

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045602**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.11</p> <p>(21) Номер заявки
201691215</p> <p>(22) Дата подачи заявки
2014.12.12</p> | <p>(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)</p> |
|---|---|

(54) **КОМПОЗИЦИИ НА ОСНОВЕ iRNA К КОМПОНЕНТУ КОМПЛЕМЕНТА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

- | | |
|--|---|
| <p>(31) 61/915,210</p> <p>(32) 2013.12.12</p> <p>(33) US</p> <p>(43) 2016.11.30</p> <p>(86) PCT/US2014/069951</p> <p>(87) WO 2015/089368 2015.06.18</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)</p> <p>(72) Изобретатель:
Бородовский Анна, Беттенкорт
Брайан (US)</p> <p>(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)</p> | <p>(56) WO-A2-2008036841
US-A1-2007088154
WO-A2-2013074974
NALINI S. BORA ET AL.: "Complement Activation via Alternative Pathway Is Critical in the Development of Laser-Induced Choroidal Neovascularization: Role of Factor B and Factor H", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 177, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 1872-1878, XP007908456, ISSN: 0022-1767, the whole document</p> <p>ANNA BORODOVSKY ET AL.: "Development Of RNAi Therapeutics Targeting The Complement Pathway", BLOOD, vol. 122, no. 21, 15 November 2013 (2013-11-15), - 10 December 2013 (2013-12-10), page 2471, XP055126934, US, ISSN: 0006-4971, the whole document</p> <p>EP-A1-1752536
CHENG LING-LI ET AL.: "[Effect of C5-siRNA silencing receptor C5 on myocardial ischemia injury in rats]", JOURNAL OF SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY - NAN FANG YI KE DA XUEBAO, NANFANG-YIKE-DAXUE <GUANGZHOU>, CN, vol. 30, no. 6, 1 June 2010 (2010-06-01), pages 1486-1488, XP008170341, ISSN: 1673-4254, the whole document</p> <p>WO-A2-2006047673
WO-A2-2013067076</p> |
|--|---|

- (57) Изобретение относится к композициям на основе iRNA, например двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (dsRNA), целенаправленно воздействующим на ген фактора комплемента В (CFB), ген компонента комплемента С3 и ген компонента комплемента С9, и способам применения таких композиций на основе iRNA, например dsRNA, для ингибирования экспрессии CFB, С9 и/или С3 и для лечения субъектов с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, например пароксизмальной ночной гемоглобинурией или атипичным гемолитико-уремическим синдромом.

B1**045602****045602 B1**

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате с кодировкой ASCII и, таким образом, включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия файла с кодировкой ASCII, созданная 11 декабря 2014 г., имеет название 121301-01120_SL.txt, и ее размер составляет 266080 байт.

Родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/915210, поданной 12 декабря 2013 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Уровень техники

Комплемент был впервые обнаружен в 1890-х годах, когда было обнаружено способствование или "комплектное" уничтожение бактерий термостабильными антителами, присутствующими в нормальной сыворотке (Walport, M.J. (2001) *N Engl J Med.* 344:1058). Система комплемента состоит из более чем 30 белков, которые либо присутствуют в виде растворимых белков в крови, или присутствуют в виде белков, ассоциированных с мембраной. Активация комплемента приводит к последовательному каскаду ферментативных реакций, известных как пути активации комплемента, приводящих в результате к образованию сильнодействующих анафилатоксинов C3a и C5a, которые вызывают множество физиологических реакций, варьирующих от хемоаттракции до апоптоза. Первоначально считалось, что комплемент играет важную роль во врожденном иммунитете, в результате чего устанавливается надежная и быстрая реакция против вторжения патогенных микроорганизмов. Тем не менее, в последнее время становится все более очевидным, что комплемент также играет важную роль в адаптивном иммунитете с участием Т- и В-клеток, которые помогают в ликвидации патогенных микроорганизмов (Dunkelberger J.R. и Song W.C. (2010) *Cell Res.* 20:34; Molina H., et al. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:3357), в сохранении иммунологической памяти, предотвращая повторное заражение патогеном, и вовлечена во многочисленные патологические состояния у человека (Qu, H., et al. (2009) *Mol Immunol.* 47:185; Wagner, E. и Frank M.M. (2010) *Nat Rev Drug Discov.* 9:43).

Как известно, активация комплемента происходит посредством трех разных путей: альтернативного, классического и лектинового (фиг. 1), в которых задействованы белки, в основном существующие в виде неактивных проферментов, которые затем последовательно расщепляются и активируются.

Классический путь часто активируется комплексами антитело-антиген или С-реактивным белком (CRP), оба из которых взаимодействуют с компонентом комплемента C1q. Кроме того, классический путь может активироваться фосфатидилсерином, присутствующим в апоптотных тельцах в отсутствие иммунных комплексов.

Лектиновый путь инициируется маннозосвязывающими лектинами (MBL), которые связываются с остатками сложных углеводов на поверхности патогенов. Активация классического пути или лектинового пути ведет к активации (C4b2b) C3-конвертазы.

Альтернативный путь активируется при связывании C3b, который спонтанно образуется при гидролизе C3, на поверхностях мишеней. Этот поверхностно-связанный C3b затем распознается фактором В, образуя комплекс C3bВ. Комплекс C3bВ, в свою очередь, расщепляется фактором D с образованием активной формы C3-конвертазы в AP (C3bBb). Оба типа C3-конвертаз будут расщеплять C3, образуя C3b. C3b затем либо связывается с новым фактором В, усиливая активацию комплемента посредством AP (так называемая альтернативная или амплификационная петля), либо ведет к образованию активной C5-конвертазы (C3bBbC3b или C4bC2bC3b), которая расщепляет C5 и запускает дальнейшие события, которые приводят в результате к образованию мембраноатакующего комплекса (MAC) (C5b-9).

Некорректная активация системы комплемента ответственна за распространение и/или появление патологии при многих различных заболеваниях, в том числе, например, пароксизмальной ночной гемоглобинурии, атипичном гемолитико-уремическом синдроме, ревматоидном артрите, ишемически-реперфузионных повреждениях и нейродегенеративных заболеваниях.

На сегодняшний день только одно терапевтическое средство, которое целенаправленно воздействует на ось C5-C5a, доступно для лечения заболеваний, связанных с компонентом комплемента, - антитело к C5, экулизумаб (Soliris®). Хотя было показано, что экулизумаб является эффективным для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH) и атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), а также в настоящее время оценивается в клинических испытаниях в отношении дополнительных связанных с комплементом заболеваний, терапия экулизумабом требует еженедельных инфузий высоких доз, за которыми следуют поддерживающие инфузии раз в две недели с высокими затратами. Более того, примерно 50% получающих лечение экулизумабом субъектов с PNH имеют низкий уровень гемолиза и требуют остаточных переливаний крови (Hill A., et al. (2010) *Haematologica* 95(4):567-73). Соответственно, в данной области существует потребность в альтернативных терапиях и комплексных терапиях для субъектов с заболеванием, связанным с комплементом.

Краткое описание изобретения

Настоящим изобретением предусматриваются позиции на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК

гена CFB. Ген CFB может находиться в клетке, например клетке субъекта, такого как человек.

Настоящим изобретением также предусматриваются композиции на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена С3. Ген С3 может находиться в клетке, например клетке субъекта, такого как человек.

Кроме того, настоящим изобретением предусматриваются композиции на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена С9. Ген С9 может находиться в клетке, например клетке субъекта, такого как человек.

Настоящим изобретением также предусматриваются способы и комплексные терапии для лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена CFB, С3 и/или С9, например заболевание, связанное с компонентом комплемента, такое как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH) и атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), с помощью композиций на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена CFB, С3 и/или С9 для ингибирования экспрессии гена CFB, С3 и/или С9.

Соответственно, в одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 1-5, 27 и 30, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 12-16, 33 и 36.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в табл. 3 и 4.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи содержат последовательности, выбранные из группы, состоящей из AD-60304, AD-60331, и AD-60344, и любого из средств, приведенных в табл. 3 и 4.

В одном варианте осуществления участок комплементарности состоит из нуклеотидной последовательности с одной из антисмысловых последовательностей из любой из табл. 3 и 4.

В одном варианте осуществления dsRNA содержит смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности с последовательностью смысловой цепи, выбранной из последовательности из любой из табл. 3 и 4, и антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности антисмысловой последовательности, выбранной из последовательностей из любой из табл. 3 и 4.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии компонента комплемента С3 в клетке, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 6-8, 28 и 31, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 17-19, 34 и 37.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии компонента комплемента С3 в клетке, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в табл. 5 и 6.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи содержат последовательности, выбранные из группы, состоящей из AD-60169 и любого из средств, приведенных в табл. 5 и 6.

В одном варианте осуществления участок комплементарности состоит из нуклеотидной последовательности с одной из антисмысловых последовательностей из любой из табл. 5 и 6.

В одном варианте осуществления dsRNA содержит смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности с последовательностью смысловой цепи, выбранной из последовательности из любой из табл. 5 и 6, и антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности антисмысловой последовательности, выбранной из последовательностей из любой из табл. 5 и 6.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии компонента комплемента С9 в клетке, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 9-11, 29 и 32, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей

стей SEQ ID NO: 20-22, 35 и 38.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии компонента комплемента C9 в клетке, где dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, причем антисмысловая цепь содержит участок комплементарности, который содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из антисмысловых последовательностей, приведенных в табл. 7 и 8.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи содержат последовательности, выбранные из группы, состоящей из любого из средств, приведенных в табл. 7 и 8.

В одном варианте осуществления участок комплементарности состоит из нуклеотидной последовательности с одной из антисмысловых последовательностей из любой из табл. 7 и 8.

В одном варианте осуществления dsRNA содержит смысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности с последовательностью смысловой цепи, выбранной из последовательности из любой из табл. 7 и 8, и антисмысловую цепь, состоящую из нуклеотидной последовательности антисмысловой последовательности, выбранной из последовательностей из любой из табл. 7 и 8.

dsRNA может включать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид, например 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий 5'-фосфоротиоатную группу, дезокси-нуклеотид, 3'-концевой дезокситиминовый (dT) нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид, 2'-фтор-модифицированный нуклеотид, 2'-дезоксид-модифицированный нуклеотид, концевой нуклеотид, связанный с холестерилловым производным или группой бисдециламида додекановой кислоты, 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированный нуклеотид, "запертый" нуклеотид, "раскрытый" нуклеотид, конформационно ограниченный нуклеотид, затрудненный этил-нуклеотид, безосновный нуклеотид, 2'-амино-модифицированный нуклеотид, 2'-О-аллил-модифицированный нуклеотид, 2'-С-алкил-модифицированный нуклеотид, 2'-гидроксил-модифицированный нуклеотид, 2'-метоксиэтил-модифицированный нуклеотид, 2'-О-алкил-модифицированный нуклеотид, морфолино-нуклеотид, фосфорамидат, нуклеотид, содержащий не встречающиеся в природе основания, тетрагидропиран-модифицированный нуклеотид, 1,5-ангидрогексит-модифицированный нуклеотид, циклогексенил-модифицированный нуклеотид, нуклеотид, содержащий фосфоротиоатную группу, нуклеотид, содержащий метилфосфонатную группу, нуклеотид, содержащий 5'-фосфат, и нуклеотид, содержащий миметик 5'-фосфата.

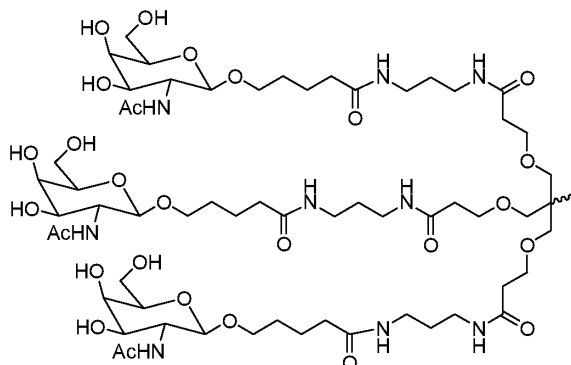
В одном варианте осуществления практически все нуклеотиды смысловой цепи и антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды. В другом варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

Участок комплементарности может составлять по меньшей мере 17 нуклеотидов в длину, как например, 19 нуклеотидов, или не более чем 30 нуклеотидов.

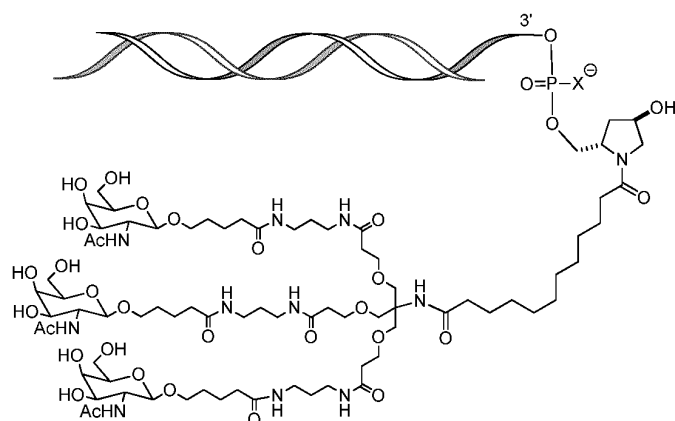
Участок комплементарности может составлять от 19 до 21 нуклеотидов в длину.

По меньшей мере одна цепь dsRNA может включать 3'-липкий конец по меньшей мере из 1 нуклеотида или по меньшей мере из 2 нуклеотидов.

dsRNA может дополнительно включать лиганд. В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи dsRNA. В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc). В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



В одном варианте осуществления dsRNA конъюгирована с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей CFB, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' \text{nr} -\text{Na} -(\text{X X X}) \text{i} -\text{Nb} -\text{Y Y Y} -\text{Nb} -(\text{Z Z Z}) \text{j} -\text{Na}$

$-\text{nq} \text{3}'$

антисмысловая: $3' \text{n}_p' -\text{N}_a' -(\text{X}'\text{X}'\text{X}') \text{k} -\text{N}_b' -\text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' -\text{N}_b' -(\text{Z}'\text{Z}'\text{Z}') \text{l} -\text{N}_a' -$

$\text{n}_q' \text{5}'$ (III)

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

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

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

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

каждый из nr, nr', nq и nq', каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

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

модификации Nb отличаются от модификации Y, а модификации Nb' отличаются от модификации Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 3 (C3) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C3, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' \text{nr} -\text{Na} -(\text{X X X}) \text{i} -\text{Nb} -\text{Y Y Y} -\text{Nb} -(\text{Z Z Z}) \text{j} -\text{Na} -\text{nq} \text{3}'$

антисмысловая: $3' \text{n}_p' -\text{N}_a' -(\text{X}'\text{X}'\text{X}') \text{k} -\text{N}_b' -\text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' -\text{N}_b' -(\text{Z}'\text{Z}'\text{Z}') \text{l} -\text{N}_a' -\text{n}_q' \text{5}'$ (III)

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

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

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

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

каждый из nr, nr', nq и nq', каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

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

модификации Nb отличаются от модификации Y, а модификации Nb' отличаются от модификации Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 9 (C9) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C9, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' \text{nr} - \text{Na} - (\text{X X X})_i - \text{Nb} - \text{Y Y Y} - \text{Nb} - (\text{Z Z Z})_j - \text{Na} - \text{nq} 3'$

антисмысловая: $3' \text{nr}' - \text{Na}' - (\text{X}'\text{X}'\text{X}')_k - \text{Nb}' - \text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' - \text{Nb}' - (\text{Z}'\text{Z}'\text{Z}')_l - \text{Na}' - \text{nq}' 5'$ (III)

где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из r, r', q и q' независимо равняется 0-6;

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

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

каждый из nr, nr', nq и nq', каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

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

модификации Nb отличаются от модификации Y, а модификации Nb' отличаются от модификации Y'; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

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

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

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

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

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

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

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

смысловая: $5' \text{nr} - \text{Na} - \text{Y Y Y} - \text{Na} - \text{nq} 3'$

антисмысловая: $3' \text{nr}' - \text{Na}' - \text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' - \text{Na}' - \text{nq}' 5'$ (IIIa).

В одном варианте осуществления формула (III) представлена формулой (IIIb):

смысловая: $5' \text{nr} - \text{Na} - \text{Y Y Y} - \text{Nb} - \text{Z Z Z} - \text{Na} - \text{nq} 3'$

антисмысловая: $3' \text{nr}' - \text{Na}' - \text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' - \text{Nb}' - \text{Z}'\text{Z}'\text{Z}' - \text{Na}' - \text{nq}' 5'$ (IIIb)

где каждый Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов.

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

смысловая: $5' \text{nr} - \text{Na} - \text{X X X} - \text{Nb} - \text{Y Y Y} - \text{Na} - \text{nq} 3'$

антисмысловая: $3' \text{nr}' - \text{Na}' - \text{X}'\text{X}'\text{X}' - \text{Nb}' - \text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' - \text{Na}' - \text{nq}' 5'$ (IIIc)

где каждый Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов. Согласно еще одному варианту осуществления формула (III) представлена формулой (IIIId)

смысловая: $5' \text{nr} - \text{Na} - \text{X X X} - \text{Nb} - \text{Y Y Y} - \text{Nb} - \text{Z Z Z} - \text{Na} -$

$\text{nq} 3'$

антисмысловая: $3' \text{nr}' - \text{Na}' - \text{X}'\text{X}'\text{X}' - \text{Nb}' - \text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' - \text{Nb}' - \text{Z}'\text{Z}'\text{Z}' - \text{Na}' - \text{nq}' 5'$ (IIIId)

где каждый Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-5 модифицированных нуклеотидов, и каждый Na и Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Двухцепочечный участок может иметь длину 15-30 пар нуклеотидов, 17-23 пар нуклеотидов, 17-25 пар нуклеотидов, 23-27 пар нуклеотидов, 19-21 пар нуклеотидов или 21-23 пар нуклеотидов.

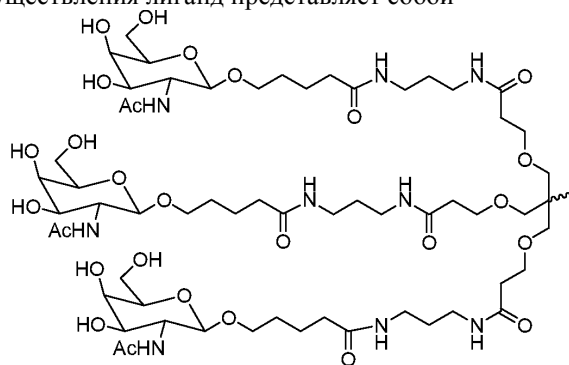
В одном варианте осуществления каждая цепь содержит 15-30 нуклеотидов.

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

В другом варианте осуществления модификациями нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил или 2'-фтор модификации.

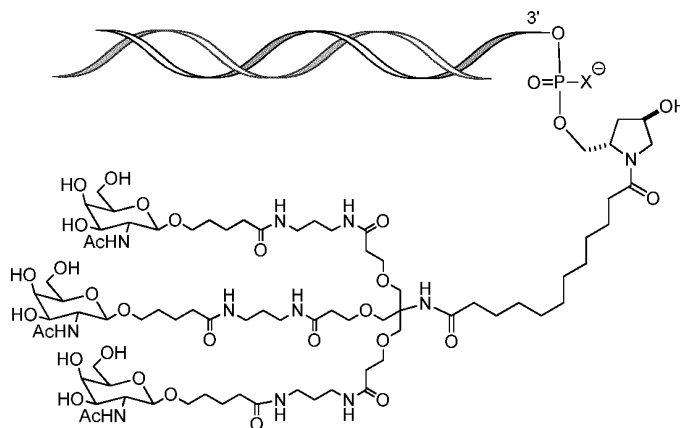
В одном варианте осуществления лигандом является одно или несколько производных GalNAc, присоединенных посредством двухвалентного или трехвалентного разветвленного линкера.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой



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

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



и где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

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

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

В еще одном варианте осуществления фосфотиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи. Согласно одному варианту осуществления нить представляет собой антисмысловую нить. В другом варианте осуществления цепь представляет собой смысловую цепь.

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

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

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

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

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

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

Согласно другому варианту осуществления $q' = 0$, $r = 0$, $q = 0$, а выступающие нуклеотиды r' не ком-

плементарны целевой mRNA.

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

В одном варианте осуществления по меньшей мере один np' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи. В еще одном варианте осуществления все np' связаны с соседними нуклеотидами посредством фосфотиоатных связей.

В одном варианте осуществления средство RNAi выбрано из группы средств RNAi, приведенных в табл. 3 и 4. В другом варианте осуществления средство RNAi выбрано из группы средств RNAi AD-60304, AD-60331 и AD-60344.

В другом варианте осуществления средство RNAi выбрано из группы средств RNAi, приведенных в табл. 5 и 6.

В еще одном варианте осуществления средство RNAi выбрано из группы средств RNAi, приведенных в табл. 7 и 8.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi, включающие средства RNAi, приведенные в любой из табл. 3, 5 и 7.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются композиции, содержащие средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида. Средства способны ингибировать экспрессию фактора комплемента В (CFB) в клетке и включают последовательность, комплементарную смысловой последовательности, выбранной из группы из последовательностей, приведенных в табл. 3, где полинуклеотид составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются композиции, содержащие средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида. Средства способны ингибировать экспрессию компонента комплемента 3 (C3) в клетке и включают последовательность, комплементарную смысловой последовательности, выбранной из группы из последовательностей, приведенных в табл. 5, где полинуклеотид составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются композиции, содержащие средство на основе модифицированного антисмыслового полинуклеотида. Средства способны ингибировать экспрессию компонента комплемента 9 (C9) в клетке и включают последовательность, комплементарную смысловой последовательности, выбранной из группы из последовательностей, приведенных в табл. 7, где полинуклеотид составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке. Средство включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей CFB, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):

смысловая: $5' np -Na -(X X X) i -Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'$

антисмысловая: $3' np' -Na' -(X'X'X')_k -Nb' -Y'Y'Y' -Nb' -(Z'Z'Z')_l -Na' - nq' 5'$ (III)

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

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

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

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации; каждый из pr, pr', pq и pq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

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

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей CFB, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' np -Na -(X X X) i -Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'$

антисмысловая: $3' np' -Na' -(X'X'X')_k -Nb' -Y'Y'Y' -Nb' -(Z'Z'Z')_l -Na' - nq' 5'$ (III)

где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из $pr, pq,$ и pq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

каждый из r, q и q' независимо равняется 0-6; $pr > 0$, и по меньшей мере один pr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства $RNAi$ для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей CFB, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство $RNAi$ представлено формулой (III)

смысловая: $5' pr -Na -(X X X) i -Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z) j -Na - nq 3'$

антисмысловая: $3' np' -Na' -(X'X'X')_k -Nb' -Y'Y'Y' -Nb' -(Z'Z'Z')_l -Na' - nq' 5'$ (III)

где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из $pr, pq,$ и pq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из r, q и q' независимо равняется 0-6; $pr > 0$, и по меньшей мере один pr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый из Na и Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов,

которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

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

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

В еще одном дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства $RNAi$ для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей CFB, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство $RNAi$ представлено формулой (III)

смысловая: $5' pr -Na -(X X X) i -Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z) j -Na - nq 3'$

антисмысловая: $3' np' -Na' -(X'X'X')_k -Nb' -Y'Y'Y' -Nb' -(Z'Z'Z')_l -Na' - nq' 5'$ (III)

где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из $pr, pq,$ и pq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из r, q и q' независимо равняется 0-6; $pr > 0$, и по меньшей мере один pr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый из Na и Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации,

при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различ-

ными способами нуклеотида;

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

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

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

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

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

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей CFB, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa)

где каждый из n_p , n_q , и n_q' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из p , q и q' независимо равняется 0-6; $n_p > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

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

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

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

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 3 (C3) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C3, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

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

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

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

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

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

каждый из N_b и N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации; каждый из n_p , n_p' , n_q и n_q' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

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

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 3 (C3) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный

тарный части мРНК, кодирующей С3, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' \text{nr} - \text{Na} - (\text{X X X})_i - \text{Nb} - \text{Y Y Y} - \text{Nb} - (\text{Z Z Z})_j - \text{Na} - \text{nq} 3'$

антисмысловая: $3' \text{nr}' - \text{Na}' - (\text{X}'\text{X}'\text{X}')_k - \text{Nb}' - \text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' - \text{Nb}' - (\text{Z}'\text{Z}'\text{Z}')_l - \text{Na}' - \text{nq}' 5'$ (III)

где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из nr, nq , и nq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из r, q и q' независимо равняется 0-6; $\text{nr}' > 0$, и по меньшей мере один nr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

модификации Nb отличаются от модификации Y , а модификации Nb' отличаются от модификации Y' ; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 3 (С3) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей С3, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' \text{nr} - \text{Na} - (\text{X X X})_i - \text{Nb} - \text{Y Y Y} - \text{Nb} - (\text{Z Z Z})_j - \text{Na} - \text{nq} 3'$

антисмысловая: $3' \text{nr}' - \text{Na}' - (\text{X}'\text{X}'\text{X}')_k - \text{Nb}' - \text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' - \text{Nb}' - (\text{Z}'\text{Z}'\text{Z}')_l - \text{Na}' - \text{nq}' 5'$ (III)

где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из nr, nq , и nq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из r, q и q' независимо равняется 0-6; $\text{nr}' > 0$, и по меньшей мере один nr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

модификации Nb отличаются от модификации Y , а модификации Nb' отличаются от модификации Y' ; и

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

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 3 (С3) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей С3, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' \text{nr} - \text{Na} - (\text{X X X})_i - \text{Nb} - \text{Y Y Y} - \text{Nb} - (\text{Z Z Z})_j - \text{Na} - \text{nq} 3'$

