием GeneSilencer (Gene Therapy systems, Inc.) в соответствии с предписаниями производителя для прилипающих клеточных линий. На лунку использовали 16 нг/мкл или 1,6 нг/мкл pGL3-Control (Promega Corp.), 1,6 нг/мкл pRL-TK (Promega Corp.) и 25 нМ РНК, смешанных с реактивом для трансфекции (100 мкл). После 4 часов инкубации добавили 100 мкл 20% ФТС в DMEM. При длительной инкубации, превышающей 3 дня, среду заменяли по необходимости. Экспрессию люциферазы наблюдали после 24 часов, 72 часов и 120 часов с помощью Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega Corp.) в соответствии с инструкциями, предоставленными с Wallac ARVO SX 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer, Inc.) (фиг. 6). Образец без РНК использовали в качестве контроля.

Db-23 и миРНК-1 показали почти одинаковые уровни активности люциферазы после 24 часов. Однако после 120 часов Db-23 показала более выраженный эффект подавления экспрессии гена. Исходя из этих результатов были показаны как медленно высвобождающийся эффект, так и эффект длительной активации РНК в форме гантели.

Пример 5: Стабильность РНК в форме гантели в сыворотке человека

Сравнивали стабильность Db-23 и миРНК в сыворотке человека.

4 мкл предварительно ренатурированной дцРНК (миРНК-1, 20 мкМ) или РНК в форме гантели (Db-23, 20 мкМ) в буфере для ренатурации (100 мМ ацетата калия, 30 мМ HEPES-КОН (pH 7,4), 2 мМ ацетата магния) смешали с 32 мкл PBS, 4 мкл сыворотки здорового человека (Chemicon International, Inc.), инкубировали при 37°C. Аликвоту (5 мкл) забирали после 0,5, 1, 1,5, 3, 8 и 20 часов. Реакцию анализировали с помощью 15% нативного электрофореза в полиакриламидном геле, окрашенном SYBR Green I, и визуализировали с помощью MolecularImager FX (BioRad Laboratories, Inc.).

В результате до 50% миРНК деградировало после 3 часов, тогда как 80% или более Db-23 все еще сохранялось после 3 часов и 70% или более даже после 8 часов. Поэтому можно ожидать высокую стабильность Db-23 *in vivo*.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

Настоящее изобретение можно использовать в качестве молекулы нуклеиновой кислоты, применяемой к живым организмам, и можно производить молекулу с высоким выходом.

Формула изобретения

1. Способ получения одноцепочечной кольцевой РНК, включающий синтез смысловой цепи и антисмысловой цепи, содержащих нуклеотидную последовательность с
5 неспаренными нуклеотидами на 5'-конце и 3'-конце, и одновременно лигирование нуклеотида на 5'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в смысловой цепи с нуклеотидом на 3'-конце нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в антисмысловой цепи и, наоборот, с использованием лигазы,

10 где нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце смысловой цепи и нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 3'-конце антисмысловой цепи связаны друг с другом с образованием петли, нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 3'-конце смысловой цепи и нуклеотидная последовательность с неспаренными нуклеотидами на 5'-конце
15 антисмысловой цепи связаны друг с другом с образованием петли и смысловая цепь и антисмысловая цепь спарены с образованием стебля,

где длина петли составляет 9 нуклеотидов, а длина стебля составляет от 19 до 31 нуклеотида.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий фосфорилирование каждого 5'-конца
20 нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в смысловой цепи и нуклеотидной последовательности с неспаренными нуклеотидами в антисмысловой цепи.

3. Способ по п.1 или 2, где последовательности петли являются одинаковыми или отличающимися друг от друга.

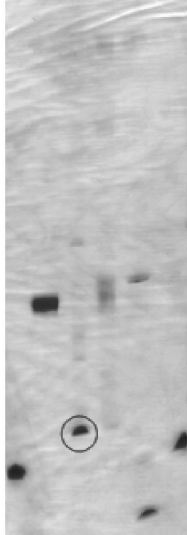
СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> RIKEN
Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.
Hayashi Kasei Co., Ltd.
- <120> Одноцепочечная кольцевая РНК и способ ее получения
- <130> РН-3542РСТ
- <150> JP 2007-125045
<150> 2007-05-09
- <160> 13
- <170> PatentIn version 3.4
- <210> 1
<211> 28
<212> РНК
<213> Искусственная
- <220>
<223> Синтетическая
- <400> 1
гагасиуасг сугагуасиу сгаиусаа 28
- <210> 2
<211> 28
<212> РНК
<213> Искусственная
- <220>
<223> Синтетическая
- <400> 2
гагаусгааг уасисагсги аагуусаа 28
- <210> 3
<211> 56
<212> РНК
<213> Искусственная
- <220>
<223> Синтетическая
- <400> 3
гагасиуасг сугагуасиу сгаиусаага гаусгаагуа сисагсгуаа гуусаа 56
- <210> 4
<211> 21
<212> РНК
<213> Искусственная
- <220>
<223> Синтетическая
- <400> 4
гугсгсигси ггугссааси и 21