антисмысловая: $3' \text{nr}' - \text{Na}' - (\text{X}'\text{X}'\text{X}')_k - \text{Nb}' - \text{Y}'\text{Y}'\text{Y}' - \text{Nb}' - (\text{Z}'\text{Z}'\text{Z}')_l - \text{Na}' - \text{nq}' 5'$ (III)

где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из nr, nq , и nq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из r, q и q' независимо равняется 0-6; $\text{nr}' > 0$, и по меньшей мере один nr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый из Na и Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

нации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

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

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

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

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

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

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 3 (C3) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C3, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa)

где каждый из n_p , n_q , и n_q' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из p , q и q' независимо равняется 0-6; $n_p' > 0$, и по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

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

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

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

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 9 (C9) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C9, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

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

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

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

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

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

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

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

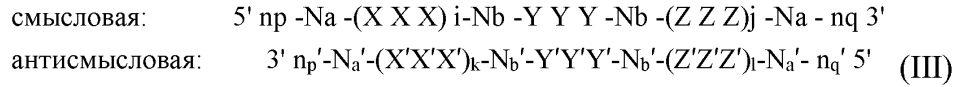
каждая из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов, и где модификации являются 2'-О-метил- или 2'-фтор-модификациями;

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

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для

ингибирования экспрессии компонента комплемента 9 (C9) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C9, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)



где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из nr, nq , и nq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из r, q и q' независимо равняется 0-6; $\text{nr}' > 0$, и по меньшей мере один nr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

каждый из Na и Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 нуклеотидов,

которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации, при этом каждая последовательность содержит по меньшей мере два модифицированных различными способами нуклеотида;

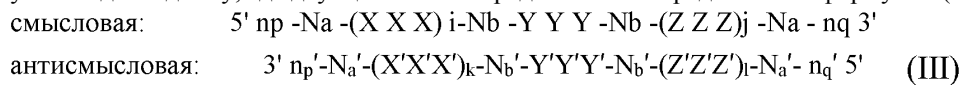
каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

модификации N_b отличаются от модификации Y , а модификации N'_b отличаются от модификации Y' ; и

где смысловая цепь конъюгирована по меньшей мере с одним лигандом.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 9 (C9) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C9, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)



где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из nr, nq , и nq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из r, q и q' независимо равняется 0-6; $\text{nr}' > 0$, и по меньшей мере один nr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

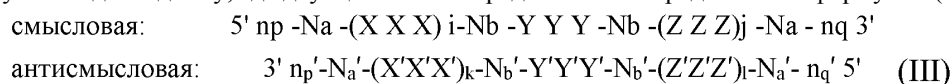
каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

модификации N_b отличаются от модификации Y , а модификации N'_b отличаются от модификации Y' ; и

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

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 9 (C9) в клетке. Средства включают смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C9, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III):



где каждый из i, j, k и l независимо равняется 0 или 1; каждый из nr, nq , и nq' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; ка-

ждый из p , q и q' независимо равняется 0-6; $pr' > 0$, и по меньшей мере один pr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

каждый из Nb и Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 нуклеотидов, которые либо модифицированы, либо не модифицированы, или их комбинации;

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

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

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

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

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента 9 (C9) в клетке. Средство включает смысловую цепь, комплементарную антисмысловой цепи, где антисмысловая цепь содержит участок, комплементарный части мРНК, кодирующей C9, где каждая цепь составляет от приблизительно 14 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину, где двухцепочечное средство RNAi представлено формулой (III)

смысловая: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

антисмысловая: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa)

где каждый из n_p , n_q , и n_q' , каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; каждый из p , q и q' независимо равняется 0-6; $pr' > 0$, и по меньшей мере один pr' связан с соседним нуклеотидом посредством фосфотиоатной связи;

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

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

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

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

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1-5, 27 и 30, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 12-16, 33 и 36, где практически все из нуклеотидов смысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все из нуклеотидов антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфотиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента С3 в клетке, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 6-8, 28 и 31, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 17-19, 34 и 37, где практически все из нуклеотидов

смысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все из нуклеотидов антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии компонента комплемента C9 в клетке, где двухцепочечное средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок, где смысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 9-11, 29 и 32, и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов, отличающихся не более чем 3 нуклеотидами от любой из нуклеотидных последовательностей SEQ ID NO: 20-22, 35 и 38, где практически все из нуклеотидов смысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где смысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце, где практически все из нуклеотидов антисмысловой цепи содержат модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-метил-модификации и 2'-фтор-модификации, где антисмысловая цепь содержит две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, и где смысловая цепь конъюгирована с одним или несколькими производными GalNAc, присоединенными посредством разветвленного двухвалентного или трехвалентного линкера на 3'-конце.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификации.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются клетки, содержащие средства согласно настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются векторы, кодирующие по меньшей мере одну цепь в средствах согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются клетки, содержащие векторы согласно настоящему изобретению.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются фармацевтические композиции для ингибирования экспрессии гена компонента комплемента-фактора В, содержащие средства согласно настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются фармацевтические композиции для ингибирования экспрессии гена компонента комплемента С3, содержащие средства согласно настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются фармацевтические композиции для ингибирования экспрессии гена компонента комплемента С9, содержащие средства согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления средство RNAi вводят в не забуференном растворе.

В одном варианте осуществления не забуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

В одном варианте осуществления средство RNAi вводят в буферном растворе.

В одном варианте осуществления буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат, или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления буферный раствор представляет фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством согласно настоящему изобретению или с фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению и поддержание полученной клетки в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена CFB с ингибированием тем самым экспрессии гена CFB в клетке.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии компонента комплемента 3 (C3) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством согласно настоящему изобретению или с фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению и поддержание полученной клетки в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена C3 с ингибированием тем самым экспрессии гена C3 в клетке.

В еще в одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии компонента комплемента 9 (C9) в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством согласно настоящему изобретению или с фармацевтической композицией согласно настоящему изобретению и поддержание полученной клетки в течение времени, достаточного для разрушения

транскрипта мРНК гена С9 с ингибированием тем самым экспрессии гена С9 в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в субъекте.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления субъект-человек страдает от заболевания, связанного с компонентом комплемента.

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), астмы, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, гломерулонефрита, псориаза, дерматомиозита с буллезным пемфигоидом, атипичного гемолитико-уремического синдрома, гемолитико-уремического синдрома, связанного с Шига-подобным токсином E.coli, миастении гравис, оптиконевромиелита, болезни плотного осадка, С3 невропатии, связанной с возрастом дегенерации желтого пятна, болезни холодových агглютининов, связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами васкулита, реакций отторжения трансплантата, вызванных гуморальным и сосудистым механизмами, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда, сенсibilизированного реципиента трансплантата и сепсиса.

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, представляет собой пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH).

В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

В одном варианте осуществления экспрессия CFB ингибируется по меньшей мере на приблизительно 30%.

В одном варианте осуществления экспрессия С3 ингибируется по меньшей мере на приблизительно 30%.

В одном варианте осуществления экспрессия С9 ингибируется по меньшей мере на приблизительно 30%.

В одном варианте осуществления средство вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В другом варианте осуществления средство вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство вводят подкожно.

В другом варианте осуществления средство вводят внутривенно.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии фактора комплемента В (CFB). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно настоящему изобретению, таким образом осуществляя лечение субъекта.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с заболеванием или нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии фактора комплемента В (CFB). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно настоящему изобретению, таким образом предупреждая по меньшей мере один симптом у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии компонента комплемента С3 (С3). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно настоящему изобретению, таким образом осуществляя лечение субъекта.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с заболеванием или нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии компонента комплемента С3 (С3). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно настоящему изобретению, таким образом предупреждая по меньшей мере один симптом у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии С3.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии компонента комплемента С9 (С9). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно настоящему изобретению, таким образом осуществляя лечение субъекта.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с заболеванием или нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии компонента комплемента С9 (С9). Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно настоящему изобретению, таким образом предупреждая по меньшей мере один симптом у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии С9.

В одном варианте осуществления нарушение представляет собой заболевание, связанное с компонентом комплемента.

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглинурии (PNH), астмы, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, гломерулонефрита, псориаза, дерматомиозита с буллезным пемфигоидом, атипичного гемолитико-уремического синдрома, гемолитико-уремического синдрома, связанного с Шига-подобным токсином E.coli, миастении гравис, оптиконевромиелита, болезни плотного осадка, СЗ невропатии, связанной с возрастом дегенерации желтого пятна, болезни холодových агглютининов, связанного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами васкулита, реакций отторжения трансплантата, вызванных гуморальным и сосудистым механизмами, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда, сенсбилизированного реципиента трансплантата и сепсиса.

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, представляет собой пароксизмальную ночную гемоглинурию (PNH).

В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

В одном варианте осуществления введение средства субъекту приводит к уменьшению гемолиза и/или уменьшению накопления белка CFB.

В одном варианте осуществления введение средства субъекту приводит к уменьшению гемолиза и/или уменьшению накопления белка C3.

В одном варианте осуществления введение средства субъекту приводит к уменьшению гемолиза и/или уменьшению накопления белка C9.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают введение экулизумаба субъекту.

В другом варианте осуществления способы дополнительно включают введение компстатина субъекту.

В одном варианте осуществления средство вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В другом варианте осуществления средство вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

В еще одном варианте осуществления средство вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из 0,5, 1, 1,5, 3, 10 и 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство вводят субъекту раз в неделю.

В другом варианте осуществления средство вводят субъекту два раза в месяц.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают измерение уровней LDH у субъекта.

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно настоящему изобретению, таким образом ингибируя экспрессию CFB у субъекта.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии компонента комплемента C3 (C3) у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно настоящему изобретению, таким образом ингибируя экспрессию C3 у субъекта.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии компонента комплемента C9 (C9) у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства согласно любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, таким образом ингибируя экспрессию C9 у субъекта.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают введение экулизумаба субъекту.

В другом варианте осуществления способы дополнительно включают введение компстатина субъекту.

В одном варианте осуществления средство вводят в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 50 мг/кг.

В другом варианте осуществления средство вводят в дозе от приблизительно 10 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг.

В еще одном варианте осуществления средство вводят в дозе, выбранной из группы, состоящей из 1, 3, 10 и 30 мг/кг.

В одном варианте осуществления средство вводят субъекту раз в неделю.

В другом варианте осуществления средство на основе dsRNA вводят субъекту два раза в месяц.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой схему трех путей комплемента: альтернативного, классического и лектинового.

Фиг. 2 представляет собой график, на котором приведено процентное содержание мРНК фактора комплемента В (CFB), оставшейся у мышей C57BL/6 через 96 ч после одной дозы 1 или 10 мг/кг указанных iRNA.

Фиг. 3 представляет собой график, на котором приведено процентное содержание мРНК фактора комплемента В (CFB), оставшейся у мышей C57BL/6 через 72 ч после одной дозы 1,25, 2,5 или 10 мг/кг AD-60331.

Подробное описание изобретения

Настоящим изобретением предусматриваются композиции на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена компонента комплемента ген, т.е. гена CFB, C3 или C9. Ген может находиться в клетке, например, клетке субъекта, такого как человек.

Настоящим изобретением также предусматриваются способы и комплексные терапии для лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена CFB, C9 и/или C3, например заболевание, связанное с компонентом комплемента, такое как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH) и атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), с помощью композиций на основе iRNA, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) расщепление транскриптов РНК гена CFB, C3 и/или C9.

Настоящим изобретением также предусматриваются способы предупреждения по меньшей мере одного симптома, например гемолиза, у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие ингибирование или снижение экспрессии гена CFB, C9 и/или C3, например заболевание, связанное с компонентом комплемента, такое как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH) и атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

iRNA согласно настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь) с участком, который составляет приблизительно 30 нуклеотидов в длину или менее, например 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотидов, причем данный участок является практически комплементарным по меньшей мере части мРНК транскрипта гена CFB, C3 или C9. Применение этих iRNA обеспечивает возможность целенаправленного расщепления мРНК соответствующего гена (гена CFB, C3 или C9) у млекопитающих. Очень низкие дозировки iRNA согласно настоящему изобретению могут, в частности, специфично и эффективно опосредовать РНК-интерференцию (RNAi), приводя в результате к значительному ингибированию экспрессии соответствующего гена (гена CFB, C3 или C9). С помощью клеточных анализов авторы настоящего изобретения продемонстрировали, что iRNA, целенаправленно воздействующие на гены этих компонентов комплемента, могут опосредовать RNAi, приводя в результате к значительному ингибированию экспрессии гена комплемента (т.е. CFB, C3 или C9). Таким образом, способы и композиции, включающие эти iRNA, являются полезными для лечения субъекта с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, таким как пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH) и атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS).

В следующем подробном описании раскрывается, как получать и применять композиции, содержащие iRNA, для ингибирования экспрессии гена комплемента (т.е. CFB, C3 или C9), а также композиции, применения и способы для лечения субъектов с заболеваниями и нарушениями, на которые будут оказывать благоприятное воздействие ингибирование и/или снижение экспрессии этих генов.

I. Определения.

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

Форму единственного числа используют в данном документе для обозначения одного или нескольких (т.е. по меньшей мере одного) грамматических объектов статьи. В качестве примера, "элемент" означает один элемент или несколько элементов, например, множество элементов.

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

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

Используемое в данном документе выражение "фактор комплемента В", используемое взаимозаменяемо с "CFB", относится к хорошо известным гену и полипептиду, также известному в данной области техники как AHUS, BF, CFAB, BFD, FB, GBG, FB112, В-фактор, пропердин, H2-Bf, богатый глицином бета-гликопротеин, C3 проакселератор, пропердин-фактор 2В, C3 проактиватор, PBF2, богатый глицином бета-гликопротеин, C3/C5-конвертаза, ЕС 3.4.21 и ЕС 3.4.21.473. Выражение "CFB" включает CFB человека, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:189181756; CFB мыши, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номерами доступа GI:218156288 и

GI:218156290; CFB крысы, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:218156284; и CFB шимпанзе, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:57114201. Выражение "CFB" также включает CFB *Macaca fascicularis*, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:544428919 и в учетной записи для гена, ENSMMPUP00000000985 (локус=scaffold3881:47830:53620), на веб-сайте проекта по расшифровке генома *Macaca* (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/index.jsp>). Дополнительные примеры последовательностей мРНК CFB легкодоступны с использованием, например, GenBank, UniProt, OMIM и веб-сайта проекта по расшифровке генома *Macaca*.

Иллюстративные нуклеотидные последовательности CFB также можно найти в SEQ ID NO: 1-5, 27 и 30. SEQ ID NO: 12-16, 33 и 36 представляют собой бессмысловые последовательности SEQ ID NO: 1-5, 27 и 30, соответственно.

Используемое в данном документе выражение "CFB" также относится ко встречающимся в естественных условиях изменениям в последовательности ДНК гена CFB. Неограничивающие примеры изменений последовательности в гене CFB включают 1598A>G в экзоне 12, что приводит в результате к замене лизина на аргинин в аминокислотном остатке 533; 858C>G в экзоне 6, что приводит в результате к замене фенилаланина на лейцин в аминокислотном остатке 286; и 967A>G в экзоне 7, что приводит в результате к замене лизина на аланин в аминокислотном остатке 323 (Tawadrous H. et al. (2010) *Pediatr Nephrol.* 25:947; Goicoechea de Jorge E. et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci. USA* 104:240). Используемое в данном документе выражение "CFB" также относится к однонуклеотидным полиморфизмам в гене CFB. Многочисленные изменения последовательности в гене CFB были идентифицированы и могут быть найдены, например, в dbSNP NCBI и UniProt (см., например, ncbi.nlm.nih.gov/snp).

Используемое в данном документе выражение "компонент комплемента 3", используемое взаимозаменяемо с выражением "С3", относится к хорошо известным гену и полипептиду, также известным в данной области техники как ARMD9, анафилатоксин С3а, ASP, компонент комплемента С3а, С3а, компонент комплемента С3b, С3b, препро-С3, продукт расщепления белка, стимулирующего ацилирование, SPAMD1, С3 комплемента, С3 и PZP-подобный альфа-2-макроглобулиновый домен-содержащий белок 1, компонент комплемента С3 и AHUS5. Выражение "С3" включает С3 человека, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:115298677; С3 мыши, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:126518316; и С3 крысы, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:158138560. Выражение "С3" также включает CFB *Macaca fascicularis*, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:544508182 и в учетной записи для гена, ENSP00000245907 (локус=chr19:6921416:6963034), на веб-сайте проекта по расшифровке генома *Macaca* (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/index.jsp>). Дополнительные примеры последовательностей мРНК С3 легкодоступны с использованием, например, GenBank, UniProt, OMIM и веб-сайта проекта по расшифровке генома *Macaca*.

Иллюстративные нуклеотидные последовательности С3 также можно найти в SEQ ID NO: 6-8, 28 и 31. SEQ ID NO: 17-19, 34 и 37 представляют собой бессмысловые последовательности SEQ ID NO: 6-8, 28 и 31, соответственно.

Используемое в данном документе выражение "С3" также относится ко встречающимся в естественных условиях изменениям в последовательности ДНК гена С3. Многочисленные изменения последовательности в гене С3 были идентифицированы и могут быть найдены, например, в dbSNP NCBI и UniProt (см., например, ncbi.nlm.nih.gov/snp).

Используемое в данном документе выражение "компонент комплемента 9", используемое взаимозаменяемо с выражением "С9", относится к хорошо известным гену и полипептиду. Выражение "С9" включает С9 человека, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:187608340; С9 мыши, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:15375311; и С9 крысы, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:16924005. Выражение "С9" также включает CFB *Macaca fascicularis*, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank под номером доступа GI:544436867 и в учетной записи для гена *isotig05361* (*isogroup03350*; длина=2955; numContigs=1) на веб-сайте проекта по расшифровке генома *Macaca* (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/index.jsp>). Дополнительные примеры последовательностей мРНК С3 легкодоступны с использованием, например, GenBank, UniProt, OMIM и веб-сайта проекта по расшифровке генома *Macaca*.

Иллюстративные нуклеотидные последовательности С9 также можно найти в SEQ ID NO: 9-11, 29 и 32. SEQ ID NO: 20-22, 35 и 38 представляют собой бессмысловые последовательности SEQ ID NO: 9-11, 29 и 32, соответственно.

Используемое в данном документе выражение "С9" также относится ко встречающимся в естест-

венных условиях изменениям в последовательности ДНК гена С9. Многочисленные изменения последовательности в гене С9 были идентифицированы и могут быть найдены, например, в dbSNP NCBI и UniProt (см., например, ncbi.nlm.nih.gov/snp).

При использовании в данном документе "целевая последовательность" относится к непрерывной части нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции гена CFB, С3 или С9, в том числе к мРНК, которая является продуктом процессинга РНК первичного продукта транскрипции. В одном варианте осуществления целевой участок последовательности будет по меньшей мере достаточно длинной для того, чтобы служить в качестве субстрата для iRNA-направленного расщепления в этой части или рядом с этой частью нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной в процессе транскрипции гена CFB, С3 или С9.

Целевая последовательность может составлять приблизительно 9-36 нуклеотидов в длину, например, приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину. Например, целевая последовательность может составлять приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

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

Каждый из "G", "C", "A", "T" и "U", как правило, означает нуклеотид, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания, соответственно. Однако будет понятно, что выражение "рибонуклеотид" или "нуклеотид" также может означать модифицированный нуклеотид, который подробнее описан ниже, или имитирующий нуклеотид заменяющий фрагмент (см., например, табл. 2). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил могут быть замещены другими фрагментами без изменения в значительной степени свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий инозин в качестве основания, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть замещены в нуклеотидных последовательностях dsRNA, описанных в настоящем изобретении, нуклеотидами, содержащими, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любой точке олигонуклеотида могут быть замещены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначного спаривания оснований G-U с целевой мРНК. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, подходят для композиций и способов, описанных в настоящем изобретении.

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

В одном варианте осуществления средство RNAi согласно настоящему изобретению включает одноцепочечную РНК, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, например целевой последовательностью мРНК CFB, С3 или С9, с направлением расщепления целевой РНК. Не вдаваясь в теорию, предполагают, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, разрезается на siRNA эндонуклеазой III типа, известной как дайсер (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, подобный рибонуклеазе III типа фермент, участвует в процессинге dsRNA на короткие интерферирующие РНК длиной 19-23 пары оснований с характерными выступами на 3'-конце в два основания (Bernstein, et al. (2001) *Nature* 409:363). siRNA затем встраиваются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), в котором одна или несколько хеликаз раскручивают дуплекс siRNA, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, et al. (2001) *Cell* 107:309). После связывания с соответствующей целевой мРНК одна или несколько эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень для индукции сайленсинга (Elbashir, et al. (2001) *Genes Dev.* 15:188). Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к одноцепочечной РНК (siRNA), которая образована внутри клетки и способствует образованию RISC-комплекса для осуществления сайленсинга целевого гена, т.е. гена CFB, С3 или С9. Соответственно, выражение "siRNA" также используют в данном документе для обозначения RNAi, описанной выше.

В другом варианте осуществления средство RNAi может быть одноцепочечной siRNA, которую вводят в клетку или организм для ингибирования целевой мРНК. Одноцепочечные средства RNAi связываются с Argonaute 2, обладающим эндонуклеазной активностью в комплексе RISC, который затем от-

щепляет целевую мРНК. Одноцепочечные siRNA, как правило, составляют 15-30 нуклеотидов и химически модифицированы. Строение и испытание одноцепочечных siRNA описаны в патенте США № 8101348 и в Lima et al. (2012) Cell 150: 883-894, полное содержание каждого из которых, таким образом, включено в данный документ при помощи ссылки. Любые бессмысловые нуклеотидные последовательности, описанные в данном документе, можно использовать в качестве одноцепочечной siRNA, которая описана в данном документе или которая химически модифицирована способами, описанными в Lima et al. (2012) Cell 150:883-894.

В другом варианте осуществления "иРНК" для применения в композициях, применениях и способах по настоящему изобретению является двухцепочечной РНК и в данном документе ее называют "двухцепочечным средством RNAi", "молекулой двухцепочечной РНК (dsRNA)", "средством, представляющим собой dsRNA" или "dsRNA". Выражение "dsRNA" относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты с дуплексной структурой, содержащему две антипараллельные и практически комплементарные цепи нуклеиновой кислоты, рассматриваемые как имеющие "смысловую" и "антисмысловую" ориентации по отношению к целевой РНК, т.е. к гену CFB, C3 или C9. В некоторых вариантах настоящего изобретения двухцепочечная РНК (dsRNA) запускает расщепление целевой РНК, например мРНК, посредством механизма посттрансляционного сайленсинга гена, называемого в данном документе РНК-интерференцией или RNAi. В целом, большинство нуклеотидов в каждой цепи молекулы dsRNA представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно описано в данном документе, каждая или обе цепи также могут включать один или несколько нуклеотидов, не относящихся к рибонуклеотидам, например дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, применяемое в данном описании, "средство RNAi" может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; средство RNAi может включать значительные модификации множества нуклеотидов.

Используемое в данном документе выражение "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, имеющему, независимо, модифицированный фрагмент сахара, модифицированную межнуклеотидную связь и/или модифицированное нуклеотидное основание. Таким образом, выражение "модифицированный нуклеотид" охватывает замещения, добавления или удаления, например, функциональной группы или атома, в межнуклеозидных связях, фрагментах сахаров, или нуклеотидных основаниях. Модификации, подходящие для применения в средствах согласно настоящему изобретению включают все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в уровне техники. Любые такие модификации, которые применяются в молекуле типа siRNA, охвачены выражением "средство RNAi" в контексте данного описания и формулы изобретения.

Дуплексный участок может иметь любую длину, которая позволяет специфическое расщепление необходимой целевой РНК посредством пути RISC, и длина может находиться в диапазоне от приблизительно 9 до 36 пар оснований, например, приблизительно 15-30 пар оснований, например приблизительно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований, как например, приблизительно 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут быть различными частями одной большей молекулы РНК или они могут быть отдельными молекулами РНК. В тех случаях, когда две цепи являются частью одной большей молекулы и, следовательно, соединены непрерываемой цепью нуклеотидов от 3'-конца одной цепи до 5'-конца соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, соединяющую цепь РНК, называют "шпилькой петли". Шпилька петли может содержать по меньшей мере один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления шпилька петли может содержать по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 23 или более неспаренный нуклеотидов.

Если две практически комплементарные цепи dsRNA составлены из отдельных молекул РНК, то эти молекулы не должны, но могут быть соединены ковалентной связью. В тех случаях, когда две цепи соединены ковалентно способом, отличным от непрерываемой цепи нуклеотидов от 3'-конца одной цепи до 5'-конца соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, то соединяющую структуру называют "линкером". Цепи РНК могут иметь одинаковое или различное число нуклеотидов. Максимальное количество пар оснований является количеством нуклеотидов в самой короткой цепи dsRNA минус любые выступы, которые присутствуют в дуплексе. Помимо дуплексной структуры средство RNAi может содержать один или несколько нуклеотидных выступов.

Применяемое в данном документе выражение "нуклеотидный выступ" относится по меньшей мере к одному неспаренному нуклеотиду, который выпячивается из дуплексной структуры иРНК, например dsRNA. Например, когда 3'-конец одной цепи dsRNA выходит за пределы 5'-конца другой цепи или vice versa, существует нуклеотидный выступ. dsRNA может содержать выступ по меньшей мере одного нук-

леотида; альтернативно выступ может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять или более нуклеотидов. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезокси-нуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа может находиться на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах, либо антисмысловой, или смысловой цепи dsRNA.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В одном варианте осуществления смысловая цепь dsRNA содержит 1-10 нуклеотидов, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или нуклеотидов, выступающих на 3'-конце и/или 5'-конце. В другом варианте осуществления один или несколько нуклеотидов выступа замещаются нуклеозид-трифосфатом.

"Затупленный конец" или "тупой конец" означают, что на конце двухцепочечного средства RNAi нет неспаренных нуклеотидов, т.е. нет нуклеотидного выступа. Средство RNAi "с тупыми концами" представляет собой dsRNA, которая является двухцепочечной по всей длине, т.е. не имеет нуклеотидного выступа на любом конце молекулы. Средства RNAi по настоящему изобретению включают средства RNAi с нуклеотидными выступами на одном конце (т.е. средства с одним выступом и одним тупым концом) или с нуклеотидными выступами на обоих концах.

Выражение "антисмысловая цепь" или "направляющая цепь" относится к цепи iRNA, например dsRNA, которая включает участок, который является практически комплементарным целевой последовательности, например, мРНК CFB, C3 или C9. Используемое в данном документе выражение "участок комплементарности" относится к участку на антисмысловой цепи, который практически комплементарен последовательности, например, целевой последовательности, например нуклеотидной последовательности CFB, C3 или C9, которая определена в данном документе. В тех случаях, когда участок комплементарности не полностью комплементарен целевой последовательности, несовпадения могут присутствовать во внутренних или концевых участках молекулы. Как правило, наиболее приемлемые несовпадения располагаются в концевых участках, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца иРНК.

Выражение "смысловая цепь" или "пассажирская цепь", применяемое в данном документе, означает цепь иРНК, которая включает участок, который, по сути, комплементарен участку антисмысловой цепи, в том значении, в котором это выражение описано в данном документе.

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

Применяемое в данном документе, и если не указано иное, выражение "комплементарный" при использовании для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности означает способность олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру при определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области. Такие условия, например, могут быть жесткими условиями, где жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C в течение 12-16 ч с последующим отмыванием (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можно применять другие условия, такие как физиологически соответствующие условия, которые могут встречаться в организме. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для анализа комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в iRNA, например, в dsRNA, описанной в данном документе, включают образование пар оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут быть отнесены к "полностью комплементарным" по отношению друг к другу в данном документе. Тем не менее, в случае, когда первую последовательность считают "практически комплементарной" по отношению ко второй последовательности в данном документе, две последовательности могут быть полностью комплементарными, или в них может иметь место ошибочное спаривание одной или нескольких, но, как правило, не более 5, 4, 3 или 2 пар оснований при гибридизации с образованием дуплекса до 30 пар оснований, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее соответствующих их конечному применению, например, ингибированию экспрессии

гена посредством пути RISC. Однако, когда два олигонуклеотида предназначены образовывать при гибридизации один или несколько одноцепочечных выступов, то такие выступы не будут считаться несоответствиями применительно к определению комплементарности. Например, dsRNA, содержащая один олигонуклеотид с длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид с длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, может при этом называться "полностью комплементарной" для целей, описанных в данном документе.

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

Выражения "комплементарный", "полностью комплементарный" и "по сути, комплементарный" в данном документе можно применять по отношению к совпадению оснований между смысловой цепью и антисмысловой цепью dsRNA или между антисмысловой цепью средства, представляющего собой иРНК, и целевой последовательностью, как будет понятно из контекста их применения.

Используемый в данном документе полинуклеотид, который "практически комплементарен по меньшей мере части" матричной РНК (мРНК) относится к полинуклеотиду, который практически комплементарен непрерывной части мРНК, представляющей интерес (например, мРНК, кодирующей CFB, C3 или C9). Например, полинуклеотид является комплементарным по меньшей мере части мРНК CFB, если последовательность практически комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей CFB.

В общем, большинство нуклеотидов каждой цепи являются рибонуклеотидами, но, как описано подробно в данном документе, каждая или обе цепи могут также включать один или несколько нуклеотидов, не являющихся рибонуклеотидами, например дезоксирибонуклеотид и/или модифицированный нуклеотид. Кроме того, "иРНК" может включать рибонуклеотиды с химической модификацией. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в данном документе или известных в области техники. Любые такие модификации, которые используются в молекуле иРНК, охвачены выражением "иРНК" в контексте данных описания и формулы изобретения.

В одном аспекте настоящего изобретения средство для применения в способах и композициях по настоящему изобретению представляет собой одноцепочечную молекулу антисмысловой РНК, которая ингибирует целевую мРНК с помощью механизма ингибирующего действия антисмысловых РНК. Молекула одноцепочечной антисмысловой РНК комплементарна последовательности в целевой мРНК. Одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды могут ингибировать трансляцию стехиометрическом образом при спаривании оснований с мРНК и физически препятствуя механизму трансляции, см. Dias, N. et al. (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Молекула одноцепочечной антисмысловой РНК может составлять от приблизительно 15 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину и иметь последовательность, комплементарную целевой последовательности. Например, молекула одноцепочечной антисмысловой РНК может содержать последовательность, которая представляет собой по меньшей мере приблизительно 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов из любой из антисмысловых последовательностей, описанных в данном документе.

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

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

Применяемый в данном документе "субъект" представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая приматов (таких как человек, примат, отличный от человека, например, обезьяна и шимпанзе), не-приматов (таких как корова, свинья, верблюд, лама, лошадь, коза, кролик, овца, хомяк,

морская свинка, кошка, собака, крыса, мышь, лошадь и кит) или птиц (например, утка или гусь). В варианте осуществления субъект представляет собой человека, такого как человек, получающий лечение или оцениваемый в отношении заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, C3 и/или C9; человек, подверженный риску возникновения заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, C3 и/или C9; человек с заболеванием, нарушением или состоянием, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, C3 и/или C9; и/или человек, получающий лечение от заболевания, нарушения или состояния, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, C3 и/или C9, как описано в данном документе.

Используемое в данном документе выражение "заболевание, связанное с компонентом комплемента" представляет собой заболевание или нарушение, которое вызвано активацией комплемента или связано с ней. Выражение "заболевание, связанное с компонентом комплемента" включает заболевание, нарушение или состояние, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB (т.е. "заболевание, связанное с CFB"), C3 (т.е. "заболевание, связанное с C3") и/или C9 (т.е. "заболевание, связанное с C9"). Такие заболевания, как правило, связаны с воспалением и/или активацией иммунной системы, например, лизисом, опосредованным атакующим мембрану комплексом, анафилаксией и/или гемолизом. Неограничивающие примеры заболеваний, связанных с компонентом комплемента, включают пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), астму, ревматоидный артрит (RA); синдром антифосфолипидных антител; волчаночный нефрит; ишемически-реперфузионное повреждение; типичный или инфекционный гемолитико-уремический синдром (tHUS); болезнь плотного осадка (DDD); оптиконевромиелит (NMO); мультифокальную моторную невропатию (MMN); рассеянный склероз (MS); дегенерацию желтого пятна (например, связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна (AMD)); синдром, включающий гемолиз, повышение активности печеночных ферментов и снижение числа тромбоцитов (HELLP); тромбоцитопеническую тромбогемолитическую пурпuru (TTP); спонтанную потерю плода; пауци-иммунный васкулит; буллезный эпидермолиз; рецидивирующую потерю плода; преэклампсию, черепно-мозговую травму, миастению гравис, болезнь Холодовых агглютининов, дерматомиозит с буллезным пемфигоидом, гемолитико-уремический синдром, связанный с Шига-подобным токсином E.coli, C3 невропатию, васкулит, связанный с антителами к цитоплазме нейтрофилов (например, гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как гранулематоз Вегенера), синдром Черджа-стросса и микроскопический полиангиит), реакции отторжения трансплантата, вызванные гуморальным и сосудистым механизмами, дисфункцию трансплантата, инфаркт миокарда (например, повреждение ткани и ишемию при инфаркте миокарда), аллогенную трансплантацию, сепсис (например, неблагоприятный исход при сепсисе), заболевание коронарной артерии, дерматомиозит, болезнь Грейвса, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, сепсис, связанный с системным воспалительным ответом, септический шок, травму спинного мозга, гломерулонефрит, тиреоидит Хашимото, диабет I типа, псориаз, пузырчатку, аутоиммунную гемолитическую анемию (АША), ИТР, синдром Гудпасчера, болезнь Дегоса, антифосфолипидный синдром (APS), катастрофический APS (CAPS), сердечно-сосудистое нарушение, миокардит, цереброваскулярное нарушение, периферическое (например, скелетно-мышечное) сосудистое нарушение, реноваскулярное нарушение, нарушение брыжеечных/кишечных сосудов, васкулит, нефрит Шенлейна-Геноха, васкулит, связанный с системной красной волчанкой, васкулит, связанный с ревматоидным артритом, васкулит, связанный с иммунными комплексами, болезнь Такаясу, дилатационную кардиомиопатию, диабетическую ангиопатию, болезнь Кавасаки (артериит), венозную газовую эмболию (VGE) и рестеноз после установки стента, вращательную атерэктомия и чрескожную транслуминальную коронарную ангиопластику (PTCA) (см., например, Holers (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316; Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology* 41:147-152; патентная публикация США № 20070172483).

В одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, представляет собой пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH). PNH может быть классической PNH или PNH в условиях синдрома недостаточности другого костного мозга и/или миелодиспластического синдрома (MDS), например, цитопении. В другом варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, представляет собой атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS). В еще одном варианте осуществления заболевание, связанное с компонентом комплемента, представляет собой ревматоидный артрит.

"Терапевтически эффективное количество" при использовании в данном документе подразумевают как включающее количество средства RNAi, которое при введении субъекту с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, является достаточным для осуществления лечения заболевания (например, путем уменьшения, ослабления или поддержания существующего заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). "Терапевтически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства RNAi, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, пути введения средства, заболевания и его тяжести и анамнеза, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей субъекта, который подлежит лечению.

"Профилактически эффективное количество" при использовании в данном документе подразумевают как включающее количество средства на основе iRNA, которое при введении субъекту, имеющему заболевание, связанное с компонентом комплемента, но еще (или на данный момент) не испытывающему или проявляющему симптомы заболевания, и/или субъекту, подверженному риску развития заболевания, связанного с компонентом комплемента, например, субъекту, имеющему пересаженную ткань и/или трансплантат, например, сенсibilизированному или аллогенному реципиенту, субъекту с сепсисом и/или субъекту с инфарктом миокарда является достаточным для предупреждения или ослабления заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Ослабление заболевания включает замедление течения болезни или снижение тяжести заболевания, которое разовьется позже. "Профилактически эффективное количество" может варьировать в зависимости от средства на основе iRNA, пути введения средства, степени риска развития заболевания и анамнеза заболевания, возраста, веса, семейного анамнеза, генетического строения, типов предшествующего или сопутствующего лечения, при наличии такового, и других индивидуальных особенностей пациента, который подлежит лечению.

"Терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" также включает количество средства RNAi, которое обеспечивает некоторый желательный местный или системный эффект при приемлемом соотношении польза/риск, принятом по отношению к любому лечению. Средства на основе iRNA, используемые в способах согласно настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для обеспечения приемлемого соотношения польза/риск, принятого по отношению к такому лечению.

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

II. иРНК по настоящему изобретению.

Настоящим изобретением предусматриваются iRNA, которые ингибируют экспрессию гена компонента комплемента. В одном варианте осуществления средство на основе iRNA включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена CFB в клетке, такой как клетка субъекта, например, млекопитающего, такого как человек с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, которое описано в данном документе, например PNH. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена C3 в клетке, такой как клетка субъекта, например млекопитающего, такого как человек с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, которое описано в данном документе, например PNH. В дополнительном варианте осуществления средство на основе iRNA включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (dsRNA) для ингибирования экспрессии гена C9 в клетке, такой как клетка субъекта, например млекопитающего, такого как человек с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, которое описано в данном документе, например, PNH. dsRNA включает антисмысловую цепь, имеющую участок комплементарности, который комплементарен по меньшей мере части мРНК, образующейся при экспрессии целевого гена, т.е. гена CFB, C3 или C9. Участок комплементарности составляет приблизительно 30 нуклеотидов или менее в длину (например, приблизительно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19 или 18 нуклеотидов или менее в длину). При контакте с клеткой, экспрессирующей целевой ген, iRNA ингибирует экспрессию целевого гена (например, гена CFB, C3 или C9 человека, примата, животного, не относящегося к приматам, или птицы) по меньшей мере на приблизительно 10% при анализе, например, с помощью ПЦР или способа на основе разветвленной ДНК (bDNA), или с помощью способа на основе определения белков, как например, с помощью иммунофлуоресцентного анализа, с использованием, например, методик Вестерн-блоттинга или проточной цитометрии.

dsRNA включает две цепи РНК, которые являются комплементарными и гибридизируются с образованием дуплексной структуры при условиях, в которых dsRNA будет применяться. Одна цепь dsRNA (антисмысловая цепь) включает участок комплементарности, который практически комплементарен и обычно полностью комплементарен целевой последовательности. Целевую последовательность можно получить из последовательности мРНК, образованной в процессе экспрессии гена CFB, C3 или C9. Другая цепь (смысловая цепь) включает участок, который комплементарен антисмысловой цепи таким образом, что две цепи гибридизируются и образуют дуплексную структуру при объединении при подходящих условиях. Как описано в данном документе и как известно в данной области техники, комплементарные последовательности dsRNA также могут содержаться в виде комплементарных себе участков

одной молекулы нуклеиновой кислоты, вместо того, чтобы располагаться на отдельных олигонуклеотидах.

Обычно дуплексная структура имеет длину от 15 до 30 пар оснований, например, имеет длину 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пары оснований. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

Аналогично, участок комплементарности с целевой последовательностью составляет от 15 до 30 нуклеотидов в длину, например имеет длину 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 нуклеотида. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к перечисленным выше диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть настоящего изобретения.

В некоторых вариантах осуществления dsRNA составляет от приблизительно 15 до приблизительно 20 нуклеотидов в длину, или от приблизительно 25 до приблизительно 30 нуклеотидов в длину. В одном варианте осуществления средство RNAi согласно настоящему изобретению представляет собой dsRNA из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с целевой последовательностью РНК, т.е. с целевой последовательностью мРНК CFB, C3 или C9, направляя расщепление целевой РНК. В общем, dsRNA является достаточно длинной, чтобы служить в качестве субстрата для фермента Dicer. Например, как хорошо известно в данной области техники, dsRNA с длиной более, чем приблизительно 21-23 нуклеотидов в длину, могут служить субстратами для Dicer. Как также будет понятно обычному специалисту, участок РНК, представляющий собой цель для отщепления, чаще всего будет частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. Где это уместно, "частью" мРНК-мишени является непрерывная последовательность целевой мРНК достаточной длины, чтобы позволить ей быть субстратом для RNAi-направленного отщепления (т.е., отщепление через путь RISC).

Специалист в данной области техники также поймет, что дуплексный участок представляет собой основную функциональную часть dsRNA, например дуплексный участок приблизительно из 9-36 пар оснований, например, приблизительно 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 или 21-22 пар оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления до того момента, пока участок подвергается обработке в функциональный дуплекс из, например, 15-30 пар оснований, что направляет желаемую РНК для отщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, имеющие дуплексный участок больше, чем 30 пар оснований, представляют собой dsRNA. Таким образом, специалисту в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления miRNA представляют собой dsRNA. В другом варианте осуществления dsRNA представляет собой не встречающуюся в природе miRNA. В другом варианте осуществления средство на основе iRNA, пригодное для целенаправленного воздействия на экспрессию CFB, C3 или C9, не образуется в целевой клетке при расщеплении более крупной dsRNA.

dsRNA, описанная в данном документе, может дополнительно включать один или несколько одноцепочечных выступов нуклеотидов, например, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. dsRNA, имеющие по меньшей мере один нуклеотидный выступ, могут обладать неожиданно высокими ингибирующими свойствами по отношению к их аналогам с тупыми концами. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозид, включая дезокси-нуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может быть на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа может находиться на 5'-конце, 3'-конце или обоих концах, либо антисмысловой, или смысловой цепи dsRNA.

dsRNA можно синтезировать с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, как описывается ниже, например, с применением автоматического синтезатора ДНК, таких как коммерчески доступные у, например, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

Соединения иРНК по настоящему изобретению можно получать с применением двухэтапной процедуры. Во-первых, отдельные цепи молекулы двухцепочечной РНК получают по отдельности. Затем составные цепи отжигают. Отдельные цепи соединения siRNA можно получать с применением синтеза в жидкой фазе или твердофазного органического синтеза, или обоих. Органический синтез имеет преимущество в том, что можно легко получать олигонуклеотидные цепи, содержащие неприродные или модифицированные нуклеотиды. Одноцепочечные олигонуклеотиды по настоящему изобретению можно получать с применением синтеза в жидкой фазе или твердофазного органического синтеза, или обоих.

В одном аспекте dsRNA по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две нуклеотидных последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность.

В одном варианте осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению, целенаправленно воздействующая на CFB, включает смысловую цепь, выбранную из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 3 и 4, и соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи выбрана из группы последовательностей из любой из табл. 3 и 4. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей практически комплементарна последовательности мРНК, образованной при экспрессии гена CFB. В связи с этим, в этом аспекте dsRNA будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая цепь в любой из табл. 3 и 4, а второй олигонуклеотид описывается как соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи в любой из табл. 3 и 4. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся на отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

В одном варианте осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению, целенаправленно воздействующая на C3, включает смысловую цепь, выбранную из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 5 и 6, и соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи выбрана из группы последовательностей из любой из табл. 5 и 6. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей практически комплементарна последовательности мРНК, образованной при экспрессии гена C3. В связи с этим, в этом аспекте dsRNA будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая цепь в любой из табл. 5 и 6, а второй олигонуклеотид описывается как соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи в любой из табл. 5 и 6. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся на отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

В одном варианте осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению, целенаправленно воздействующая на C9, включает смысловую цепь, выбранную из группы последовательностей, приведенных в любой из табл. 7 и 8, и соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи выбрана из группы последовательностей из любой из табл. 7 и 8. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, причем одна из последовательностей практически комплементарна последовательности мРНК, образованной при экспрессии гена C9. В связи с этим, в этом аспекте dsRNA будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая цепь в любой из табл. 7 и 8, а второй олигонуклеотид описывается как соответствующая антисмысловая цепь для смысловой цепи в любой из табл. 7 и 8. В одном варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся на отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления практически комплементарные последовательности dsRNA содержатся в одном олигонуклеотиде.

Будет понятно, что, хотя некоторые из последовательностей в табл. 3-8 описаны как модифицированные и/или конъюгированные последовательности, РНК в iRNA согласно настоящему изобретению, например, dsRNA согласно настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, изложенных в табл. 3-8, которая является немодифицированной, неконъюгированной, и/или модифицированной, и/или конъюгированной иным образом, чем описано в них.

Специалисту в данной области хорошо известно, что dsRNA с дуплексной структурой из приблизительно 20 и 23 пар оснований, например, 21 пара оснований, были расценены как особенно эффективные в отношении индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Тем не менее другие авторы обнаружили, что более короткие или более длинные дуплексные структуры РНК также могут быть эффективными (Chu and Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226). В вышеописанных вариантах осуществления, в соответствии с природой олигонуклеотидных последовательностей, приведенных в любой из табл. 3-8, dsRNA, описанные в данном документе, могут включать по меньшей мере одну цепь длиной минимум 21 нуклеотид. С достаточной вероятностью можно предполагать, что более короткие дуплексы с одной из последовательностей из любой из табл. 3-8, за исключением лишь нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть столь же эффективны в сравнении с dsRNA, описанными выше. Следовательно, в объеме настоящего изобретения предусматриваются dsRNA с последовательностью по меньшей мере из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей из любой из табл. 3-8, и отличающиеся своей способностью ингибировать экспрессию целевого гена не более чем приблизительно на 5, 10, 15, 20, 25 или 30% ингибирования от dsRNA, содержащей полную последовательность.

Кроме того, РНК, приведенные в любой из табл. 3 и 4, идентифицируют сайт(сайты) в транскрипте CFB, которые являются чувствительными к опосредованному RISC расщеплению. Аналогично, РНК, приведенные в любой из табл. 5 и 6, идентифицируют сайт(сайты) в транскрипте C3, которые являются чувствительными к опосредованному RISC расщеплению, и РНК, приведенные в любой из табл. 7 и 8,

идентифицируют сайт(сайты) в транскрипте С9, которые являются чувствительными к опосредованному RISC расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно описаны иРНК, которые нацелены на один из этих сайтов. Применимо к данному документу, говорят, что иРНК нацелена на конкретный сайт транскрипта РНК, если иРНК способствует расщеплению транскрипта в любом месте этого конкретного сайта. Такая iRNA будет, как правило, включать по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов из одной из последовательностей, представленных в любой из табл. 3-8, объединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из участка, смежного с выбранной последовательностью в целевом гене.

В то время как целевая последовательность, как правило, составляет приблизительно 15-30 нуклеотидов в длину, существует большое разнообразие в пригодности конкретных последовательностей в этом диапазоне для направления расщепления любой заданной целевой РНК. Различные пакеты программного обеспечения и принципы, изложенные в данном документе, обеспечивают руководство по идентификации оптимальных целевых последовательностей для любого данного гена-мишени, но также можно принять эмпирический подход, в котором "окно" или "маска" данного размера (в качестве не лимитирующего примера, 21 нуклеотид) буквально или фигурально (в том числе, например, в кремнии), размещены на последовательности целевой РНК для идентификации последовательностей в диапазоне размеров, которые могут служить в качестве целевых последовательностей. Перемещая постепенно "окно" последовательности одного нуклеотида выше или ниже начального положения целевой последовательности, может быть идентифицирована следующая потенциальная целевая последовательность, пока полный набор возможных последовательностей не определен для любого данного целевого выбранного размера. Этот способ в сочетании с систематическим синтезом и тестированием идентифицированных последовательностей (с применением анализов, как описано в данном документе, или как известно в данной области техники) для идентификации тех последовательностей, которые действуют оптимально, может идентифицировать те последовательности РНК, которые при нацеливании со средством, представляющим собой иРНК, опосредуют лучшее ингибирование экспрессии целевого гена. Таким образом, хотя последовательности, идентифицированные, например, в любой из табл. 3-8, представляют собой эффективные целевые последовательности, предполагается, что дополнительной оптимизации эффективности ингибирования можно достичь путем постепенного "перемещения окна" на один нуклеотид выше или ниже относительно заданных последовательностей для идентификации последовательностей с такими же или лучшими характеристиками ингибирования.

Помимо этого, также предполагается, что для любой последовательности, идентифицированной, например, в любой из табл. 3-8, дополнительной оптимизации можно достичь либо путем систематического добавления, либо удаления нуклеотидов с созданием более длинных или более коротких последовательностей и исследования этих последовательностей, полученных путем перемещения окна более длинного или более короткого размера выше или ниже по целевой РНК от данной точки. Опять же, присоединение данного подхода к образованию новых целей у кандидатов с тестированием эффективности иРНК на основе тех целевых последовательностей в анализе ингибирования, известными в данной области техники и/или как описано в данном документе, может привести к дальнейшему повышению эффективности ингибирования. В продолжение, такие оптимизированные последовательности можно корректировать путем, например, введения модифицированных нуклеотидов, как описано в данном документе или как известно в данной области техники, добавлением или изменением выступа или другими модификациями, известными в данной области техники и/или описанных в данном документе, для дальнейшей оптимизации молекулы (например, увеличение стабильности в сыворотке или периода полувыведения из кровотока, увеличение термостабильности, улучшение трансмембранной доставки, нацеливание на конкретное положение или тип клетки, увеличение взаимодействия с ферментами пути сайленсинга, увеличение высвобождения из эндосом) в качестве ингибитора экспрессии.

иРНК, как описано в данном документе, может содержать одно или несколько несовпадений с целевой последовательностью. В одном варианте осуществления иРНК, как описано в данном документе, содержит не более чем 3 несовпадения. Если антисмысловая цепь иРНК содержит несовпадения с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы область несовпадения находилась не в центре участка комплементарности. Если антисмысловая цепь иРНК содержит несовпадения с целевой последовательностью, предпочтительно, чтобы несовпадение было ограничено в пределах последних 5 нуклеотидов от либо 5'-, или 3'-конца участка комплементарности. Например, в случае средства на основе iRNA из 23 нуклеотидов, цепь РНК которого комплементарна участку, например, гена CFB, оно обычно не содержит какого-либо ошибочно спаренного основания в центральных 13 нуклеотидах. Способы, описанные в данном документе, или способы, известные в уровне техники, можно применять для определения того, является ли iRNA, содержащая ошибочно спаренное основание относительно целевой последовательности, эффективной при ингибировании экспрессии целевого гена, например, гена CFB, C3 или C9. Рассмотрение эффективности iRNA с ошибочно спаренными основаниями при ингибировании экспрессии целевого гена является важным, особенно, если известно, что конкретный участок комплементарности в целевом гене имеет полиморфные изменения последовательности в популяции.

III. Модифицированные иРНК по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например, dsRNA, является немодифицированной и не содержит, например, химические модификации и/или конъюгации, известные в данной области техники и описанные в данном документе. В другом варианте осуществления РНК из числа иРНК по настоящему изобретению, например dsRNA, является химически модифицированной для повышения стабильности или других полезных характеристик. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения практически все из нуклеотидов иРНК по настоящему изобретению являются модифицированными. Согласно другим вариантам осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды в iRNA в соответствии с настоящим изобретением являются модифицированными iRNA в соответствии с настоящим изобретением, в которой "практически все нуклеотиды являются модифицированными", является сильно, но не полностью, модифицированной и может включать в себя не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, описанные в настоящем изобретении, могут быть синтезированы и/или модифицированы способами, хорошо известными в данной области техники, такими как те, которые описаны в "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA, который включен, таким образом, в данный документ при помощи ссылки. Модификации включают в себя, например, концевые модификации, например модификации 5'-конца (фосфорилирование, конъюгирование, инвертированные связи) или модификации 3'-конца (конъюгирование, нуклеотиды ДНК, инвертированные связи и т.п.); модификации оснований, например, замещение стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые спариваются с расширенным репертуаром партнеров, удаление оснований (лишенных азотистого основания нуклеотидов) или конъюгированных оснований; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замещение сахара; и/или модификации скелета, в том числе модификацию или замещение фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры соединений, представляющих собой иРНК, применяемые в описанных в данном документе вариантах осуществления, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или межнуклеозидные связи не природного происхождения. РНК, содержащие модифицированные остовы включают, среди прочего, те, которые не содержат атом фосфора в остове. В контексте данного описания и как иногда упоминается в данной области техники, модифицированные РНК, не содержащие атом фосфора в их межнуклеозидном остове, также могут считаться олигонуклеозидами. В некоторых вариантах осуществления модифицированная иРНК будет содержать атом фосфора в ее межнуклеозидном остове.