<210>	5	
<211>	21	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая	
<400>	5	
	guugcgacca gcagcgсаси u	21
<210>	6	
<211>	28	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая	
<400>	6	
	gagagugcgс ucugugugcgс аасиисаа	28
<210>	7	
<211>	28	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая	
<400>	7	
	gagagugcgс асsagсagcg сасиисаа	28
<210>	8	
<211>	32	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая	
<400>	8	
	gagagugcgс сугсугugugс саасссиис аа	32
<210>	9	
<211>	32	
<212>	РНК	
<213>	Искусственная	
<220>		
<223>	Синтетическая	
<400>	9	
	gagagggug ggcaccagca gсgсасиис аа	32
<210>	10	
<211>	36	
<212>	РНК	

ДОРОЖКА

1 2 3 4 5 6



56 Оснований

5'-p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U C A A
 3'- AACU U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A G A G

28 оснований (верхняя: смысловая цепь, нижняя: антисмысловая цепь)

5'-p-GAG A CUU ACG CUG AGU ACU UCG A U UCAA -3'
 3'- AACU U GAA UGC GAC UCA UGA AGC U A GAG -p- 5'

ФИГ.2

миРНК-1

5' – GUG CGC UGC UGG UGC CAA CUU
UU CAC GCG ACG ACC ACG GUU G –5'

Db-19

G A G A GUG CGC UGC UGG UGC CAA C U U C A
A U CAC GCG ACG ACC ACG GUU G A A
A C U G A G

Db-23

G A G A A GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC U U U C A
A U U CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG A A A
A C U G A G