Остовы модифицированных РНК включают, например, фосфотиоаты, хиральные фосфотиоаты, фосфодитиоаты, фосфотриэфиры, аминоалкилфосфотриэфиры, метиловые и другие алкил фосфонаты, включая 3'-алкилен фосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-амино фосфорамидат и аминоалкилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тионоалкилфосфонаты, тионоалкилфосфотриэфиры и боронофосфаты с нормальными 3'-5'-связями, их 2'-5'-связанные аналоги, а также те, полярность которых инвертируется, где соседние пары нуклеозидных единиц связаны через 3'-5'- с 5'-3'- или 2'-5'- с 5'-2'-. Также включают различные соли, смешанные соли и формы свободной кислоты.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение вышеупомянутых содержащих фосфор связей, включают в себя без ограничения патенты США № 3687808; 4469863; 4476301; 5023243; 5177195; 5188897; 5264423; 5276019; 5278302; 5286717; 5321131; 5399676; 5405939; 5453496; 5455233; 5466677; 5476925; 5519126; 5536821; 5541316; 5550111; 5563253; 5571799; 5587361; 5625050; 6028188; 6124445; 6160109; 6169170; 6172209; 6239265; 6277603; 6326199; 6346614; 6444423; 6531590; 6534639; 6608035; 6683167; 6858715; 6867294; 6878805; 7015315; 7041816; 7273933; 7321029 и патентный документ США RE39464, полное содержание которых включено тем самым в настоящий документ посредством ссылки.

Остовы модифицированной РНК, которые не включают атом фосфора, представляют собой остовы, которые образуются межнуклеозидными связями коротких алкильных или циклоалкильных цепей, смешанными межнуклеозидными связями гетероатомов и алкильных или циклоалкильных цепей, или межнуклеозидными связями одной или нескольких более коротких гетероатомных или гетероциклических цепей. Они включают те, которые имеют морфолино-связи (формируются частично из части нуклеозида, представляющей собой сахар); силоксановые остовы; сульфид, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетиловые и тиоформацетиловые остовы; метилен- формацетиловые и тиоформацетиловые остовы; алкен-содержащие остовы; сульфаматные остовы; метилен-имино и метилен-гидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, включающие смешанные составные части N, O, S и CH₂.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение вышеупомянутых олигонуклеозидов включают в себя без ограничения патенты США № 5034506; 5166315; 5185444; 5214134; 5216141; 5235033; 564562; 5264564; 5405938; 5434257; 5466677; 5470967; 5489677; 5541307; 5561225; 5596086; 5602240; 5608046; 5610289; 5618704; 5623070; 5663312; 5633360; 5677437 и 5677439, полное содержание которых включено тем самым в настоящий документ посредством ссылки.

В других вариантах осуществления рассматриваются подходящие РНК-миметики для применения в

иРНК, в которой и связь сахара, и межнуклеозидная связь, т.е. остов нуклеотидных единиц, заменяются новыми группами. Единицы оснований поддерживают в течение гибридизации с целевым соединением соответствующей нуклеиновой кислоты. Одно из таких олигомерных соединений, РНК-миметик, которое продемонстрировало прекрасные характеристики гибридизации, называют пептидной нуклеиновой кислотой (PNA). В соединениях PNA, остов сахара в РНК замещают амид-содержащим остовом, в частности аминоэтилглициновым остовом. Азотистые основания сохраняют и связывают прямо или косвенно с атомами азота аза-группы амидной части остова. Иллюстративные патенты США, которые описывают получение соединений PNA, включают без ограничения патенты США № 5539082, 5714331, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительные соединения PNA, подходящие для применения в иРНК по настоящему изобретению, описаны, например, в Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, включают РНК с фосфотиоатными остовами и олигонуклеозиды с гетероатомными остовами, и, в частности, $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [известный как метиленовый (метилимино) или остов ММИ], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--H--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$ [где родной фосфодизэфирный остов представлен как $--O--P--O--CH_2--$] из вышеупомянутого патента США № 5489677 и амидные остовы из вышеупомянутого патента США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, описанные в данном документе, имеют структуру морфолино-остова, как в вышеупомянутом патенте США № 5034506.

Модифицированные РНК также могут содержать один или несколько замещенных фрагментов, представляющих собой сахара. иРНК например, dsRNA, описанные в данном документе, могут включать один из следующих заместителей в 2'-положении: OH; F; O-, S- или N-алкил; O-, S- или N-алкенил; O-, S- или N-алкинил; или O-алкил-O-алкил, где алкил, алкенил и алкинил могут быть замещенными или незамещенными C_1-C_{10} алкилом или C_2-C_{10} алкенилом и алкинилом. Иллюстративные подходящие модификации включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m равняется от 1 до приблизительно 10. В других вариантах осуществления dsRNA включают один из следующих заместителей в положении 2': C_1-C_{10} низший алкил, замещенный низший алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил либо O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкарил, аминокламино-, поли алкиламино-, замещенный силил, группа расщепления РНК, "репортерная" группа, интеркалятор, группа для улучшения фармакокинетических свойств иРНК, или группа для улучшения фармакодинамических свойства иРНК, и другие заместители, обладающие подобными свойствами. В некоторых вариантах осуществления модификация включает 2'-метоксиэтокси (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известный как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), т.е. алкокси-алкокси-группу. Другая иллюстративная модификация представляет собой 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е. группа $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, также известная как 2'-DMAOE, как описано в примерах в данном документе ниже, и 2'-диметиламиноэтоксиэтокси (также известная в данной области техники как 2'-O-диметиламиноэтоксиэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂.

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-OCH₃), 2'-аминопропокси (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) и 2'-фтор (2'-F). Похожие модификации можно осуществить в других положениях РНК из числа иРНК, в частности, в 3'-положении сахара на 3'-конце нуклеотида, или в 2'-5'-связанных dsRNA и 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. иРНК также может иметь миметики сахара, такие как фрагменты циклобутила на месте сахара пентофуранозил. Иллюстративные патенты США, которые описывают получение таких структур модифицированного сахара включают без ограничения патенты США № 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633 и 5700920, некоторые из которых принадлежат авторам настоящей заявки. Полное содержание каждой из вышеупомянутых заявок включено в данный документ посредством ссылки.

иРНК также может включать модификации или замещения азотистого основания (часто называемого в данной области техники просто как "основание"). Применяемые в данном документе "немодифицированные" или "природные" азотистые основания включают пуриновые основания аденина (A) и гуанина (G), и пиримидиновые основания тимина (T), цитозина (C) и урацила (U). Модифицированные азотистые основания включают другие синтетические и природные азотистые основания, такие как дезокситимин (dT), 5-метилцитозин (5-Me-C), 5-гидрокси-метилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил и другие алкиловые производные аденина и гуанина, 2-пропил и другие алкиловые производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галоген урацил и цитозин, 5-пропинил урацил и цитозин, 6-азо урацил, цитозин и тимин, 5-урацил(псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген, 8-амино, 8-тиол, 8-тиоалкил, 8-гидроксил анал и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген, в частности 5-бром, 5-трифторметил и другие 5-замещенные соединения урацила и цитозина, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-дезагуанин и 7-дезааденин, и 3-дезагуанин и 3-дезааденин. Дополнительные азотистые основания включают те, которые описаны в патенте США № 3687808, которые описаны в Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; которые описаны в The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering,

pages 858-859, Kroschwitz, J.L., ed. John Wiley & Sons, 1990, которые описаны Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613 и которые описаны Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *dsRNA Research and Applications*, pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993. Некоторые из этих азотистых оснований особенно полезны для увеличения аффинности связывания олигомерных соединений, описанных в настоящем изобретении. Они включают 5-замещенные пиримидины, 6-запиримидины и N-2, N-6 и 0-6 замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин. Замещения 5-метилцитозина продемонстрировали увеличение стабильности дуплекса нуклеиновой кислоты при 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) и являются иллюстративными замещениями оснований, еще более предпочтительно в комбинации с модификацией сахара 2'-О-метоксиэтил.

Иллюстративные патенты США, в которых описывается получение некоторых из вышеупомянутых модифицированных нуклеотидных оснований, а также других модифицированных нуклеотидных оснований, включают в себя без ограничения вышеупомянутые патенты США № 3687808, 4845205; 513030; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672 и 7495088, полное содержание которых включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

РНК iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она включала один или несколько фрагментов бициклических сахаров. "Бициклический сахар" представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное посредством связывания мостиком двух атомов. "Бициклический нуклеозид" ("BNA") представляет собой нуклеозид с фрагментом сахара, содержащим мостик, соединяющий два атома углерода в кольце сахара, таким образом образуя бициклическую кольцевую систему. В определенных вариантах осуществления мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод в кольце сахара. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления средство согласно настоящему изобретению может включать одну или несколько запертых нуклеиновых кислот (LNA). Запнутая нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, содержащий фрагмент модифицированной рибозы, где фрагмент рибозы содержит дополнительный мост, соединяющий 2'-и 4'- атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий фрагмент бициклического сахара, содержащий 4'-CH₂-O-2' мостик. Эта структура эффективно "закрывает" рибозу в 3'-эндо структурной конформации. Добавление замкнутых нуклеиновых кислот в siRNA продемонстрировало повышение стабильности siRNA в сыворотке и снижение эффектов не целевого действия (Elmen, J. et al. (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, O.R. et al. (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. et al. (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Примеры бициклических нуклеозидов для применения в полинуклеотидах согласно настоящему изобретению включают без ограничения нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В определенных вариантах осуществления средства на основе антисмыслового полинуклеотида согласно настоящему изобретению включают один или несколько бициклических нуклеозидов, содержащих 4'-2' мостик. Примеры таких бициклических нуклеозидов с 4'-2' мостиком включают без ограничения 4'-(CH₂)--O-2' (LNA); 4'-(CH₂)--S-2'; 4'-(CH₂)₂--O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)--O-2' (также называемый "затрудненный этил" или "cEt") и 4'-CH(CH₂OCH₃)--O-2' (и их аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)--O-2' (и их аналоги; см. например, патент США № 8278283); 4'-CH₂--N(OCH₃)-2' (и их аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂--O--N(CH₃)-2' (см., например, патентную публикацию США № 2004/0171570); 4'-CH₂--N(R)--O-2', где R представляет собой H, C₁-C₁₂алкил или защитную группу (см., например, патент США № 7427672); 4'-CH₂--C(H)(CH₃)-2' (см., например, Chattopadhyaya et al., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); и 4'-CH₂--C(=CH₂)-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278426). Полное содержание каждого из вышеупомянутых источников тем самым включено в данный документ посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные патенты США и патентные публикации США, в которых описывается получение нуклеотидов запертых нуклеиновых кислот, включают без ограничения следующие: патенты США № 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; US 2008/0039618 и US 2009/0012281, полное содержание каждого из которых включено в данный документ с помощью ссылки.

Можно получить любой из вышеизложенных бициклических нуклеозидов, имеющих одну или несколько стереохимических конфигураций сахаров, в том числе, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНК iRNA также может быть модифицирована таким образом, чтобы она включала один или несколько затрудненных этил-нуклеотидов. При использовании в данном документе "затрудненный этил-нуклеотид" или "cEt" представляет собой запертую нуклеиновую кислоту, содержащую фрагмент бициклического сахара, содержащий 4'-CH(CH₃)-O-2' мостик. В одном варианте осуществления затрудненный этил-нуклеотид находится в S-конформации, называемой в данном документе "S-cEt".

iRNA согласно настоящему изобретению может также включать один или несколько "конформационно ограниченных нуклеотидов" ("CRN"). CRN представляют собой нуклеотидные аналоги с линкером,

соединяющим С2'- и С4'-углероды рибозы или С3- и С5'-углероды рибозы. CRN запирает рибозное кольцо в стабильной конформации и повышает аффинность к мРНК при гибридизации. Линкер имеет достаточную длину для помещения кислорода в оптимальное положение для стабильности и аффинности, что приводит в результате к меньшему изгибанию рибозного кольца.

Иллюстративные публикации, в которых описывается получение определенных из вышеуказанных CRN, включают без ограничения патентную публикацию США 2013/0190383; и РСТ публикацию WO 2013/036868, полное содержание каждого из которых включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

Один или несколько из нуклеотидов iRNA согласно настоящему изобретению также могут включать гидроксиметил-замещенный нуклеотид. "Гидроксиметил-замещенный нуклеотид" представляет собой ациклический 2'- 3'-секо-нуклеотид, также называется модификацией "раскрытой нуклеиновой кислотой" ("UNA").

Иллюстративные публикации США, в которых описывается получение UNA, включают без ограничения патент США № 8314227; и патентные публикации США № 2013/0096289; 2013/0011922 и 2011/0313020, полное содержание каждой из которых включено тем самым в настоящий документ посредством ссылки. Потенциальные стабилизирующие модификации на концах молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-ННАс), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННАс), тимидин-2'-О-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докосаноил-уридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и др. Раскрытие этой модификации можно найти в публикации РСТ № WO 2011/005861.

А. Модифицированные иРНК, содержащие мотивы, по настоящему изобретению.

В некоторых аспектах настоящего изобретения двухцепочечные средства RNAi согласно настоящему изобретению включают средства с химическими модификациями, которые раскрыты, например, в предварительной заявке на патент США № 61/561710, поданной 18 ноября 2011 года, или в документе РСТ/US2012/065691, полное содержание каждой из которых включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

Как показано в данном документе и в предварительной заявке № 61/561710 или в РСТ/US2012/065691, превосходные результаты могут быть получены путем введения одного или нескольких мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую цепь и/или антисмысловую цепь средства RNAi, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловая нить средства RNAi могут быть полностью модифицированы иным способом. Введение таких мотивов нарушает паттерн модификаций, если он имеется, смысловой и/или антисмысловой нити. Средство RNAi, к примеру смысловая нить, может быть необязательно конъюгировано с лигандом, представляющим собой производное GalNAc. Полученные в результате средства RNAi характеризуются превосходной активностью в отношении сайленсинга генов.

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

Соответственно, настоящее изобретение предусматривает двухцепочечные средства RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена (т.е. гена CFB, C3 или C9) *in vivo*. Средство RNAi содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь средства RNAi может варьироваться в длину от 12 до 30 нуклеотидов. Например, каждая цепь может составлять от 14 до 30 нуклеотидов в длину, от 17 до 30 нуклеотидов в длину, от 25 до 30 нуклеотидов в длину, от 27 до 30 нуклеотидов в длину, от 17 до 23 нуклеотидов в длину, от 17 до 21 нуклеотида в длину, от 17 до 19 нуклеотидов в длину, от 19 до 25 нуклеотидов в длину, от 19 до 23 нуклеотидов в длину, от 19 до 21 нуклеотида в длину, от 21 до 25 нуклеотидов в длину или от 21 до 23 нуклеотидов в длину.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь, как правило, образуют двухцепочечный РНК-дуплекс ("dsRNA"), также называемый в данном документе как "средство RNAi." Дуплексный участок средства для RNAi может составлять 12-30 пар нуклеотидов в длину. Например, дуплексный участок может составлять 14-30 пар нуклеотидов в длину, 17-30 пар нуклеотидов в длину, 27-30 пар нуклеотидов в длину, 17-23 пары нуклеотидов в длину, 17-21 пара нуклеотидов в длину, 17-19 пар нуклеотидов в длину, 19-25 пар нуклеотидов в длину, 19-23 пары нуклеотидов в длину, 19-21 пара нуклеотидов в длину, 21-25 пар нуклеотидов в длину или 21-23 пары нуклеотидов в длину. В другом примере дуплексный участок выбран из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления средство RNAi может содержать один или несколько выступающих участков и/или блокирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах одной или обеих цепей. Выступ может составлять 1-6 нуклеотидов в длину, например 2-6 нуклеотидов в длину, 1-5 нуклеотидов в длину, 2-5 нуклеотидов в длину, 1-4 нуклеотида в длину, 2-4 нуклеотида в длину, 1-3 нуклеотида в

длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. Выступы могут быть результатом того, что одна нить длиннее другой, или того, что две нити одинаковой длины расположены в шахматном порядке. Выступ может образовывать несовпадение с целевой мРНК или он может быть комплементарным генным последовательностям, с которыми происходит целевое взаимодействие, или может иметь другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием "шпильки" или при помощи других линкеров, не являющихся основаниями.

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления средство для RNAi содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов, где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 9, 10, 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в положениях 11, 12, 13 от 5'-конца, где один конец средства RNAi тупой, в то время как другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Предпочтительно, выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи. В тех случаях, когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, между концевыми тремя нуклеотидами могут быть две фосфотиоатные межнуклеотидные связи, при этом два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления средство RNAi дополнительно содержит две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами как на 5'-конце смысловой цепи, так и на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления каждый нуклеотид в смысловой цепи и антисмысловой цепи средства RNAi, в том числе нуклеотиды, которые являются частью мотивов, являются модифицированными нуклеотидами. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-O-метилом или 3'-фтором, например при чередующемся мотиве. Необязательно средство для RNAi дополнительно содержит лиганд (предпочтительно GalNAC₃).

В одном варианте осуществления средство RNAi содержит смысловую и антисмысловую цепь, где

смысловая цепь составляет 25-30 нуклеотидных остатков в длину, в которой, начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), позиции с 1 до 23 первой цепи содержат по меньшей мере 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь составляет 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная с 3'-концевого нуклеотида содержит по меньшей мере 8 рибонуклеотидов в позициях, спаренных с позициями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где по меньшей мере 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи представляет собой неспаренный со смысловой цепью и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотида являются неспаренными со смысловой цепью, тем самым образуя 3'-одноцепочечный выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит от 10-30 последовательных нуклеотидов, неспаренных со смысловой цепью, тем самым образуя 5'-одноцепочечный выступ из 10-30 нуклеотидов; где по меньшей мере 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи являются спаренными основаниями с нуклеотидами антисмысловой цепи, при этом смысловая и антисмысловая цепи выровнены для максимальной комплементарности, тем самым образуя практически дуплексный участок между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь достаточно комплементарна целевой РНК на протяжении по меньшей мере 19 рибонуклеотидов антисмысловой цепи в длину для уменьшения экспрессии целевого гена при введении двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где смысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где по меньшей мере один из мотивов происходит в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит по меньшей мере один мотив из трех 2'-O-метил-модификаций трех последовательных нуклеотидов в сайте расщепления или рядом с ним.

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления смысловая цепь средства RNAi может содержать несколько мотивов из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Первый мотив может находиться в сайте расщепления цепи или рядом с ним, а другие мотивы могут быть фланкирующей модификацией. Выражение "фланкирующая модификация" в данном документе означает мотив, встречающийся в другой части цепи, который отделен от мотива в сайте расщепления той же цепи или рядом с ним. Фланкирующая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена по меньшей мере одним или несколькими нуклеотидами. В тех случаях, когда мотивы непосредственно прилегают друг к другу,

тогда химическая структура мотивов отличается друг от друга, а когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, тогда химические структуры могут быть одинаковыми или отличными. Могут присутствовать две или более фланкирующие модификации. Например, когда присутствует две фланкирующие модификации, то каждая фланкирующая модификация может находиться на одном конце по отношению к первому мотиву, который находится в сайте расщепления или рядом с ним или с обеих сторон ведущего мотива.

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

В одном варианте осуществления фланкирующая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи средства RNAi обычно не включает первый один или первые два концевых нуклеотида на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах цепи.

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

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

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

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

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

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

В одном варианте осуществления, каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-O-метилом, 2'-O-аллилом, 2'-C-аллилом, 2'-дезоксидезокси, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Цепи могут содержать несколько мо-

дификаций. В одном варианте осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.

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

В одном варианте осуществления Na и/или Nb имеет модификации чередующегося паттерна. Выражение "чередующийся мотив", применяемое в данном документе, означает мотив с одной или несколькими модификациями, при этом каждая модификация встречается у чередующихся нуклеотидов одной цепи. Выражение "чередующийся нуклеотид" может означать один на каждые два нуклеотида, или один на каждые три нуклеотида, или сходный паттерн. Например, если каждый из A, B и C представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой "АВАВА-ВАВАВАВ...", "ААВВААВВААВВ...", "ААВААВААВААВ...", "АААВАААВАААВ...", "АААВВВАА-АВВВ..." или "АВСАВСАВСАВС..." и т.д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый из A, B, C, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся паттерн, т.е. модификации каждого второго нуклеотида, может быть одинаковым, но каждая из смысловой цепи или антисмысловой цепи может быть выбрана из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, как, например, "АВАВАВ...", "АСАСАС...", "ВДВДВД..." или "СДСДСД..." и т.д.

В одном варианте осуществления средство RNAi по настоящему изобретению содержит паттерн модификаций для чередующегося мотива смысловой цепи, сдвинутый относительно паттерна модификации для чередующегося мотива антисмысловой цепи. Сдвиг может быть таким, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует модифицированной другим способом группе нуклеотидов антисмысловой цепи и *vice versa*. Например, при спаривании смысловой цепи с антисмысловой цепью в дуплекс dsRNA чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с "АВАВАВ" от 5'-3'-концу цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с "ВАВАВА" от 5'-3'-концу цепи в дуплексном участке. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с "ААВВААВВ" от 5'-3'-концу цепи, а чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с "ВВААВВАА" от 5'-3'-концу цепи в дуплексном участке, так что между смысловой цепью и антисмысловой цепью присутствует полный или частичный сдвиг паттернов модификаций.

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

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

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

Средство RNAi может дополнительно содержать по меньшей мере одну фосфотиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может встречаться у любого нуклеотида смысловой цепи, или антисмысловой цепи, или обеих цепей в любом положении в цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может встречаться у каждого нуклеотида смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может встречаться в чередующемся паттерне в смысловой цепи и/или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь могут содержать обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловой цепи может быть одинаковым или отличным от антисмысловой цепи, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи смысловой цепи может характеризоваться сдвигом относительно чередующегося паттерна модификации межнуклеотидной связи антисмысловой цепи. В одном

варианте осуществления двухцепочечное средство RNAi содержит 6-8 фосфотиоатных межнуклеотидных связей. В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит две фосфотиоатных межнуклеотидных связи на 5'-конце и две фосфотиоатных межнуклеотидных связи на 3'-конце, и смысловая цепь содержит по меньшей мере две фосфотиоатных межнуклеотидных связи либо на 5'-конце, или 3'-конце.

В одном варианте осуществления RNAi имеет модификацию фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающем участке. Например, выступающий участок может содержать два нуклеотида с фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связью между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть выполнены для соединения выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в дуплексном участке. Например, по меньшей мере 2, 3, 4 или все выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфотиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи и, необязательно, могут присутствовать дополнительные фосфотиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, соединяющие выступающий нуклеотид со спаренным нуклеотидом, который следует за выступающим нуклеотидом. Например, может быть по меньшей мере две фосфотиоатные межнуклеотидные связи между концевыми тремя нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, а третий является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Эти концевые три нуклеотида могут быть на 3'-конце антисмысловой цепи, 3'-конце смысловой цепи, 5'-конце антисмысловой цепи и/или 5'-конце антисмысловой цепи.

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

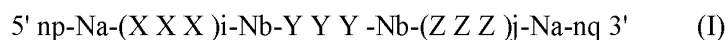
В одном варианте осуществления средство RNAi содержит несовпадение(несовпадения) с мишенью в дуплексе или их комбинации. Несовпадение может встречаться в выступающем участке или дуплексном участке. Пары оснований можно выстраивать, исходя из их склонности содействовать диссоциации или плавлению (например,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

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

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

В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокси-тимин (dT). В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокси-тимин (dT). В одном варианте осуществления присутствует короткая последовательность дезокси-тимин нуклеотидов, например, два dT нуклеотида на 3'-конце смысловой и/или антисмысловой цепи.

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



где каждый из i и j независимо равняется 0 или 1;

каждый из r и q независимо равняется 0-6;

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

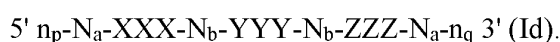
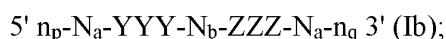
каждая из Nb независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10 модифицированных нуклеотидов;

каждый из pr и pq независимо представляет собой выступающий нуклеотид;
 где N_b и Y имеют неодинаковую модификацию; и
 каждый из XXX , YYY и ZZZ независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов. Предпочтительно, в YYY все нуклеотиды 2'-F-модифицированы.

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

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

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



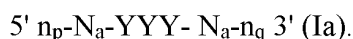
В тех случаях, когда смысловая цепь представлена формулой (Ib), N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая из N_a независимо может представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20,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

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

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

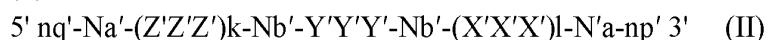
Каждый из X , Y и Z может быть одинаковым или отличным от остальных.

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



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

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



где каждый из k и l независимо равняется 0 или 1;

каждый из p' и q' независимо равняется 0-6;

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

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

каждый из pr' и pq' независимо представляет собой выступающий нуклеотид;

где N_b' и Y' имеют неодинаковую модификацию; и

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

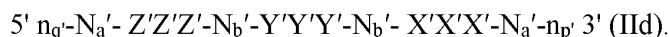
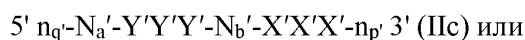
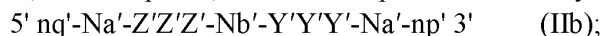
В одном варианте осуществления N_a' и/или N_b' имеет модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

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

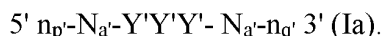


В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (Ib), Nb' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая из Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (Ic), Nb' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая из Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (Id), каждая из Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждая из Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно, Nb равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

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



В тех случаях, когда антисмысловая цепь представлена формулой (Ia), каждая из Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Каждый из X', Y' и Z' может быть одинаковым или отличным от остальных.

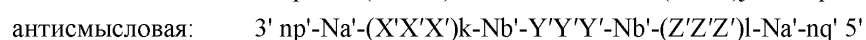
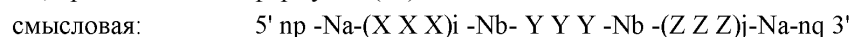
Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо может быть модифицирован LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором.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

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

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

Смысловая цепь, представленная любой из вышеприведенных формул (Ia), (Ib), (Ic) и (Id), образует дуплекс с антисмысловой цепью, представленной любой из формул (IIa), (IIb), (IIc) и (IId), соответственно.

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



(III)

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

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

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

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

каждый из np', np, nq' и nq, каждый из которых может присутствовать или отсутствовать, независимо представляет собой выступающий нуклеотид; и

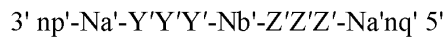
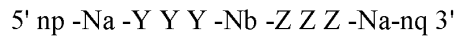
каждый из XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' и Z'Z'Z' независимо представляет собой один мотив из трех одинаковых модификаций трех последовательных нуклеотидов.

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

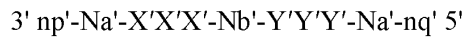
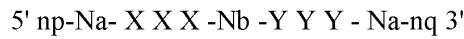
Иллюстративные комбинации смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс RNAi, включают формулы, приведенные ниже:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(III d)

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIIa), каждый из Na независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIIb), каждый из Nb независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый из Na независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (IIIc), каждый из Nb, Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый из Na независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В тех случаях, когда средство RNAi представлено формулой (III d), каждый из Nb, Nb' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый из Na, Na' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый из Na, Na', Nb и Nb' независимо содержит модификации чередующегося паттерна.

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

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

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

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

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

леотида X отличается от модификации нуклеотида X'.

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

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

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

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

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

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

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

Лиганд может быть присоединен к полинуклеотиду через носитель. Носители включают (i) по меньшей мере одну "точку присоединения к остову", предпочтительно две "точки присоединения к остову" и (ii) по меньшей мере одну "связывающую точку присоединения". Выражение "точка присоединения к остову", используемое в данном документе, означает функциональную группу, например гидроксильную группу, или, как правило, связь, доступную для введения носителя в остов и которая подходит для этого, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, серосодержащий остов рибо-

нуклеиновой кислоты. Выражение "связывающая точка присоединения" (TAP) в некоторых вариантах осуществления означает входящий в кольцо атом циклического носителя, например, атом углерода или гетероатом (отличный от атома, который обеспечивает точку присоединения к остову), с которым связывается выбранный фрагмент. Фрагмент может быть, например, углеводом, например моносахаридом, дисахаридом, трисахаридом, тетрасахаридом, олигосахаридом и полисахаридом. Необязательно, выбранный фрагмент соединен промежуточной связью с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель будет часто включать функциональную группу, например, аминогруппу, или, как правило, обеспечивать связь, которая подходит для введения или связывания другого химического структурного элемента, например, лиганда, с составным кольцом.

Средства для RNAi можно конъюгировать с лигандом через носитель, где носитель может быть циклической группой или ациклической группой; предпочтительно циклическая группа выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]-диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина; предпочтительно ациклическая группа выбрана из остова, представляющего собой серинол, или остова, представляющего собой диэтиламинамин.

В определенных конкретных вариантах осуществления средство RNAi для применения в способах согласно настоящему изобретению представляет собой средство, выбранное из группы средств, приведенных в любой из табл. 3-8. Такие средства могут дополнительно содержать лиганд.

IV. иРНК, конъюгированные с лигандами.

Другая модификация РНК из числа иРНК по настоящему изобретению включает химическое связывание с одним или несколькими лигандами РНК, фрагментами или конъюгатами, которые повышают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение иРНК. Такие фрагменты включают без ограничения липидные фрагменты, такие как холестеринный фрагмент (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6553-6556), холевую кислоту (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053-1060), тиоэфир, например, берил-S-третилтиол (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765-2770), тиохолестерин (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533-538), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett, 1990, 259:327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49-54), фосфолипид, например, ди-гексадецил-рац-глицерин или триэтил-аммоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777-3783), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969-973) или адамантан-уксусная кислота (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651-3654), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229-237), или октадециламин, или гексиламино-карбонил-оксихолестеринный фрагмент (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923-937).

В одном варианте осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или время существования средства, представляющего собой иРНК, в которое он введен. В предпочтительных вариантах осуществления лиганд обеспечивает повышенную аффинность в отношении выбранной мишени, например, молекулы, клетки или типа клеток, компартмента, например клеточного компартмента или части органа, ткани, органа или участка тела, например, по сравнению с видами, у которых отсутствует такой лиганд. Предпочтительные лиганды не будут принимать участие в спаривании дуплекса в дуплексной нуклеиновой кислоте.

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

Лиганды также включают нацеливающие группы, например нацеливающее на клетку или ткань средство, например лектин, гликопротеин, липид или белок, например антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как клетка почки. Нацеливающей группой может быть тиреотропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностный белок А, углевод-муцин, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза,

поливалентная фукоза, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентная галактоза, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчная кислота, фолат, витамин В12, витамин А, биотин или RGD-пептид, или миметик RGD-пептида.

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

Лигандами могут быть белки, например гликопротеины, или пептиды, например молекулы со специфической аффинностью в отношении ко-лиганда, или антитела, например, антитело, которое связывается с определенным клеточным типом, таким как печеночная клетка. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Они также могут включать отличные от пептидов виды, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентную глюкозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентную маннозу или поливалентную фукозу. Лигандом, например, может быть липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF-κB.

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

В некоторых вариантах осуществления лиганд присоединен к иРНК, как описано в данном документе, и действует как фармакокинетический модулятор (РК-модулятор). РК-модуляторы включают липофилы, желчные кислоты, стероиды, фосфолипидные аналоги, пептиды, белок-связывающие средства, PEG, витамины и т.д. Иллюстративные РК-модуляторы включают без ограничения холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкил-глицериды, диацил-глицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д. Олигонуклеотиды, которые содержат некоторое количество фосфотиоатных связей, также, как известно, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды из приблизительно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфотиоатных связей в остове, также пригодны в настоящем изобретении в качестве лигандов (например, в качестве РК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связываются с сывороточными компонентами (например, сывороточными белками) также пригодны для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в описанных в данном документе вариантах осуществления.

Лиганд-конъюгированные олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут быть синтезированы с применением олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональность, такие как те, полученные из присоединения связывающей молекулы на олигонуклеотиде (описано ниже). Этот реакционноспособный олигонуклеотид можно непосредственно подвергать взаимодействию с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезированы с наличием любой из разнообразных защитных групп, или лигандами, которые имеют связующий фрагмент, присоединенный к нему.

Олигонуклеотиды, применяемые в конъюгатах по настоящему изобретению, можно получать удобным и обычным способом путем хорошо известного твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Дополнительно или альтернативно могут быть применены любые другие средства для такого синтеза, известные в данной области техники. Также известно применение аналогичных методов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфотиоаты и алкилированные производные.

Лиганд-конъюгированные олигонуклеотиды и лиганд-молекула, несущая последовательность-специфические связанные нуклеозиды по настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем синтезаторе ДНК с применением стандартных предшественников нуклеотида или нуклеозида, или предшественников нуклеотид- или нуклеозид-конъюгата, которые уже несут связывающий фрагмент, предшественников лиганд-нуклеотида или нуклеозид-конъюгата, которые уже несут молекулу лиганда, или строительных блоков, несущих лиганд, отличный от нуклеозида.

При применении предшественников нуклеотид-конъюгата, которые уже несут связывающий фрагмент, синтез последовательность-специфических связанных нуклеозидов, как правило, завершают и мо-

лекулу лиганда затем подвергают взаимодействию со связывающим фрагментом с образованием лиганд-конъюгированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотида или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора с применением фосфорамидитов, полученных из лиганд-нуклеозид конъюгатов, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и обычно применяются в синтезе олигонуклеотидов.

А. Конъюгаты липидов.

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

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

В предпочтительном варианте осуществления липидный лиганд связывается с HSA. Предпочтительно, он связывается с HSA с достаточной аффинностью, так что конъюгат будет предпочтительно распределяться в ткани, отличной от ткани почек. Однако предпочтительно, чтобы аффинность не была настолько сильной, чтобы связывание HSA-лиганд было необратимым.

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

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

В. Средства, обеспечивающие проникновение в клетку.

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

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в данном документе олигопептидомиметиком) является молекулой, способной сворачиваться в определенную трехмерную структуру, подобную естественному пептиду. Прикрепление пептида и пептидомиметиков к средствам, представляющим собой иРНК, может повлиять на фармакокинетическое распределение иРНК, например, путем повышения клеточного распознавания и абсорбции. Фрагмент, представляющий собой пептид или пептидомиметик, может составлять примерно 5-50 аминокислот в длину, например приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот в длину.

Пептидом или пептидомиметиком, например, может быть пептид, обеспечивающий проникновение в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий главным образом из Tug, Tgr или Phe). Фрагментом, представляющим собой пептид, может быть пептид-дендример, стерически затрудненный пептид или перекрестно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте фрагмент, представляющий собой пептид, может включать гидрофобную последовательность, контролирующую перенос через мембрану (MTS). Иллюстративным содержащим гидрофобную MTS пептидом является RFGF с аминокислотной последовательностью AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 23).

RFGF-аналог (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 24), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающим фрагментом. Фрагмент, представляю-

ший собой пептид, может быть "доставляющим" пептидом, который может переносить большие полярные молекулы, в том числе пептиды, олигонуклеотиды и белки, через клеточные мембраны. Например, как было обнаружено, последовательности из Tat-белка HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 25) и белка Antennapedia Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 26) способны функционировать в качестве пептидов для доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться случайными последовательностями ДНК, как, например, пептид, идентифицированный из библиотеки фагового дисплея или комбинаторной библиотеки "одна гранула-одно соединение" (ОВОС) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Примером пептида или пептидомиметика, связанного со средством, представляющим собой dsRNA, посредством введенной мономерной единицы с целью нацеливания на клетку, является содержащий аргинин-глицин-аспарагиновую кислоту (RGD) пептид или RGD-миметик. Фрагмент, представляющий собой пептид, может характеризоваться длиной в пределах от приблизительно 5 аминокислот до приблизительно 40 аминокислот. Фрагменты, представляющие собой пептиды, могут характеризоваться структурной модификацией, такой как для повышения стабильности или управления конформационными свойствами. Можно применять любую из структурных модификаций, описанных ниже.

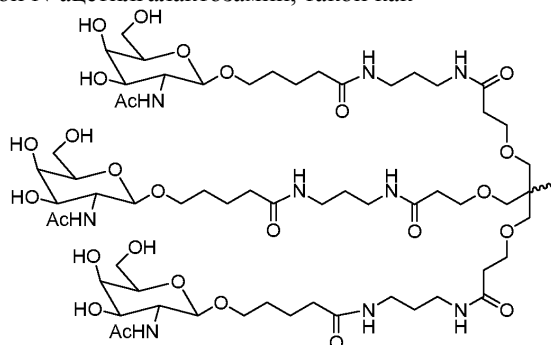
RGD-пептид для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть линейным или циклическим, и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован для облегчения нацеливания на определенную ткань (ткани). Пептиды, содержащие RGD, и пептидомиметики могут включать D-аминокислоты, а также синтетические RGD-миметики. В дополнение к RGD можно применять другие фрагменты, которые нацелены на лиганд интегрин. Предпочтительные конъюгаты с таким лигандом нацелены на PECAM-1 или VEGF.

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

С. Конъюгаты углевода.

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению предлагается олигонуклеотид иРНК, дополнительно содержащий углевод. Конъюгированная с углеводом иРНК является предпочтительной для доставки *in vivo* нуклеиновых кислот, а также в композициях, пригодных для терапевтического применения *in vivo*, как описано в данном документе. Применяемый в данном документе "углевод" относится к соединению, которое является либо углеводом *per se*, состоящим из одной или нескольких единиц моносахарида, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим) с кислородом, азотом или атомом серы, присоединенных к каждому атому углерода; или соединению, имеющему углеводную часть в качестве его части, состоящей из одной или нескольких единиц моносахарида, имеющих по меньшей мере 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим) с кислородом, азотом или атомом серы, присоединенных к каждому атому углерода. Типичные углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие от примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 единиц моносахарида) и полисахариды, такие как крахмалы, целлюлоза, гликоген и полисахаридные смолы. Определенные моносахариды включают C5 и более (например, C5, C6, C7 или C8) сахара; ди- и трисахариды включают сахара с двумя или тремя единицами моносахаридов (например, C5, C6, C7 или C8).

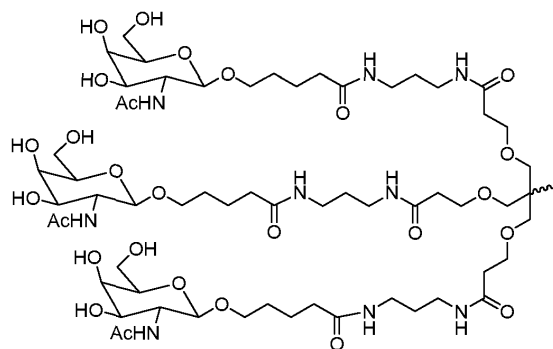
В одном варианте осуществления конъюгат углевода для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой моносахарид. В одном варианте осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как



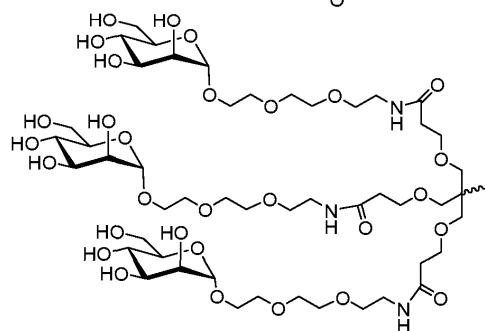
Формула II.

В другом варианте осуществления конъюгат углевода для применения в композициях и способах по

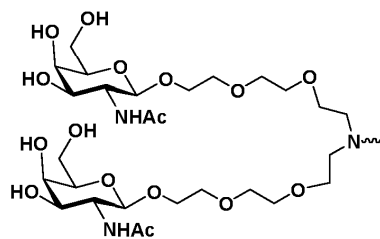
настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из



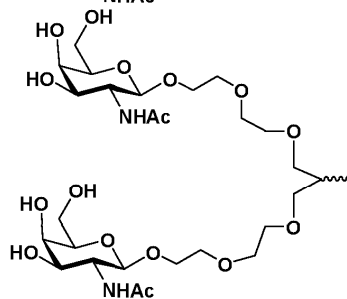
Формула II,



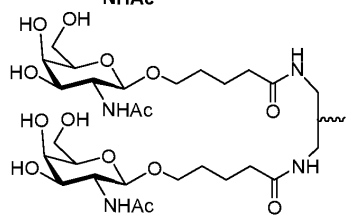
Формула III,



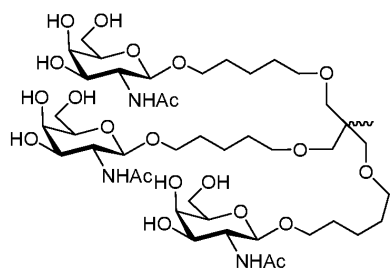
Формула IV,



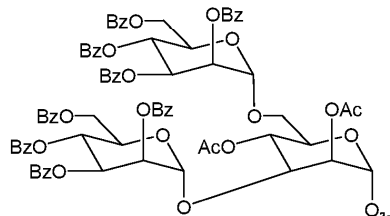
Формула V,



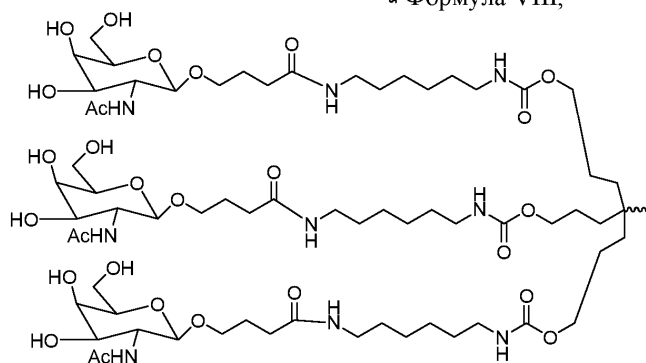
Формула VI,



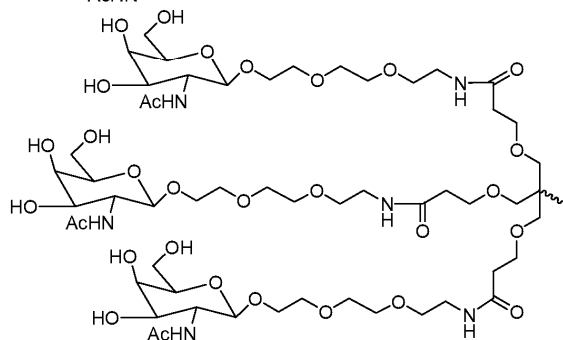
Формула VII,



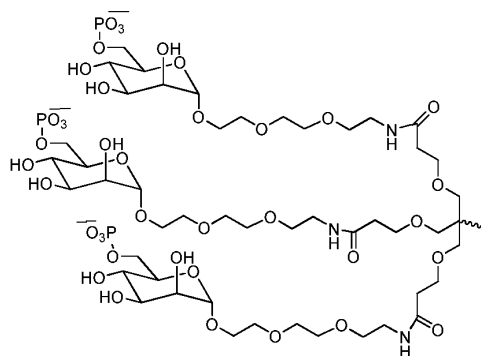
Формула VIII,



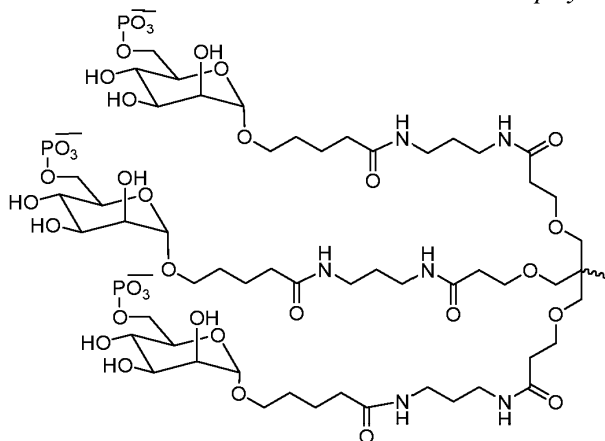
Формула IX,



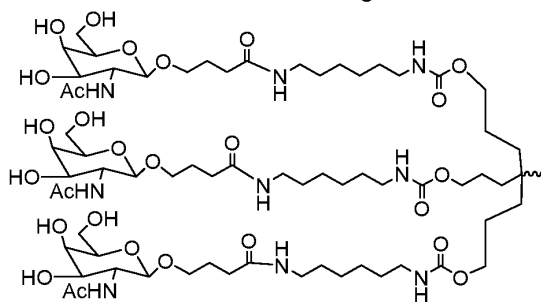
Формула X,



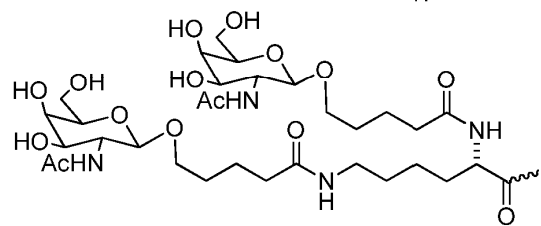
Формула XI,



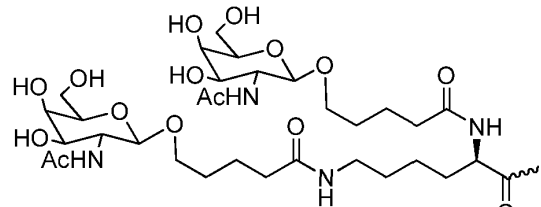
Формула XII,



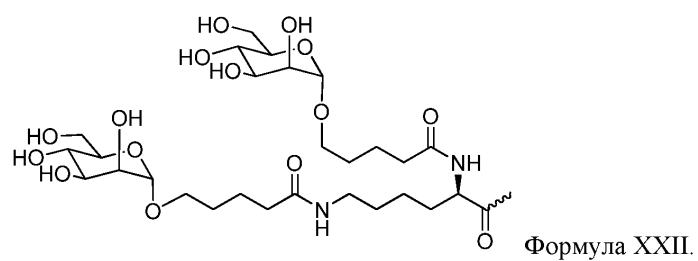
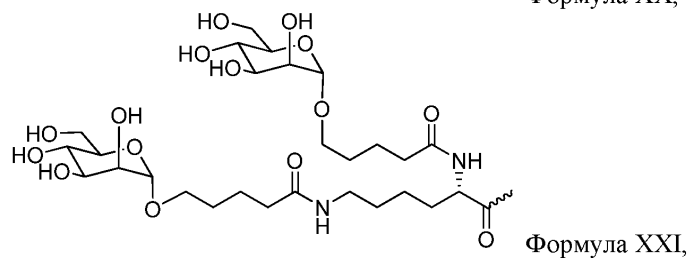
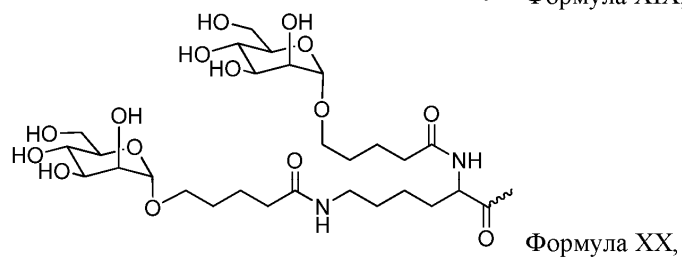
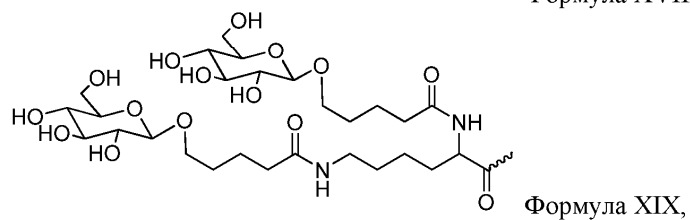
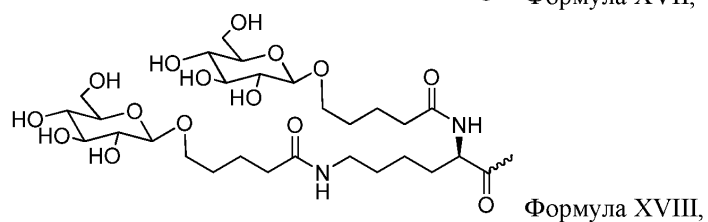
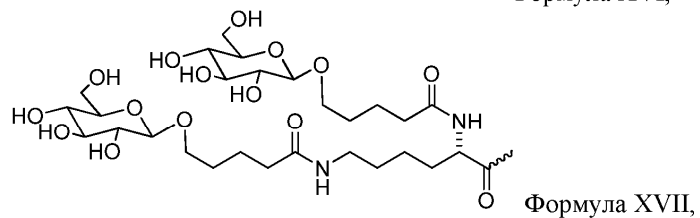
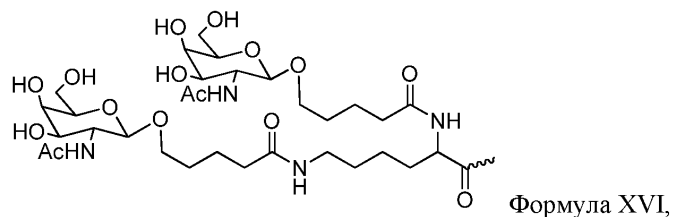
Формула XIII,



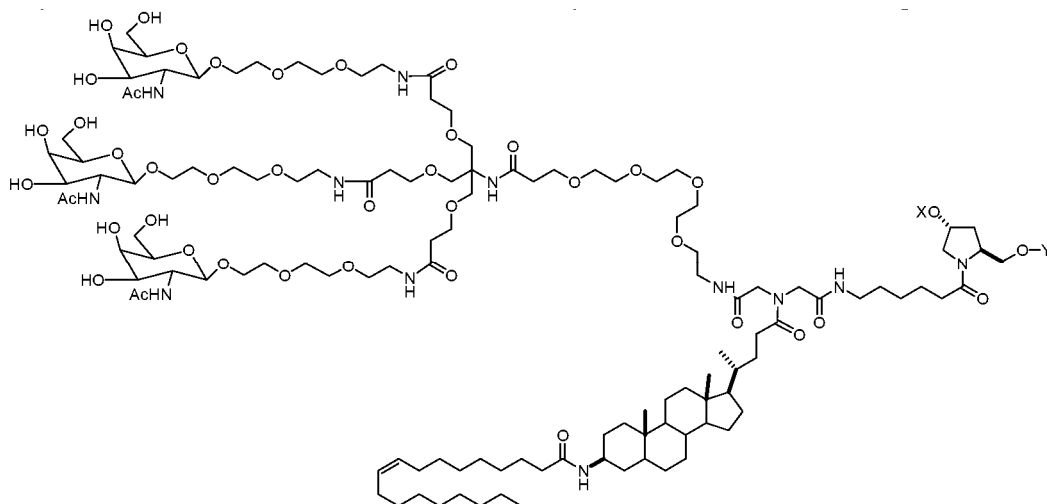
Формула XIV,



Формула XV,



Другой типичный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в данном документе, включает без ограничения



(формула XXIII), где один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат углевода дополнительно содержит один или несколько дополнительных лигандов, как описано выше, таких как без ограничения РК-модулятор и/или пептид, обеспечивающий проникновение в клетку.