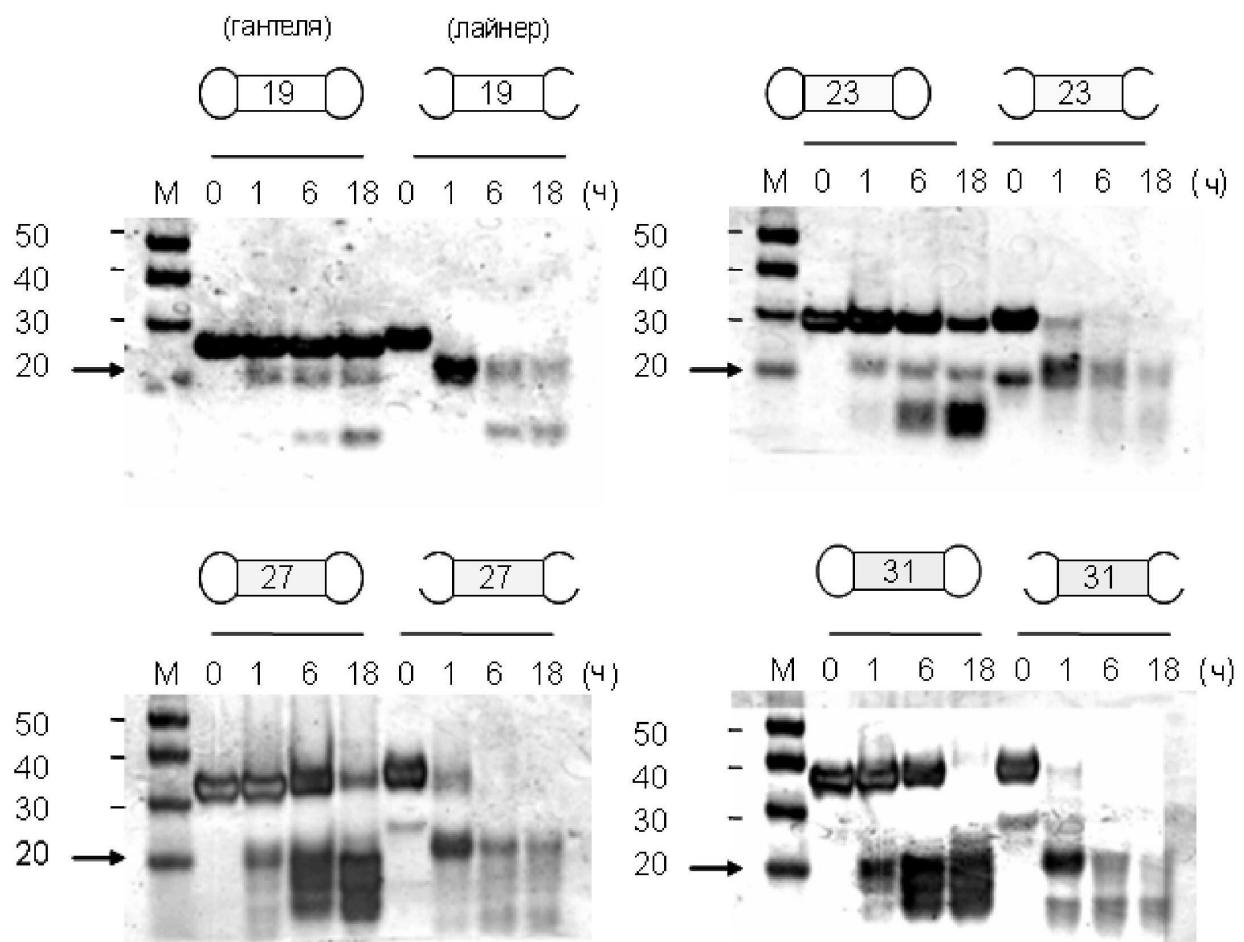
Db-27

G A G A AAA GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC UAU U U C A
A U UUU CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG AUA A A
A C U G A G