D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные в данном документе, могут быть присоединены к олигонуклеотиду иРНК различными линкерами, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Выражение "линкер" или "связывающая группа" означает органическую группу, которая соединяет две части соединения, например ковалентно прикрепляет две части соединения. Линкеры обычно содержат прямую связь или атом, такой как кислород или сера, звено, такое как NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH, или цепочку атомов, такую как без ограничения замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклиалкил, гетероциклиалкенил, гетероциклиалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкинилариалалкил, алкинилариалалкенил, алкинилариалалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклиалкил, алкилгетероциклиалкенил, алкилгетероциклиалкинил, алкенилгетероциклиалкил, алкенилгетероциклиалкенил, алкенилгетероциклиалкинил, алкинилгетероциклиалкил, алкинилгетероциклиалкенил, алкинилгетероциклиалкинил, алкиларил, алкениларильная, алкиларил, алкиларил, алкиларил, алкиларил, алкиларил, алкиларил, где одна или несколько метиленовых групп могут быть прерваны или удалены по O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), замещенный или незамещенный арил, замещенный или незамещенный гетероарил, замещенный или незамещенный гетероцикл, где R₈ представляет собой водород, ацил, алифатическое соединение или замещенное алифатическое соединение. В одном варианте осуществления линкер составляет между приблизительно 1-24 атомами углерода, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомами, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомами.

Расщепляемая связывающая группа является достаточно стабильной вне клетки, но при поступлении в целевую клетку расщепляется с высвобождением двух частей, которые линкер удерживает вместе. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая связывающая группа расщепляется по меньшей мере приблизительно в 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или более, или по меньшей мере приблизительно в 100 раз быстрее в целевой клетке или при условии первой передачи (которое может, например, быть выбрано для имитирования или представления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при условии второй передачи (которое может, например, быть выбрано для имитирования или представления условий, обнаруженных в крови или сыворотке).

Расщепляемые связывающие группы являются чувствительными к средствам расщепления, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или наличию дегенеративных молекул. Как правило, средства расщепления более распространены или обнаружены на более высоких уровнях или активности внутри клеток, чем в сыворотке крови или крови. Примеры таких дегенеративных средств включают: восстанавливающие средства, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не имеют субстратной специфичности, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или восстановительные средства, такие как меркаптаны, присутствующие в клетках, которые могут разрушать окислительно-восстановительную расщепляемую связывающую группу путем восстановле-

ния; эстеразы; эндосомы или средства, способные создать кислую среду, например, те, которые приводят к рН пять или меньше; ферменты, которые могут гидролизовать или разрушить кислотно-расщепляемую связывающую группу, действуя как обычная кислота, пептидазы (которые могут быть субстрат-специфичными) и фосфатазы.

Расщепляемая связывающая группа, такая как дисульфидная связь, может быть восприимчива к рН. РН сыворотки крови человека составляет 7,4, тогда как среднее внутриклеточное рН составляет немного ниже, в пределах приблизительно 7,1-7,3. Эндосомы характеризуются более кислой средой с рН в пределах 5,5-6,0, а лизосомы характеризуются еще более кислой средой с рН в пределах 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется в условиях предпочтительного рН, тем самым высвобождая катионный липид из лиганда внутрь клетки или в желаемый компартмент клетки.

Линкер может содержать расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой связывающей группы, введенной в линкер, может зависеть от клетки-мишени. Например, лиганд, нацеленный на печень, может быть связан с катионным липидом через линкер, который содержит эфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами и, следовательно, линкер будет расщеплен более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты на эстеразу. Другие типы клеток, богатые на эстеразы, включают клетки легкого, коры почек и яйца.

Линкеры, содержащие пептидные связи, могут быть применены для нацеливания на типы клеток, богатых на пептидазы, например клетки печени и синовиоциты.

Как правило, пригодность расщепляемой связывающей группы кандидата можно оценить путем оценки способности разрушающего средства (или условия) расщеплять связывающую группу кандидата. Также будет желательно также исследовать расщепляемую связывающую группу кандидата на способности противостоять расщеплению в крови или при приведении в контакт с другими тканями, не являющимися целевыми. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению между первым и вторым условием, где первое выбрано как показатель расщепления в целевой клетке, а второе выбрано как показатель расщепления в других тканях или биологических жидкостях, например, крови или сыворотке. Оценки могут быть выполнены в свободных клеточных системах, в клетках, в клеточной культуре, в органе или ткани культуры, или на животных в совокупности. Может быть полезно произвести первоначальные оценки в свободно-клеточных или культуральных условиях и подтвердить дальнейшими оценками на животных в совокупности. В предпочтительных вариантах осуществления полезные соединения кандидатов расщепляются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитирования внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитирования внеклеточных условий).

i. Окислительно-восстановительные расщепляемые связывающие группы.

В одном варианте осуществления расщепляемая связывающая группа представляет собой окислительно-восстановительную расщепляемую связывающую группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером восстановительной расщепляемой связывающей группы является дисульфид-связывающая группа (-S-S-). Для определения пригодности расщепляемой связывающей группы кандидата быть "восстановительной расщепляемой связывающей группой" или, например, быть пригодной для применения в конкретном фрагменте иРНК и конкретном нацеливаемом средстве, можно использовать способы, описанные в данном документе. Например, кандидата можно оценивать путем инкубации с дитиотрептолом (DTT) или другими восстановителями с применением реагентов, известен в данной области техники, которые имитируют скорость расщепления, которое можно наблюдать в клетке, например, целевой клетке. Также кандидата можно оценивать в условиях, выбранных для имитирования условий в крови или сыворотке. В одном варианте осуществления соединения кандидатов расщепляются не более чем на приблизительно 10% в крови. В других вариантах осуществления полезные соединения кандидатов разрушаются в по меньшей мере приблизительно 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитирования внутриклеточных условий) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных для имитирования внеклеточных условий). Скорость расщепления соединений кандидатов может быть определена с помощью стандартных анализов ферментативной кинетики в условиях, выбранных для имитации внутриклеточной среды и по сравнению с условиями, выбранными для имитации внеклеточной среды.

ii. i. Расщепляемые связывающие группы на основе фосфата.

В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе фосфата. Расщепляемая связывающая группа на основе фосфата расщепляется средствами, которые разрушают или гидролизуют фосфатную группу. Примером средства, расщепляющего фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатазы в клетках. Примерами связывающих групп на основе фосфата являются -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Предпочтительные варианты осуществления представляют собой -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-,

-O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Предпочтительный вариант осуществления представляет собой -O-P(O)(OH)-O-. Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше.

iii. i. Кислотно-расщепляемые связывающие группы.

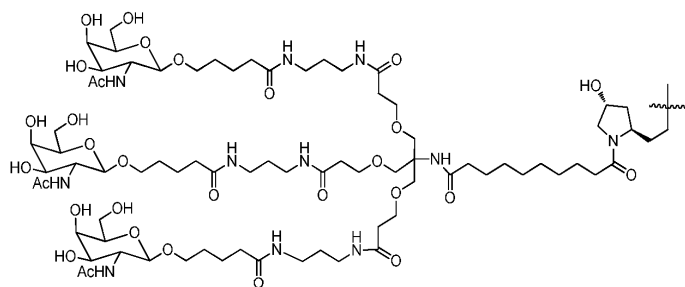
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит кислотно-расщепляемую связывающую группу. Кислотно-расщепляемая связывающая группа представляет собой связывающую группу, которая расщепляется в присутствии кислоты. В предпочтительных вариантах осуществления кислотно-расщепляемые связывающие группы расщепляются в кислотных условиях при pH приблизительно 6,5 или ниже (например, приблизительно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже), или с помощью средств, таких как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. Специфические органеллы в клетке, содержимое которых имеет низкое значение pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечить условия для расщепления кислотно-расщепляемых связывающих групп. Примеры кислотно-расщепляемых связывающих групп включают без ограничения гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Кислотно-расщепляемые группы могут характеризоваться общей формулой $-C=NN-C(O)O$ или $-OC(O)$. В предпочтительном варианте осуществления, когда углерод присоединен к кислороду сложного эфира (алкоксигруппе), в этом участвует арильная группа, замещенная алкильная группа или третичный алкил, такой как диметил-пентил или трет-бутил. Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше.

iv. Связывающие группы на основе сложного эфира.

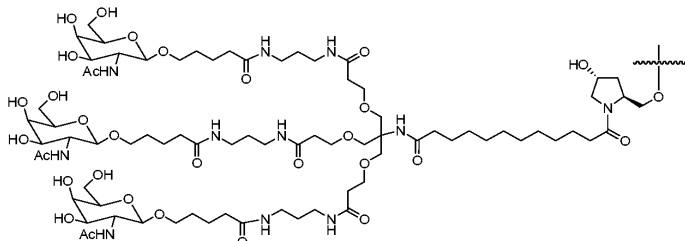
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит связывающую группу на основе сложного эфира. Расщепляемая связывающая группа на основе сложного эфира расщепляется ферментами, такими как эстеразы и амидазы в клетках. Примеры расщепляемых связывающих групп на основе сложного эфира включают без ограничения сложные эфиры алкилена, алкенилена и алкиниленовых групп. Расщепляемые связывающие группы на основе сложного эфира представлены общей формулой $-C(O)O-$ или $-OC(O)-$. Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше.

v. Расщепляемые группы на основе пептида.

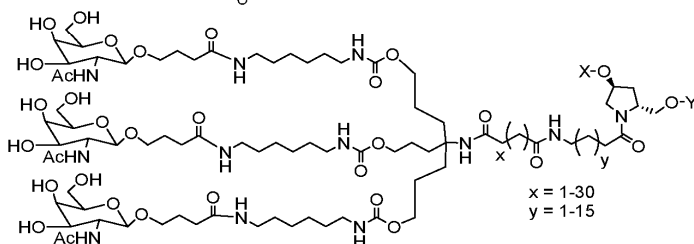
В другом варианте осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую связывающую группу на основе пептида. Расщепляемая связывающая группа на основе пептида расщепляется ферментами, такими как пептидазы и протеазы в клетках. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами с образованием олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Расщепляемые группы на основе пептида не включают амидную группу ($-C(O)NH-$). Амидная группа может быть образована между любым алкиленом, алкениленом или алкиниленом. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков. Расщепляемая группа на основе пептида обычно ограничена пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами с образованием пептидов и белков, и не включает амидную функциональную группу целиком. Расщепляемые связывающие группы на основе пептида представлены общей формулой $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$, где RA и RB представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Эти кандидаты могут быть оценены с применением способов, аналогичных описанным выше. В одном варианте осуществления иРНК по настоящему изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов иРНК с линкерами из композиций и способов по настоящему изобретению, включают без ограничения



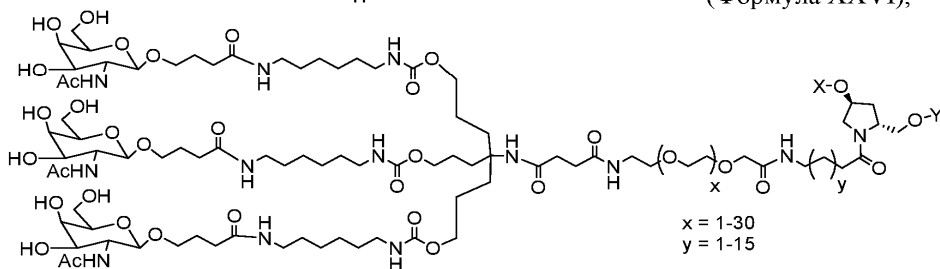
(Формула XXIV),



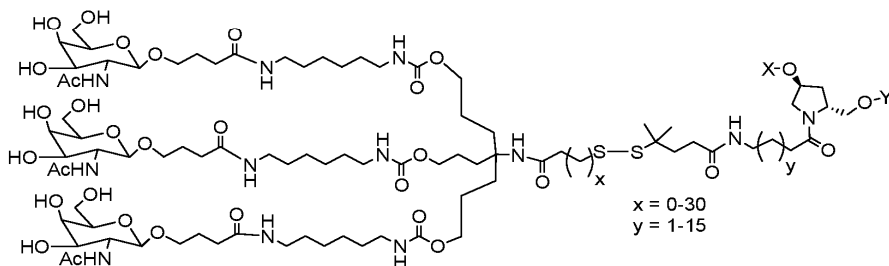
(Формула XXV),



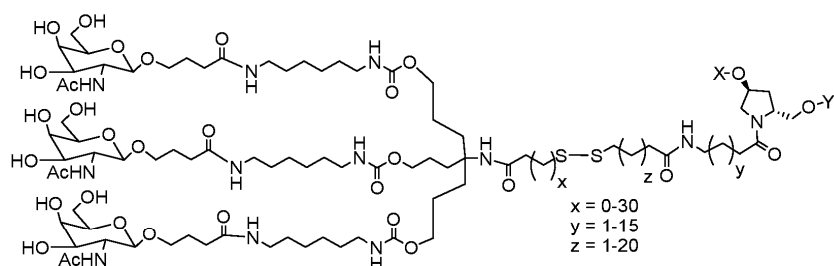
(Формула XXVI),



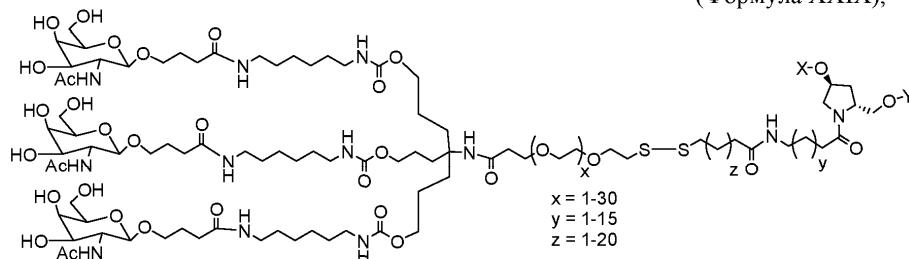
(формулы XXVII),



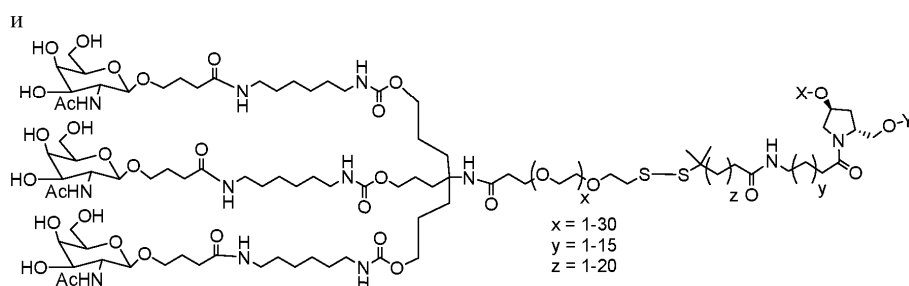
(формулы XXVIII),



(Формула XXIX),



(Формула XXX),



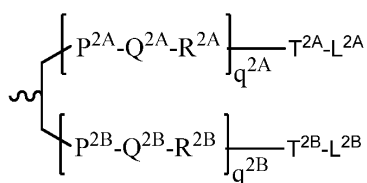
(Формула XXXI),

где один из X и Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

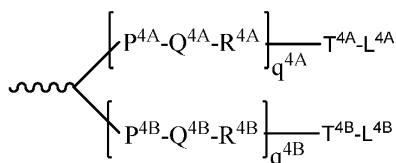
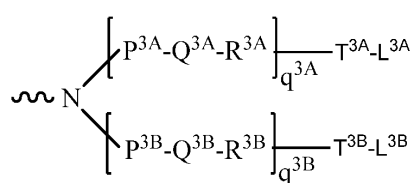
В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по настоящему изобретению лиганд представляет собой один или несколько производных "GalNAc" (N-ацетилгалактозамина), присоединенные через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления dsRNA согласно настоящему изобретению конъюгирована с двухвалентным и трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XXXII)-(XXXV):

Формула XXXII

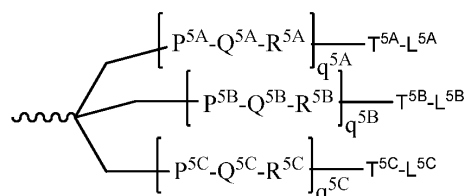


Формула XXXIII



Формула XXXIV

Или



Формула XXXV

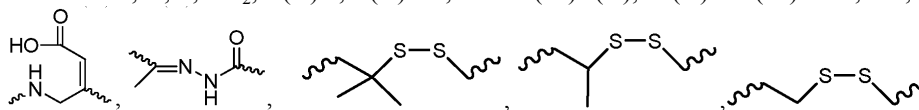
Где q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B и q5C независимо представляют собой для каждого случая 0-20 и где повторяющиеся единицы могут быть одинаковыми или различными;

каждый из P2A, P2B, P3A, P3B, P4A, P4B, P5A, P5B, P5C, T2A, T2B, T3A, T3B, T4A, T4B, T4A, T5B, T5C независимо для каждого случая отсутствует, переставляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O),

CH₂, CH₂NH или CH₂O;

Q2A, Q2B, Q3A, Q3B, Q4A, Q4B, Q5A, Q5B, Q5C независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой алкилен, замещенный алкилен, где один или несколько метиленов могут прерываться или оканчиваться одним или несколькими из O, S, S(O), SO₂, N(RN), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

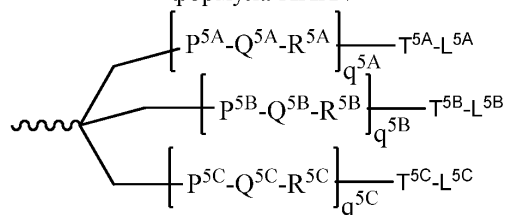
каждый из R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} независимо для каждого случая отсутствует, представляет собой NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



ли гетероцикл;

L2A, L2B, L3A, L3B, L4A, L4B, L5A, L5B и L5C представляют собой лиганд; т.е. каждый независимо для каждого случая представляет собой моносахарид (например, GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R_a представляет собой H или аминокислотную боковую цепь. Трехвалентные конъюгированные производные GalNAc особенно полезны для применения со средствами RNAi для ингибирования экспрессии целевого гена, такие как представлены формулой (XXXV)

формула XXXV



(VII)

где L5A, L5B и L5C представляют собой моносахарид, такой как производное GalNAc.

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных групп линкера, конъюгированных с производными GalNAc, включают без ограничения структуры, указанные выше как формулы II, VII, XI, X и XIII.

Иллюстративные патенты США, которые описывают получение конъюгатов РНК включают без ограничения патенты США №

4828979;

4948882; 5218105; 5525465; 5541313; 5545730; 5552538; 5578717, 5580731;
5591584; 5109124; 5118802; 5138045; 5414077; 5486603; 5512439; 5578718;
5608046; 4587044; 4605735; 4667025; 4762779; 4789737; 4824941; 4835263;
4876335; 4904582; 4958013; 5082830; 5112963; 5214136; 5082830; 5112963;
5214136; 5245022; 5254469; 5258506; 5262536; 5272250; 5292873; 5317098;
5371241, 5391723; 5416203, 5451463; 5510475; 5512667; 5514785; 5565552;
5567810; 5574142; 5585,481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928 и
5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; 8106022,

полное содержание каждого из которых включено тем самым в данный документ посредством ссылки.

Не является необходимым для всех позиций в данном соединении быть равномерно модифицированными, и на самом деле более чем одна из вышеуказанных модификаций может быть включена в отдельное соединение или даже в отдельный нуклеозид в пределах иРНК. Настоящее изобретение также включает соединения иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

Соединения "химерной" иРНК или "химеры" в контексте настоящего изобретения представляют собой соединения иРНК, предпочтительно dsRNA, которые содержат два или более химически различных участка, каждый из которых состоит по меньшей мере из одного мономера, т.е. нуклеотида в случае соединения dsRNA. Такие иРНК обычно содержат по меньшей мере один участок, где РНК модифицирована таким образом, чтобы наделить иРНК повышенной устойчивостью к разрушению нуклеазой, увеличенным клеточным поглощением и/или увеличением аффинности связывания в отношении целевой нуклеиновой кислоты. Дополнительно участок иРНК может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять РНК:ДНК или РНК:РНК гибриды. В качестве примера, РНКазы H является клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет РНК-цепь в РНК:ДНК-дуплексе. Активация РНКазы H, следовательно, приводит к расщеплению целевой РНК, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования иРНК при экспрессии гена. Следовательно, сравнимые результаты зачастую можно получить с более короткими иРНК при применении химерных dsRNA по сравнению с фосфотиоатными

дезоксигибризациями dsRNA того же целевого участка. Расщепление РНК-мишени обычно можно обнаружить с помощью гель-электрофореза и, при необходимости, методами гибридизации связанных нуклеиновых кислот, известных в данной области техники.

В некоторых случаях РНК из числа иРНК может быть модифицирована группой, не являющейся лигандом. Ряд молекул, не являющихся лигандами, были конъюгированы с иРНК в целях повышения активности, клеточного распределения или клеточного поглощения иРНК, способы выполнения таких конъюгаций доступны в научной литературе. В такие фрагменты, не являющиеся лигандами, включены липидные фрагменты, такие как холестерин (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), холевая кислота (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), тиоэфир, например гексил-S-тримитиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), алифатическую цепь, например остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например ди-гексадецил-рац-глицерин или три-этил-аммоний 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), цепь полиамина или полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) или адамантан-уксусная кислота (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), пальмитиловый фрагмент (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) или октадециламин, или гексиламино-карбонил-оксихолестериновый фрагмент (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Иллюстративные патенты США, которые описывают получение таких конъюгатов РНК, были перечислены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих amino-линкер в одном или нескольких положениях последовательности. Аминогруппа затем реагирует с молекулой, подлежащей конъюгации, с применением соответствующего сочетания или активирующих реагентов. Реакцию конъюгирования можно выполнять как с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, или после расщепления РНК в фазе раствора. Очистка конъюгата РНК с помощью HPLC, как правило, приводит к получению чистого конъюгата.

V. Доставка iRNA согласно настоящему изобретению.

Доставку iRNA согласно настоящему изобретению к клетке, например клетке субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, которое описано в данном документе), можно осуществлять различными путями. Например, доставку можно осуществлять путем приведения клетки в контакт с иРНК по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставку *in vivo* также можно осуществлять непосредственно путем введения композиции, содержащей иРНК, например dsRNA, субъекту. В альтернативном случае, доставку *in vivo* можно осуществлять опосредованно путем введения одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. Такие альтернативные случаи описаны далее ниже.

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

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

А. Кодированные вектором iRNA согласно настоящему изобретению iRNA, целенаправленно воздействующие на ген CFB, C3 или C9, могут экспрессироваться с транскрипционных единиц, вставленными в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture, A., et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., международную PCT публикацию № WO 00/22113, Conrad, международную PCT публикацию № WO 00/22114 и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть временной (приблизительно от часов до недели) или длительной (от недель до месяцев или дольше) в зависимости от конкретной применяемой конструкции и целевых тканей или типа клеток. Такие трансгены можно вводить в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может быть интегрирующим или неинтегрирующим вектором. Трансген также может быть сконструирован с возможностью наследования его в виде экстрахромосомной плазмиды (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

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

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

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

лями-катионными липидами (например, олигофектаминол) или носителями на основе некатонных липидов (например, TransIt-ТКОТМ). В настоящем изобретении также рассматриваются множественные трансфекции при помощи липидов для типов иРНК-опосредованного нокдауна, нацеленного на различные участки целевой РНК, на протяжении недели или более. Успешное введение векторов в клетки хозяина можно контролировать при помощи разнообразных известных способов. Например, временную трансфекцию можно выявить при помощи репортера, такого как флуоресцентный маркер, к примеру, зеленый флуоресцентный белок (GFP). Стабильная трансфекция клеток *ex vivo* может быть подтверждена при помощи маркеров, которые придают трансфицированной клетке устойчивость к определенным факторам окружающей среды (например, антибиотикам и лекарственным средствам), такую как устойчивость к гиромоцину В.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VI. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также включает фармацевтические композиции и составы, которые включают иРНК по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие иРНК, которые описаны в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие iRNA, являются пригодными для лечения заболевания или нарушения, связанного с экспрессией или активностью гена CFB, C3 и/или C9, например заболевания, связанного с компонентом комплемента, которое описано в данном документе. Такие фармацевтические композиции составляют в зависимости от способа доставки. Одним примером являются композиции, которые составлены для системного введения посредством доставки парентеральным путем, например путем подкожной (SC) или внутривенной (IV) доставки. Другим примером являются композиции, которые составлены для непосредственной доставки в паренхиму головного мозга, например путем инфузии в головной мозг, как, например, непрерывной инфузии при помощи насоса. Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии целевого гена. Как правило, приемлемая доза иРНК по настоящему изобретению будет составлять в диапазоне от приблизительно 0,001 до приблизительно 200,0 миллиграмм на килограмм массы тела реципиента в день, как правило, в диапазоне от приблизительно 1 до 50 мг на килограмм массы тела в день. Например, dsRNA можно вводить в количестве приблизительно 0,01 мг/кг, приблизительно 0,05 мг/кг, приблизительно 0,5 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 10 мг/кг, приблизительно 20 мг/кг, приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 40 мг/кг или приблизительно 50 мг/кг на разовую дозу.

Например, dsRNA можно вводить в дозе приблизительно

0,1, 0,2, 0,3, 0,4,

0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4,
2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4,
4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4,
6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4,
8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9

количество iRNA, такое как приблизительно

0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

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

В некоторых вариантах осуществления субъектам вводят, например, подкожно или внутривенно, несколько доз терапевтического количества iRNA, как например, дозу приблизительно

0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

или приблизительно 50 мг/кг.