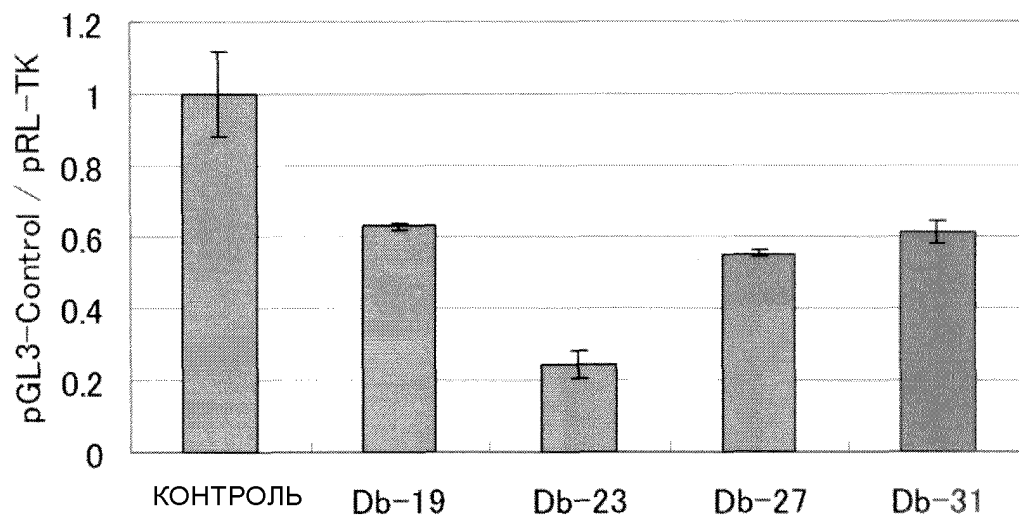
Db-31

G A G A UC AAA GUG CGC UGC UGG UGC CAA CCC UAU UC U U C A
A U AG UUU CAC GCG ACG ACC ACG GUU GGG AUA AG A A
A C U G A G

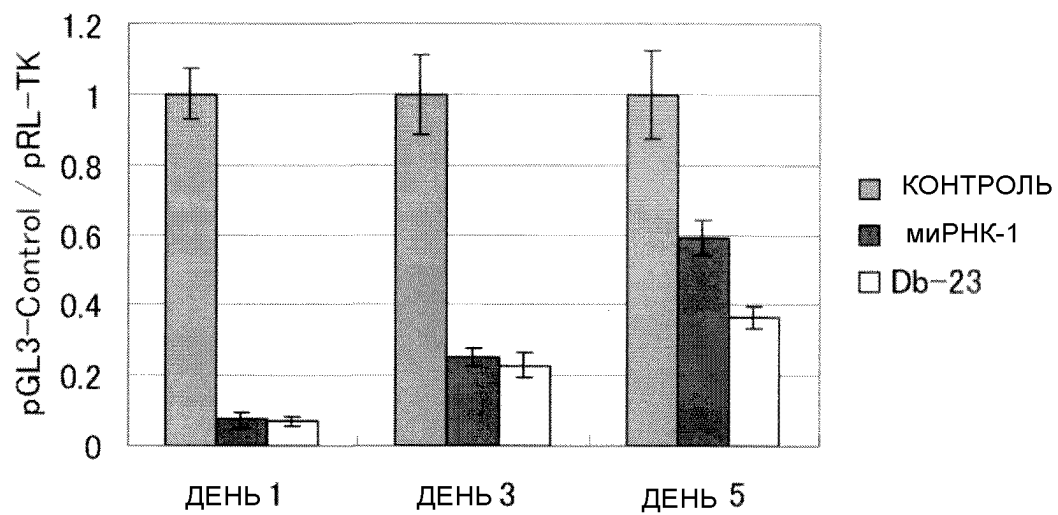
ФИГ.3



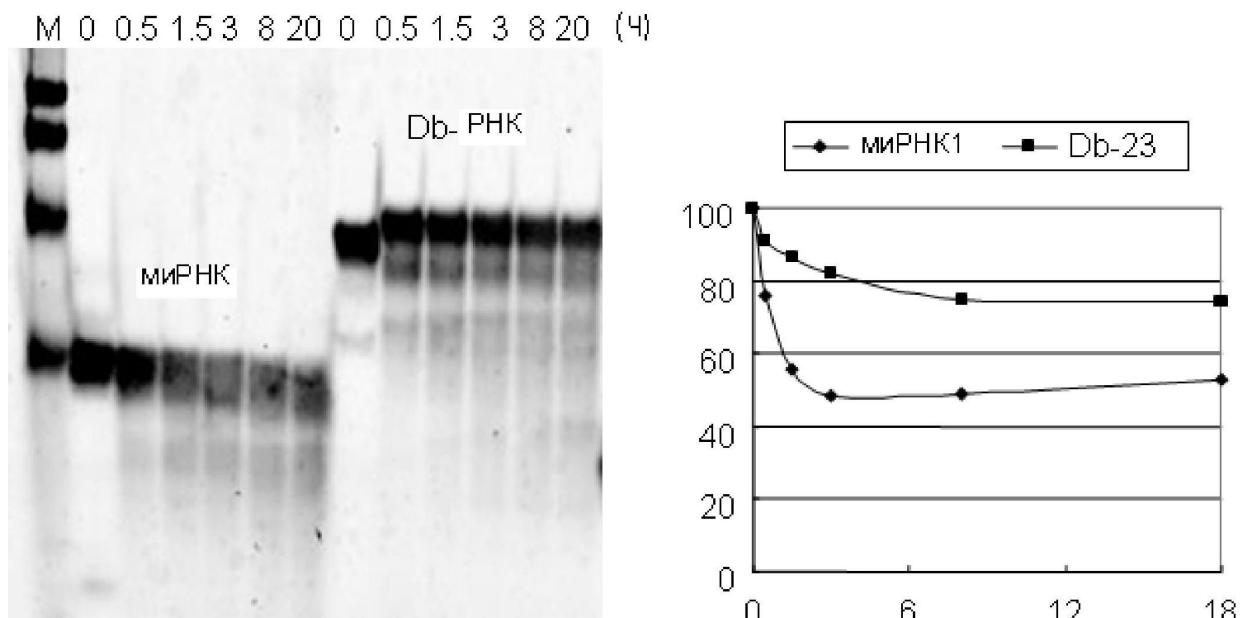
ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

Структура гантелевидных РНК

siPHK-1



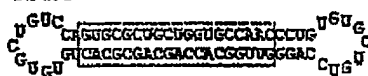
Db-23



Db-23S

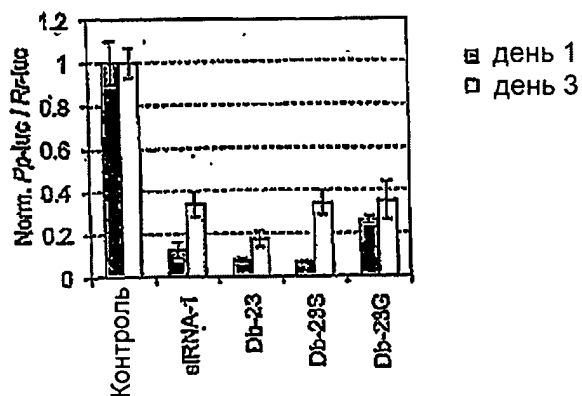


Db-23G



ФИГ.8

Активность РНКi siPHK с различной длиной петли



ФИГ.9