Многодозный режим может включать введение терапевтического количества иРНК ежедневно, например, в течение двух дней, трех дней, четырех дней, пяти дней, шести дней, семи дней или дольше.

В других вариантах осуществления субъектам вводят, например, подкожно или внутривенно, повторную дозу терапевтического количества iRNA, как например, дозу приблизительно

0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

или приблизительно 50 мг/кг. Схема с повторной дозой может включать введение терапевтического количества iRNA на регулярной основе, как например, через сутки, раз в трое суток, раз в четверо суток, дважды в неделю, один раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц.

Фармацевтическую композицию можно вводить путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, как например, в течение периода 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21, 22, 23, 24 или приблизительно 25 мин. Введение могут повторять, например, регулярно, как, например, раз в неделю, раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После первичной схемы лечения, обработку можно вводить менее часто. Например, после введения раз в неделю или раз в две недели в течение трех месяцев введение

можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Фармацевтическую композицию можно вводить один раз в день или иРНК можно вводить в виде двух, трех или более частей дозы через определенные интервалы на протяжении дня, или даже при помощи непрерывной инфузии, или доставки посредством состава с контролируемым высвобождением. В таком случае, количество иРНК, содержащееся в каждой части дозы, должно быть соответственно меньше, чтобы обеспечить общую суточную дозу. Единица дозирования также может быть составлена для доставки в течение нескольких дней, например, при помощи традиционного состава с замедленным высвобождением, который предусматривает замедленное высвобождение иРНК в течение периода в несколько дней. Составы с замедленным высвобождением хорошо известны в данной области и особенно удобны для доставки средств в определенный участок, как, например, таких, которые возможно применять со средствами по настоящему изобретению. В таком варианте осуществления единица дозирования содержит соответствующее кратное число суточной дозы.

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

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

Достижения в области генетики мышей обеспечили ряд мышинных моделей для изучения различных заболеваний человека, как например, нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, C3 или C9. Такие модели можно использовать для проведения *in vivo* исследований иРНК, а также для определения терапевтически эффективной дозы. Подходящие мышинные модели известны в уровне техники и включают, например, мышиную модель индуцированного коллагеном артрита (Courtenay, J.S., et al. (1980) *Nature* 283, 666-668), ишемии миокарда (Homeister J.W. and Lucchesi B.R. (1994) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:17-40), мышинные модели индуцированной овальбумином астмы (например, Tomkinson A., et al. (2001). *J. Immunol.* 166, 5792-5800), (NZBxNZW)F1, MRL/Fas^{lpr} (MRL/lpr) и мышиную модель BXSB (Theofilopoulos, A.N. и Kono, D.H. 1999. *Murine lupus models: gene-specific and genome-wide studies.* In Lahita R.G., ed., *Systemic Lupus Erythematosus*, 3rd edn, p. 145. Academic Press, San Diego, CA), мышиную модель aHUS (Goicoechea de Jorge et al. (2011) Развитие атипичного гемолитического уремического синдрома зависит от комплемента C5, *J Am Soc Nephrol* 22:137-145).

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

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

Фармацевтические композиции и составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Традиционные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. могут быть необходимы или желательны. Также можно применять покрытые презервативы, перчатки и т.п. Подходящие составы для местного применения включают те, в которых иРНК, описанные в настоящем изобретении, находятся в смеси со средством для местной доставки, таким как липиды, липосомы, жирные кислоты, сложные эфиры жирных кислот, стероиды, хелатирующие средства и поверхностно-активные вещества. Подходящие липиды и липосомы включают нейтральные (например, диолеил фосфатидилэтаноламин (DOPE), димиристоил фосфатидилхолин (DMPC), дистеароил фосфатидилхолин), отрицательные (например, димиристоил фосфатидилглицерин (DMPG)) и катионные (например, диолеилтетраметиламинопропил (DOTAP) и диолеил фосфатидилэтаноламин (DOTMA)). иРНК, описанные в настоящем изобретении, могут быть инкапсулированы в липосомах или могут образовывать комплексы с

ними, в частности с катионными липосомами. В качестве альтернативы, иРНК могут образовывать комплексы с липидами, в частности с катионными липидами. Подходящие жирные кислоты и сложные эфиры включают, без ограничения, арахидоновую кислоту, олеиновую кислоту, эйкозановую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклопентан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или C₁₋₂₀алкиловые сложные эфиры (например, изопропилмирилат (IPM)), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен в данный документ при помощи ссылки.

А. Составы с iRNA, содержащие мембранные молекулярные ансамбли.

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

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

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

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

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

Липосомы, которые являются pH-чувствительными или отрицательно-заряженными, захватывают нуклеиновые кислоты вместо образования комплекса с ними. Поскольку как нуклеиновая кислота, так и липид имеют одинаковый заряд, то происходит отталкивание вместо образования комплекса. Тем не менее, некоторая часть нуклеиновых кислот захватывается водной внутренней средой этих липосом. Липо-

сомы с pH-чувствительностью использовали для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, к монослоям клеток в культуре. Экспрессию экзогенного гена обнаруживали в целевых клетках (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Один главный тип липосомных композиций включает фосфолипиды, отличные от полученного естественным образом фосфатидилхолина. Композиции нейтральных липосом, например могут быть образованы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Композиции анионных липосом, как правило, образованы из димиристоилфосфатидилглицерина, тогда как анионные фузогенные липосомы образованы главным образом из диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомных композиций образован из фосфатидилхолина (PC), такого как, например, PC соевых бобов и PC яиц. Другой тип образован из смесей фосфолипида, и/или фосфатидилхолина, и/или холестерина.

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

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

Липосомы также включают "пространственно стабилизированные" липосомы, которые, как применяется в данном документе, означают липосомы, содержащие один или несколько специальных липидов, которые при включении в липосомы приводят к увеличению времени жизни в кровотоке по сравнению с липосомами, у которых отсутствуют такие специальные липиды. Примерами пространственно стабилизированных липосом являются те, в которых часть липидной составляющей, образующей пузырек, липосомы (A) содержит один или несколько гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид GM1, или (B) получена из одного или нескольких гидрофильных полимеров, таких как полиэтиленгликолевый (PEG) фрагмент. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, в области техники полагают, что по меньшей мере для пространственно стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или PEG-производные липиды, увеличенное время полужизни в кровотоке этих пространственно стабилизированных липосом является следствием сниженного поглощения клетками ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu et al., *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

Разнообразные липосомы, содержащие один или несколько гликолипидов, известны в данной области. Parahadjopoulos et al. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) описали способность моносиалоганглиозид GM1, сульфата галактоцереброзида и фосфатидилинозитола увеличивать время полужизни липосом в крови. Эти полученные данные были прокомментированы Gabizon et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и WO 88/04924, оба из которых принадлежат Allen и соавт., раскрыты липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид GM1 или сложные эфиры сульфата галактоцереброзида. В патенте США № 5543152 (Webb и соавт.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al.).

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

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

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

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно использовать

в комбинации с фосфолипидом с образованием пузырьков, образующих комплекс с ДНК. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Гейтерсберг, Мэриленд) представляет собой эффективное средство для доставки сильно анионных нуклеиновых кислот в клетки культуры живых тканей, которое содержит положительно заряженные DOTMA-липосомы, которые самопроизвольно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Суммарный заряд полученных комплексов является также положительным в тех случаях, когда используют липосомы с достаточным положительным зарядом. Положительно заряженные комплексы, полученные таким способом, самопроизвольно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки культуры тканей. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-3,3-(триметиламмоний)пропан ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Индианаполис, Индиана), отличается от DOTMA тем, что олеиловые фрагменты связаны сложноэфирными, а не простыми эфирными связями.

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

Другой конъюгат с катионным липидом включает полученные производные липида с холестерином ("DC-Choi"), которые были составлены в виде липосом в комбинации с DOPE (см., Gao, X. and Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Как сообщалось, липополилизин, полученный путем конъюгации полилизина с DOPE, является эффективным при трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Для определенных клеточных линий такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, известны проявлением более низкой токсичности и обеспечением более эффективной трансфекции, чем DOTMA содержащие композиции. Другие коммерчески доступные продукты с катионными липидами включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, Ла-Хойя, Калифорния) и Lipofectamine (DOSPA) (Life Technology, Inc., Гейтерсберг, Мэриленд). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

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

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

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

Другие составы, пригодные в настоящем изобретении, описаны в предварительных заявках США с серийными № 61/018616, поданной 2 января 2008 г.; 61/018611, поданной 2 января 2008 г.; 61/039748,

поданной 26 марта 2008 г.; 61/047087, поданной 22 апреля 2008 г., и 61/051528, поданной 8 мая 2008 г. В РСТ заявке № РСТ/US2007/080331, поданной 3 октября 2007 г., также описаны составы, применимые в настоящем изобретении.

Трансферсомы представляют собой еще один тип липосом и представляют собой липидные агрегаты с высокой способностью деформироваться, они являются перспективными кандидатами как средства доставки лекарственных средств. Трансферсомы могут быть описаны как липидные капельки, которые обладают настолько высокой способностью деформироваться, что они легко могут проникать через поры, меньшие, чем капельки. Трансферсомы являются приспособляющимися к окружающей среде, в которой их используют, например, они являются самооптимизирующимися (приспособляющимися к форме пор в коже), самовосстанавливающимися, зачастую достигают мишеней без разделения на фрагменты и часто могут быть самозагружающимися. Для получения трансферсом можно добавлять поверхностные пограничные активаторы, обычно поверхностно-активные вещества, к стандартной липосомной композиции. Трансферсомы использовали для доставки сывороточного альбумина в кожу. Как было показано, опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина была такой же эффективной, как подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

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

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

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

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

Четвертичные соли аммония являются наиболее применяемыми представителями данного класса.

Если молекула поверхностно-активного вещества обладает способностью нести либо положительный, либо отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируют как амфотерное.

Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламидами, N-алкилбетаины и фосфатиды. Было рассмотрено применение поверхностно-активных веществ в готовых лекарственных формах, составах и в эмульсиях (Rieger, в "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

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

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через внутрикожные мембраны, может быть получен путем смешивания водного раствора композиции с siRNA, C₈-C₂₂алкилсульфата щелочного металла и мицеллообразующих соединений. Иллюстративные мицеллообразующие соединения включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, вытяжку из ромашки, вытяжку из огурца, олеиновую кислоту, ли-

нолевуую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло первоцвета вечернего, ментол, тригидроксиоксохоланил-глицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканол-алкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Мицеллообразующие соединения можно добавлять во время или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы будут образовываться, по сути, при любом виде смешивания ингредиентов, кроме интенсивного перемешивания для получения мицелл с меньшим размером.

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

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

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

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

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

В. Липидные частицы.

иРНК, например, dsRNA по настоящему изобретению, может быть полностью инкапсулирована в липидном составе, например, LNP или другой частице нуклеиновой кислоты-липиды.

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

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

Катионный липид может представлять собой, например, хлорид N,N-диолеил-N,N-диметиламмония (DODAC), бромид N,N-дистеарил-N,N-диметиламмония (DDAB), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTAP), хлорид N-(1-(2,3-диолеилокси)пропил)-N,N,N-триметиламмония (DOTMA), N,N-диметил-2,3-диолеилоксипропиламин (DODMA), 1,2-дидиолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дидиолеилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 1,2-дидиолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-C-DAP), 1,2-дидиолеилокси-3-(диметиламино)ацетоксипропан (DLin-DAC), 1,2-дидиолеилокси-3-морфолинопропан (DLin-MA), 1,2-дидиолеилокси-3-

диметиламинопропан (DLinDAP), 1,2-дилинолеилтио-3-диметиламинопропан (DLin-S-DMA), 1-линолеил-2-линолеилокси-3-диметиламинопропан (DLin-2-DMAP), хлористую соль 1,2-дилинолеилокси-3-триметиламинопропана (DLin-TMA.Cl), хлористую соль 1,2-дилинолеил-3-триметиламинопропана (DLin-TAP.Cl), 1,2-дилинолеилокси-3-(N-метилпиперазино)пропан (DLin-MPZ) или 3-(N,N-дилинолеиламино)-1,2-пропандиол (DLinAP), 3-(N,N-диолеиламино)-1,2-пропандиол (DOAP), 1,2-дилинолеилокси-3-(2-N,N-диметиламино)этоксипропан (DLin-EG-DMA), 1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA), 2,2-дилинолеил-4-диметиламинометил-[1,3]-диоксолан (DLin-K-DMA) или его аналоги, (3aR,5s,6aS)-N,N-диметил-2,2-ди((9Z,12Z)-октадека-9,12-диенил)тетрагидро-3aH-циклопента[d][1,3] диоксол-5-амин (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанаедиил)дидодекан-2-ол (Tech G1) или их смесь. Катионный липид может содержать от приблизительно 20 мол.% до приблизительно 50 мол.% или приблизительно 40 мол.% от общего содержания липидов, присутствующих в частице.

В другом варианте осуществления можно использовать соединение 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан для получения наночастиц липид-siRNA. Синтез 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана описан в предварительной заявке на патент США номер 61/107998, поданной 23 октября 2008 г., которая включена в данный документ при помощи ссылки.

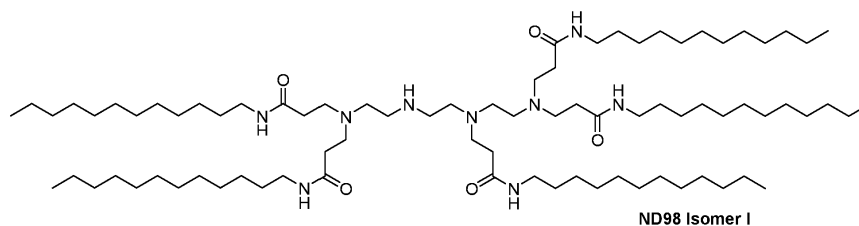
В одном варианте осуществления частицы липид-siRNA включают 40% 2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолана; 10% DSPC; 40% холестерина; 10% PEG-C-DOMG (мольный процент) с размером частиц $63,0 \pm 20$ нм и соотношением siRNA/липид 0,027.

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

Конъюгированный липид, который ингибирует агрегацию частиц, может представлять собой, например, конъюгат полиэтиленгликоль (PEG)-липид, в том числе, без ограничения, PEG-диацилглицерин (DAG), PEG-диалкилоксипропил (DAA), PEG-фосфолипид, PEG-церамид (Cer) или их смесь. Конъюгат PEG-DAA может представлять собой, например, PEG-дилаурилоксипропил (Ci2), PEG-димиристоилоксипропил (Ci4), PEG-дипальмитилоксипропил (Ci6) или PEG-дистеарилоксипропил (Ci8). Конъюгированный липид, который предупреждает агрегацию частиц, может составлять от 0 мол.% до примерно 20 мол.% или примерно 2 мол.% общего содержания липидов, присутствующих в частице.

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

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



Формула 1

Составы LNP01 описаны, например, в публикации международной заявки № WO 2008/042973, которая, таким образом, включена при помощи ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы с липидом-dsRNA описаны в табл. 1.

Таблица 1

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат PEG-липид Соотношение липид:siRNA
SNALP-1	1,2-дидиолеилокси-N,N-диметиламинопропан(DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) липид:siRNA ~ 7:1
2-ХТС	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 липид:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 липид:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, липид:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-дидиолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 липид:siRNA 10:1

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

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин;

DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин;

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

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

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

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

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

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

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

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

Синтез ионизируемых/катионных липидов.

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

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

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

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

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

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

Выражения "необязательно замещенный алкил", "необязательно замещенный алкенил", "необязательно замещенный алкинил", "необязательно замещенный ацил" и "необязательно замещенный гетероцикл" означают, что при замещении по меньшей мере один атом водорода заменяется заместителем. В случае оксо-заместителя (=O) замещаются два атома водорода. В связи с этим, заместители включают оксо-, галоген, гетероцикл, -CN, -OR_x, -NR_xR_y, -NR_xC(=O)R_y, -NR_xSO₂R_y, -C(=O)R_x, -C(=O)OR_x, -C(=O)NR_xR_y, -SO_nR_x и -SO_nNR_xR_y, где n равняется 0, 1 или 2, R_x и R_y являются одинаковыми или различными и независимо представляют собой водород, алкил или гетероцикл, и каждый из указанных за-

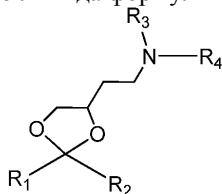
местителей алкила и гетероцикла дополнительно может быть замещен одним или несколькими из оксо, галогена, -OH, -CN, алкила, -OR_x, гетероцикла, -NR_xR_y, -NR_xC(=O)R_y, -NR_xSO₂R_y, -C(=O)R_x, -C(=O)OR_x, -C(=O)NR_xR_y, -SO_nR_x и -SO_nNR_xR_y.

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

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

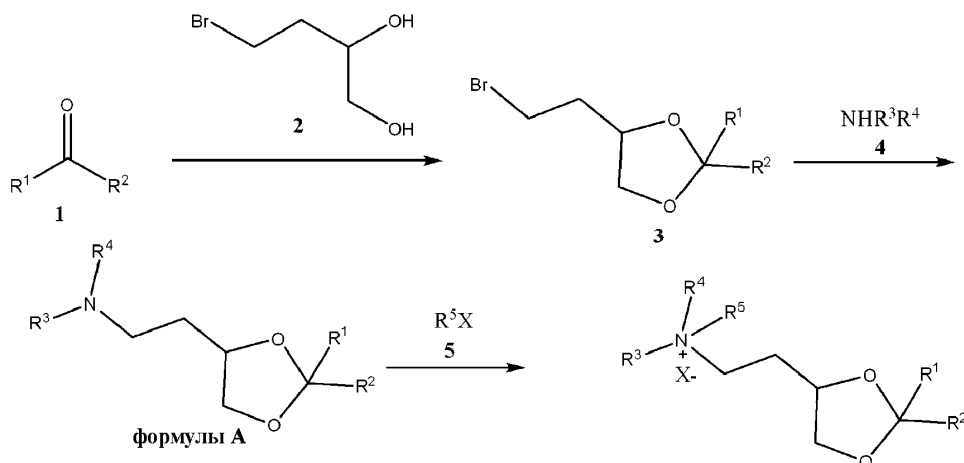
Синтез формулы А.

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



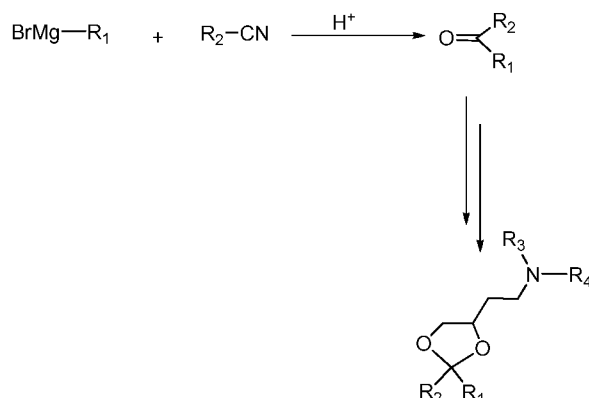
где R₁ и R₂ независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R₃ и R₄ независимо представляют собой низший алкил, или R₃ и R₄ могут, взятые вместе, образовывать необязательно замещенное гетероциклическое кольцо. В некоторых вариантах осуществления катионный липид представляет собой ХТС, (2,2-дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]-диоксолан). Как правило, липид формулы А, приведенной выше, может быть получен при помощи следующих схем реакций 1 или 2, где все заместители являются такими, как определено выше, если не указано иное.

Схема 1



Полученный по схеме 1 липид А, где R¹ и R² независимо представляют собой алкил, алкенил или алкинил, при этом каждый необязательно может быть замещен, а R³ и R⁴ независимо представляют собой низший алкил или R³ и R⁴ могут быть совмещены для образования замещенного гетероциклического кольца. Кетон 1 и бромид 2 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалисту в данной области. Реакция между 1 и 2 дает кеталь 3. Обработка кетала 3 с амином 4 дает липиды формулы А. Липиды формулы А можно превращать в соответствующую аммонийную соль при помощи органической соли формулы 5, где X представляет собой анион, противоион, выбранный из галогена, гидроксида, фосфата, сульфата или т.п.

Схема 2



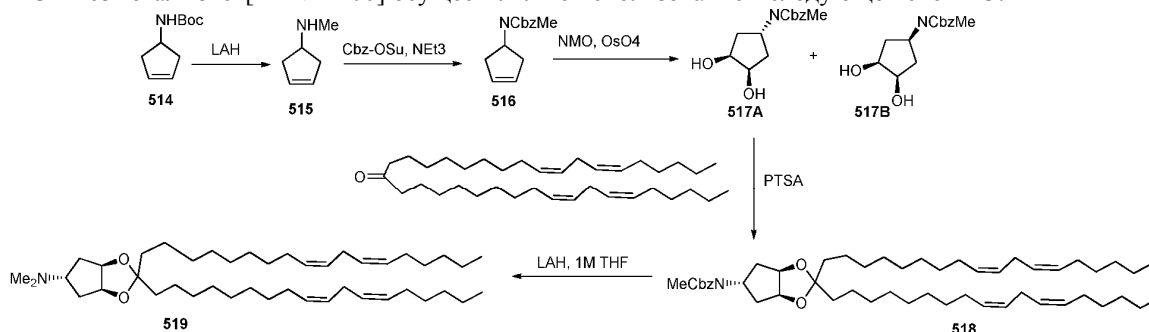
Альтернативно, исходный материал в виде кетона 1 может быть получен согласно схеме 2. Реактив Гриньяра 6 и цианид 7 могут быть приобретены или получены согласно способам, известным специалистам в данной области. Реакция между 6 и 7 дает кетон 1. Превращение кетона 1 в соответствующие липиды формулы А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

Синтез МСЗ.

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

Синтез ALNY-100.

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



Синтез 515.

К перемешиваемой суспензии LiAlH_4 (3,74 г, 0,09852 моль) в 200 мл безводного THF в двугорлой RBF (1 л) медленно добавляли раствор 514 (10 г, 0,04926 моль) в 70 мл THF при 0°C в атмосфере азота. После завершения добавления реакцию смесь нагревали до комнатной температуры и затем нагревали до появления конденсации в течение 4 ч. Течение реакции контролировали при помощи TLC. После завершения реакции (определяли при помощи TLC) смесь охлаждали до 0°C и гасили аккуратным добавлением насыщенного раствора Na_2SO_4 . Реакционную смесь перемешивали в течение 4 ч при комнатной температуре и отфильтровывали. Остаток хорошо промывали THF. Фильтрат и осадок, полученный при промывке, смешивали и разводили 400 мл диоксана и 26 мл конц. HCl, и перемешивали в течение 20 мин при комнатной температуре. Летучие вещества отгоняли в вакууме с получением хлористоводородной соли 515 в виде белого твердого вещества. Выход: 7,12 г. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 МГц): $\delta=9,34$ (широкий, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

Синтез 516.

К перемешанному раствору соединения 515 в 100 мл сухого DCM в 250 мл двугорлой RBF добавляли NEt_3 (37,2 мл, 0,2669 моль) и охлаждали до 0°C в атмосфере азота. После медленного добавления N-(бензилоксикарбонил)сукцинимид (20 г, 0,08007 моль) в 50 мл сухого DCM реакционной смеси позволяли нагреться до комнатной температуры. После завершения реакции (2-3 ч., определяли при помощи TLC) смесь промывали последовательно раствором 1н. HCl (1×100 мл) и насыщенным раствором

NaHCO₃ (1×50 мл). Органический слой затем высушивали над безводн. Na₂SO₄ и растворитель выпаривали с получением неочищенного материала, который очищали при помощи колоночной хроматографии с силикагелем с получением 516 в виде липкой массы. Выход: 11 г (89%). ¹H-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ=7,36-7,27 (m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (br., 1H), 2,74 (s, 3H), 2,60 (m, 2H), 2,30-2,25 (m, 2H). LC-MS [M+H]⁺-232,3 (96,94%).

Синтез 517A и 517B.

Циклопентен 516 (5 г, 0,02164 моль) растворяли в растворе 220 мл ацетона и воды (10:1) в одной 500 мл RBF и к нему добавляли N-метилморфолин-N-оксид (7,6 г, 0,06492 моль), за которым следовали 4,2 мл 7,6% раствора OsO₄ (0,275 г, 0,00108 моль) в трет-бутаноле при комнатной температуре. После завершения реакции (~ 3 ч.) смесь гасили при помощи добавления твердого Na₂SO₃ и полученную смесь перемешивали в течение 1,5 ч. при комнатной температуре. Реакционную смесь разводили DCM (300 мл) и промывали водой (2×100 мл), после чего следовал насыщенный раствор NaHCO₃ (1×50 мл), вода (1×30 мл) и в конце соляной раствор (1×50 мл). Органическую фазу высушивали над безводн. Na₂SO₄ и растворитель удаляли в вакууме. В результате очистки неочищенного материала при помощи колоночной хроматографии с силикагелем получали смесь диастереоизомеров, которые разделяли при помощи преп. HPLC. Выход: - 6 г неочищенного продукта.

517A - пик-1 (белое твердое вещество), 5,13 г (96%). ¹H-ЯМР (DMSO, 400 МГц): δ=7,39-7,31 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,48-4,47 (d, 2H), 3,94-3,93 (m, 2H), 2,71 (s, 3H), 1,72- 1,67 (m, 4H). LC-MS - [M+H]⁺-266,3, [M+NH₄]⁺-283,5 присутствует, HPLC-97,86%. Стереохимию подтверждали при помощи рентгенограммы.

Синтез 518.

При помощи процедуры, аналогичной описанной для синтеза соединения 505, соединение 518 (1,2 г, 41%) получали в виде бесцветного масла. ¹H-ЯМР (CDCl₃, 400 МГц): δ=7,35-7,33 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 1H), 5,37-5,27 (m, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,58-4,57 (m, 2H), 2,78-2,74 (m, 7H), 2,06-2,00 (m, 8H), 1,96-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,37-1,25 (br m, 36H), 0,87 (m, 6H). HPLC-98,65%.

Общая процедура для синтеза соединения 519.

Раствор соединения 518 (1 экв.) в гексане (15 мл) добавляли по каплям к охлажденному на льду раствору ЛАН в THF (1M, 2 экв.). После завершения добавления смесь нагревали при 40°C в течение 0,5 ч, затем опять охлаждали на ледяной бане. Смесь аккуратно гидролизуют насыщенным водным Na₂SO₄, затем фильтровали через целит и переводили в масло. С помощью колоночной хроматографии получали чистое 519 (1,3 г, 68%), которое получали в виде бесцветного масла. ¹³C NMR δ=130.2, 130.1 (×2), 127.9 (×3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (×2), 29.7, 29.6 (×2), 29.5 (×3), 29.3 (×2), 27.2 (×3), 25.6, 24.5, 23.3, 22.6, 14.1; Electrospray MS (+ve): Молекулярный вес для C₄₄H₈₀NO₂ (M+H)⁺ вычисл. 654,6, обнаруженный 654,6.

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

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

дящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящие желчные кислоты/соли желчных кислот включают хенодезоксихолевую кислоту (CDCA) и урсодезоксихоленодезоксихолевую кислоту (UDCA), холевую кислоту, дегидрохолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, глюхолевую кислоту, глихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, таурохолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящие жирные кислоты включают арахидоновую кислоту, ундекановую кислоту, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую). В некоторых вариантах осуществления используют комбинации веществ, способствующих проникновению, например жирные кислоты/соли жирных кислот в комбинации с желчными кислотами/солями желчных кислот. Одной иллюстративной комбинацией является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Дополнительные вещества, способствующие проникновению, включают полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир. dsRNA, описанные в настоящем изобретении, могут быть доставлены перорально, в форме гранул, в том числе распыляемых высушенных частиц, или образуют комплексы с образованием микро- или наночастиц. Комплексообразующие средства для dsRNA включают поли-аминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (PEG) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-производные полиимины, поллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящие комплексообразующие средства включают хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламинотетилэтилен (PTDAE), полиаминостирол (например, p-амино), поли(метилцианоакрилат), поли(этилцианоакрилат), поли(бутилцианоакрилат), поли(изобутилцианоакрилат), поли(изогексилцианоакрилат), DEAE-метакрилат, DEAE-гексилакрилат, DEAE-акриламид, DEAE-альбумин и DEAE-декстран, полиметилакрилат, полигексилакрилат, поли(D,L-молочную кислоту), сополимер DL-молочной и гликолевой кислоты (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (PEG).

Пероральные составы для dsRNA и их получение описаны подробно в патенте США № 6887906, публикации США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в данный документ при помощи ссылки.

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

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

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

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

C. Дополнительные составы.

i. Эмульсии.

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и составлены в виде эмульсий. Эмульсии, как правило, являются гетерогенными системами одной жидкости, диспергированной в другой, в форме капелек, диаметр которых обычно превышает 0.1 мкм (см., например, Ansel's Pharmaceutical

Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, L.V., Popovich N.G., and Ansel H.C., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block в Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две не смешиваемые жидкие фазы, тщательно перемешанные и диспергированные одна в другой. Как правило, эмульсии могут быть эмульсиями по типу либо "вода в масле" (w/o), либо "масло в воде" (o/w). В тех случаях, когда водная фаза является мелкораспыленной в общем объеме масляной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "вода в масле" (w/o). В качестве альтернативы, в тех случаях, когда масляная фаза является мелкораспыленной в общем объеме водной фазы и диспергированной в виде мельчайших капелек в нем, тогда полученную композицию называют эмульсией по типу "масло в воде" (o/w). Эмульсии могут содержать дополнительные компоненты вдобавок к диспергированным фазам и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора либо в водной фазе, масляной фазе либо как таковое в качестве отдельной фазы. Фармацевтические наполнители, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты, могут присутствовать в эмульсиях при необходимости. Фармацевтические эмульсии также могут представлять собой множественные эмульсии, которые состоят из более чем двух фаз, такие как, например, в случае эмульсий по типу "масло-в-воде-в-масле" (o/w/o) и "вода-в-масле-в-воде" (w/o/w). Такие сложные составы часто обеспечивают определенные преимущества, которые не обеспечивают простые двухкомпонентные эмульсии. Множественные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии o/w включают маленькие водные капельки, составляют эмульсию w/o/w. Аналогично этому система масляных капелек, заключенная в каплях воды, стабилизированных в масляной диспергирующей фазе, обеспечивает эмульсию o/w/o.

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

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

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

Большое разнообразие неэмульгирующих материалов также включают в составы эмульсий и улучшают свойства эмульсий. Они включают жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, жирные

сложные эфиры, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, в *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

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

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

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

ii. Микроэмульсии.

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

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

эмульсии имеют преимущество стабилизации водонерастворимых лекарственных средств в составе термодинамически устойчивых капелек, которые образуются самопроизвольно.

Поверхностно-активные вещества, используемые в получении микроэмульсий, включают без ограничения ионные поверхностно-активные вещества, неионные поверхностно-активные вещества, Brij 96, полиоксиэтиленолеиловые эфиры, сложные эфиры жирных кислот и полиглицерина, тетраглицерина монолаурат (ML310), тетраглицерина моноолеат (MO310), гексаглицерина моноолеат (PO310), гексаглицерина пентаолеат (PO500), декаглицерина монокапрат (MCA750), декаглицерина моноолеат (MO750), декаглицерина секвиолеат (SO750), декаглицерина декаолеат (DAO750) отдельно или в комбинации с вторичными поверхностно-активными веществами. Вторичное поверхностно-активное вещество, обычно являющееся спиртом с короткой цепью, таким как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для увеличения межфазной текучести путем проникновения в пленку из поверхностно-активного вещества и соответственно создания неупорядоченной пленки из-за пустого пространства, образующегося среди молекул поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии могут быть получены без применения вторичных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны самоэмульгирующиеся системы микроэмульсий без спирта. Водной фазой, как правило, может быть вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, PEG300, PEG400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляная фаза может включать, без ограничения, материалы, такие как Captex 300, Captex 355, Captul MCM, сложные эфиры жирных кислот, среднецепочечные (C₈-C₁₂) моно-, ди- и триглицериды, полиоксиэтилированные сложные эфиры жирных кислот и глицерила, жирные спирты, полиглицеролизированные глицериды, насыщенные полиглицеролизированные C₈-C₁₀глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

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

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

iii. Микрочастицы.

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

iv. Вещества, способствующие проникновению.

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

мембраны вещества, способствующие проникновению, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

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

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

Разнообразные жирные кислоты и их производные, которые действуют как вещества, способствующие проникновению, включают, например, олеиновую кислоту, лауриновую кислоту, каприновую кислоту (n-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, глицерин 1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины, их C₁₋₂₀алкиловые сложные эфиры (например, метиловый, изопропиловый и t-бутиловый) и их моно- и диглицериды (т.е. олеат, лаурат, капрат, миистат, пальмитат, стеарат, линолеат и т.д.) (см., например, Touitou, E., et al., *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, M.A., 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

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

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

Применяемые в данном документе нехелатирующие неповерхностно-активные соединения, способ-

ствующие проникновению, могут быть определены как соединения, которые проявляют небольшую активность в качестве хелатирующих средств или в качестве поверхностно-активных веществ, но которые тем не менее повышают абсорбцию иРНК через слизистую пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Этот класс веществ, способствующих проникновению, включает, например, ненасыщенные цикломочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазацикло-алканона (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92) и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак натрия, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Средства, которые усиливают поглощение иРНК на клеточном уровне, также можно добавлять к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al., патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (Lollo et al., заявка РСТ WO 97/30731), также, как известно, усиливают клеточное поглощение dsRNA. Примеры коммерчески доступных реагентов для трансфекции включают среди прочего, например, Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), 293fectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Cellfectin™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), DMR1E-C™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Lipofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), RNAiMAX (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Oligofectamine™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), Optifect™ (Invitrogen; Карлсбад, Калифорния), реагент для трансфекции X-tremeGENE Q2 (Roche; Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOTAP (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент для липосомной трансфекции DOSPER (Грензахерштрассе, Швейцария) или Eugene (Грензахерштрассе, Швейцария), реагент Transfectam® (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент для трансфекции TransFast™ (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-20 (Promega; Мэдисон, Висконсин), реагент Tfx™-50 (Promega; Мэдисон, Висконсин), DreamFect™ (OZ Biosciences; Марсель, Франция), EcoTransfect (OZ Biosciences; Марсель, Франция), реагент для трансфекции TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ипсвич, Массачусетс, США) LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; Сан-Диего, Калифорния, USA), реагент для трансфекции PerFectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции NeuroPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции GenePORTER 2 (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции Cytofectin (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции VaculoPORTER (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), реагент для трансфекции TroganPORTER™ (Genlantis; Сан-Диего, Калифорния, США), RiboFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), PlasFect (Bioline; Тонтон, Массачусетс, США), UniFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США), SureFECTOR (B-Bridge International; Маунтин-Вью, Калифорния, США) или HiFect™ (B-Bridge International, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

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

v. Носители.

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

vi. Наполнители.

В отличие от соединения-носителя "фармацевтический носитель" или "наполнитель" представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующее средство или любую другую фармакологически инертную среду для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Наполнитель может быть жидким или твердым веществом и его выбирают с учетом предполагаемого способа введения с тем, чтобы обеспечить необходимый объем, консистенцию и т.д., при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Ти-

пичные фармацевтические носители включают без ограничения связывающие средства (например, прежелатинизированный маисовый крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или вторичный кислый фосфат кальция и т.д.); смазывающие вещества (например, стеарат магния, тальк, кремнезем, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металла, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); разрыхлители (например, крахмал, натрия крахмалгликолат и т.д.); и смачивающие средства (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

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

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

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

vii. Другие компоненты.

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

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

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

Токсичность и терапевтическая эффективность таких соединений могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между токсичным и терапевтическим действием является терапевтическим индексом, и его можно выразить как соотношение LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительными являются соединения, которые характеризуются высоким терапевтическим индексом.

Данные, полученные при анализах клеточных культур и исследованиях на животных, можно использовать при составлении ряда доз для применения у людей. В настоящем изобретении доза композиций, описанных в данном документе, как правило, находится в диапазоне циркулирующих concentra-

ций, который включают ED_{50} с малой токсичностью или без таковой. Доза может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от применяемой лекарственной формы и используемого пути введения. Для любого соединения, применяемого в способах, описанных в настоящем изобретении, терапевтически эффективную дозу можно первоначально установить по результатам анализов клеточных культур. Доза может быть составлена для животных моделей для получения диапазона концентрации циркулирующего в плазме соединения или, при необходимости, полипептидного продукта целевой последовательности (например, достижения уменьшенной концентрации полипептида), что включает IC_{50} (т. е. концентрацию исследуемого соединения, при помощи которой достигают полумаксимальное ингибирование симптомов), как устанавливают в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения пригодной дозы у людей. Уровни в плазме можно измерять, например, при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Помимо их введения, обсуждаемого выше, iRNA, описанные в настоящем изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными средствами, эффективными при лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией CFB, C3 и/или C9. В любом случае, курирующий врач может корректировать количество и временные рамки введения иРНК, исходя из результатов, наблюдаемых при использовании стандартных средств измерения эффективности, известных в данной области или описанных в данном документе.

VII. Способы ингибирования экспрессии компонента комплемента.

Настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии компонента комплемента, который описан в данном документе. В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии CFB в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством RNAi, например, двухцепочечным средством RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии CFB в клетке, таким образом ингибируя экспрессию CFB в клетке.

Настоящим изобретением также предусматриваются способы ингибирования экспрессии C3 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством RNAi, например, двухцепочечным средством RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии C3 в клетке, таким образом ингибируя экспрессию C3 в клетке.

Кроме того, настоящим изобретением предусматриваются способы ингибирования экспрессии C9 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт со средством RNAi, например, двухцепочечным средством RNAi, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии C9 в клетке, таким образом ингибируя экспрессию C9 в клетке.

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

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

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

"Ингибирование экспрессии гена CFB" включает любой уровень ингибирования гена CFB, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена CFB. Экспрессию гена CFB можно оценить на основе уровня или изменения уровня любого переменного параметра, ассоциированного с экспрессией гена CFB, например, уровень мРНК CFB, уровень белка CFB или, например, активность CH_{50} в качестве меры общего гемолитического комплемента, AH_{50} для измерения гемолитической активности альтернативного пути комплемента, и/или уровни лактат-дегидрогеназы (LDH) в качестве меры внутрисосудистого гемолиза, и/или уровни гемоглобина. Также можно измерять уровни C3, C9, C5, C5a, C5b и растворимого комплекса C5b-9 для оценки экспрессии CFB. Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например, исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

Подразумевают, что фраза "ингибирование экспрессии C3" означает ингибирование экспрессии любого гена C3 (такого как, например, ген C3 мыши, ген C3 крысы, ген C3 обезьяны или ген C3 человека), а также вариантов или мутантов гена C3. Таким образом, ген C3 может быть геном C3 дикого типа, мутантным геном C3 или трансгенным геном C3 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена C3" включает любой уровень ингибирования гена C3, например, по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена C3. Экспрессию гена C3 можно оценить на основе уровня или изменения уровня любого переменного параметра, ассоциированного с экспрессией гена C3, например, уровень мРНК C3, уровень белка C3 или, например, активность CH_{50} в качестве меры общего гемолитического комплемента, AH_{50} для измерения гемолитической активности альтернативного пути комплемента, и/или уровни лактат-дегидрогеназы (LDH) в качестве меры внутрисосудистого гемолиза, и/или уровни гемоглобина. Также можно измерять уровни CFB, C9, C5, C5a, C5b и растворимого комплекса C5b-9 для оценки экспрессии C3. Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютноного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например, исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

Подразумевают, что фраза "ингибирование экспрессии C9" означает ингибирование экспрессии любого гена C9 (такого как, например, ген C9 мыши, ген C9 крысы, ген C9 обезьяны или ген C9 человека), а также вариантов или мутантов гена C9. Таким образом, ген C9 может быть геном C9 дикого типа, мутантным геном C9 или трансгенным геном C9 в контексте клеток, группы клеток или организма, подвергнутых генетической манипуляции.

"Ингибирование экспрессии гена C9" включает любой уровень ингибирования гена C9, например по меньшей мере частичную супрессию экспрессии гена C9. Экспрессию гена C9 можно оценить на основе уровня или изменения уровня любого переменного параметра, ассоциированного с экспрессией гена C9, например, уровень мРНК C9, уровень белка C9 или, например, активность CH_{50} в качестве меры общего гемолитического комплемента, AH_{50} для измерения гемолитической активности альтернативного пути комплемента, и/или уровни лактат-дегидрогеназы (LDH) в качестве меры внутрисосудистого гемолиза, и/или уровни гемоглобина. Также можно измерять уровни CFB, C3, C5, C5a, C5b и растворимого комплекса C5b-9 для оценки экспрессии C9. Ингибирование можно оценивать по снижению абсолютноного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольным уровнем может быть любой тип контрольного уровня, который используют в области техники, например, исходный уровень до введения препарата или уровень, определенный у подобного субъекта, клетки или образца, которые не обработаны или обработаны контролем (таким как, например, контроль только с буфером или контроль с неактивным средством).

В некоторых вариантах осуществления способов согласно настоящему изобретению экспрессия целевого гена, например, гена CFB, C3 или C9, ингибируется по меньшей мере на приблизительно 5%, по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 15%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 25%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 35%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 45%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 55%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 65%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 75%, по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 91%, по меньшей мере на приблизительно 92%, по меньшей мере на приблизительно 93%, по меньшей мере на приблизительно 94%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%.

Доказательством ингибирования экспрессии целевого гена, например, гена CFB, C3 или C9, может служить снижение количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или первой группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), в которых транскрибируется целевой ген и которую или которые обрабатывали (например, посредством приведения клетки или клеток в контакт со средством RNAi согласно настоящему изобретению или посредством введения средства RNAi согласно настоящему изобретению субъекту, в организме которого клетки находятся или находились) таким образом, что экспрессия целевого гена ингибируется по сравнению со второй клеткой или второй группой клеток, практически идентичных первой клетке или группе клеток, но которую или которые не обрабатывали (контрольная(ые) клетка(и)). В предпочтительных вариантах осуществления ингибирование оценивают посредством выражения уровня мРНК в обработанных клетках как процент от уровня мРНК в контрольных клетках с помощью следующей формулы:

$$\frac{(\text{mRNA контрольных клеток} - \text{mRNA обработанных клеток})}{\text{mRNA контрольных клеток}} \cdot 100\%$$

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

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

Уровень мРНК CFB, C3 или C9, которая экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определять при помощи любого способа, известного в данной области техники для оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии CFB, C3 и/или C9 в образце определяют путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, мРНК гена CFB, C3 и/или C9. РНК можно извлекать из клеток при помощи методик извлечения РНК, включая, например, извлечение с помощью кислого фенола/гуанидинизоцианата (RNAzol B; Biogenesis), наборы для получения РНК RNeasy (Qiagen) или PAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновых кислот, включают ядерные "run-on" анализы, RT-PCR, анализы защиты от РНКаз (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), нозерн-блоттинг, гибридизацию in situ и микроматричные анализы.

В одном варианте осуществления уровень экспрессии CFB, C3 и/или C9 определяют при помощи зонда для нуклеиновой кислоты. Выражение "зонд", используемое в данном документе, означает любую молекулу, которая способна селективно связываться со специфическим CFB, C3 или C9. Зонды могут быть синтезированы специалистом в данной области техники или получены из соответствующих биологических препаратов. Могут быть особым образом сконструированы зонды, содержащие метку. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, без ограничения, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенные мРНК можно использовать при анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают, без ограничения, анализы, представляющие собой саузерн- или нозерн-блоттинг, анализы, представляющие собой полимеразную цепную реакцию (PCR), и матрицы с зондами. Один способ определения уровней мРНК включает приведение в контакт выделенной мРНК с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться, например, специфически гибридизоваться с мРНК CFB, C3 или C9. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем пропускания выделенной мРНК через агарозный гель и переноса мРНК из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности и мРНК приводят в контакт с зондом(ами), например, на генном микрочипе Affymetrix. Специалист в данной области может легко адаптировать известные способы выявления мРНК для применения при определении уровней мРНК CFB, C3 и/или C9.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии CFB, C3 и/или C9 в образце включает способ амплификации нуклеиновой кислоты и/или обратной транскрипции (с получением кДНК), например мРНК, в образце, например, с помощью RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления, изложенный в Mullis, 1987, патент США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательности (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), системы транскрипционной амплификации (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), репликазы Q-бета (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033), или любой другой способ амплификации нуклеиновой кислоты, за которым следует обнаружение амплифицированных молекул при помощи методик, хорошо известных специалисту в данной области. Такие схемы обнаружения особенно пригодны для обнаружения молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень малых количествах. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии CFB, C3 и/или C9 определяют с помощью количественной флюорогенной RT-PCR (т.е. системы TaqMan™).

Уровни экспрессии мРНК CFB, C3 и/или C9 можно контролировать при помощи мембранного бота (как например, используемого при анализе гибридизации, такого как нозерн, саузерн, дот и т.п.) или микролунок, опытных пробирок, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанную нуклеиновую кислоту). См. патенты США № 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ при помощи ссылки. Определение уровня экспрессии PCSK9 также может включать использование зондов для нуклеиновой кислоты в растворе.

В предпочтительных вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с примени-

ем анализов с разветвленной ДНК (bdNA) или PCR в режиме реального времени (qPCR). Применение таких способов описано и проиллюстрировано в разделе "Примеры", представленном в данном документе.

Уровень экспрессии белка CFB, C3 и/или C9 можно определить, используя любой способ, известный в данной области для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлюоресцентные анализы, электрохемилюминисцентные анализы и т.п.

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

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению средство RNAi вводят субъекту так, что средство RNAi доставляется к конкретному месту в организме субъекта. Ингибирование экспрессии CFB, C3 и/или C9 можно оценивать при помощи измерений уровня или изменения уровня мРНК CFB, C3, и/или C9 и/или белка CFB, C3 и/или C9 в образце, полученном из жидкости или ткани из конкретного места в организме субъекта. В предпочтительных вариантах осуществления местом является печень. Местом также может быть подсекция или подгруппа клеток из любого из указанных выше мест. Место также может включать клетки, которые экспрессируют конкретный тип рецептора.

VIII. Способы лечения или предупреждения заболевания, связанного с компонентом комплемента.

Настоящим изобретением предусматриваются терапевтические и профилактические способы, которые включают введение субъекту с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, которое описано в данном документе, например PNH или aHUS, средства на основе iRNA, фармацевтических композиций, содержащих средство на основе iRNA, или вектора, содержащего iRNA согласно настоящему изобретению.

Следует понимать, что любые из способов согласно настоящему изобретению можно практически осуществлять с использованием одного средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению или комбинации средств на основе iRNA согласно настоящему изобретению. Например, в некоторых аспектах способы (и применения) согласно настоящему изобретению включают применение средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген CFB, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген C3. В некоторых аспектах способы (и применения) согласно настоящему изобретению включают применение средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген CFB, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген C9. В некоторых аспектах способы (и применения) согласно настоящему изобретению включают применение средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген C3, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген C9. В других аспектах способы (и применения) согласно настоящему изобретению включают применение средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген CFB, средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген C3, и средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген C9. В некоторых аспектах настоящего изобретения способы, которые включают либо одно средство на основе iRNA согласно настоящему изобретению, либо комбинацию средств для iRNA, дополнительно включают введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических средств, таких как, например, Soliris® (который дополнительно описан ниже).

В одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, например, с "заболеванием, связанным с компонентом комплемента", например PNH, aHUS или ревматоидный артрит. Способы лечения (и применения) согласно настоящему изобретению включают введение субъекту, например человеку, терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на ген CFB, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген CFB, таким образом осуществляя лечение субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C3, например, с "заболеванием, связанным с компонентом комплемента", например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматривается применение средства на основе iRNA, например dsRNA, согласно настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген C3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген C3, в производстве лекарственного препарата для лечения субъекта, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C3, такого как субъект с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C3, например с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В еще одном дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматривается применение средства на основе iRNA, например dsRNA, согласно настоящему изобретению, целенаправленно воздействующего на ген C9, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген C9, в производстве лекарственного препарата для лечения субъекта, например, субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C9, такого как субъект с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C9, например с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения iRNA, например dsRNA, согласно настоящему изобретению для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии CFB, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения iRNA, например dsRNA, согласно настоящему изобретению для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C3, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например, PNH aHUS или ревматоидный артрит.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения iRNA, например dsRNA, согласно настоящему изобретению для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C9, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии CFB, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C3, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C9, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В некоторых аспектах настоящего изобретения способы, которые включают либо одно средство на основе iRNA согласно настоящему изобретению, либо комбинацию средств для iRNA, дополнительно включают введение субъекту одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген C5, как, например, описанные в предварительной заявке на патент США № 61/782531, поданной 14 марта 2013 года, в предварительной заявке на патент США № 61/8373991, поданной 20 июня 2013 года, и в предварительной заявке на патент США № 61/904579, поданной 15 ноября 2013 года, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

В других аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб). Экулизумаб представляет собой гуманизированный моноклональный IgG2/4, легкую каппа-цепь антитела, который специфически связывается с компонентом комплемента C5 с высокой аффинностью и ингибирует расщепление C5 до C5a и C5b, тем самым ингибируя образование конечного комплекса комплемента C5b-9. Экулизумаб описан в патенте США № 6355245, полное содержание которого включено в данный доку-

мент посредством ссылки.

В дополнительных других аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой пептид-ингибитор C3 или его аналоги. В одном варианте осуществления пептид-ингибитор C3 представляет собой компстатин. Компстатин представляет собой циклический тридекапептид с сильной и селективной C3-ингибирующей активностью. Компстатин и его аналоги описаны в патентах США № 7888323, 7989589 и 8442776, в патентных публикациях США 2012/0178694 и 2013/0053302 и в PCT публикациях № WO 2012/174055, WO 2012/2178083, WO 2013/036778, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, в одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, например, с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит, которые включают введение субъекту, например человеку, терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на CFB, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген CFB, и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), таким образом осуществляя лечение субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C3, например, с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит, которые включают введение субъекту, например человеку, терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на C3, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген C3, и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), таким образом осуществляя лечение субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C3.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы лечения субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C9, например с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит, которые включают введение субъекту, например человеку, терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, целенаправленно воздействующего на C9, или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на ген C9, и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), таким образом осуществляя лечение субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C9.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, например, с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, например dsRNA, или вектора согласно настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или C3 пептид-ингибитор (например, компстатин), таким образом предупреждая по меньшей мере один симптом у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C3, например с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества средства на основе iRNA, например dsRNA, или вектора согласно настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или C3 пептид-ингибитор (например, компстатин), таким образом предупреждая по меньшей мере один симптом у субъекта с нарушением, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии C3.

В другом аспекте настоящим изобретением предусматриваются способы предупреждения по мень-

ства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии CFB, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения средства на основе iRNA, например dsRNA, согласно настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C3, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В еще одном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения средства на основе iRNA, например dsRNA, согласно настоящему изобретению и дополнительного терапевтического средства, такого как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C9, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для применения в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии CFB, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для применения в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C3, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В дополнительном аспекте настоящим изобретением предусматриваются применения средства на основе iRNA согласно настоящему изобретению в производстве лекарственного препарата для применения в комбинации с дополнительным терапевтическим средством, таким как антитело к компоненту комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб), средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на компонент комплемента C5, и/или пептид-ингибитор C3 (например, компстатин), для предупреждения по меньшей мере одного симптома у субъекта, страдающего от нарушения, на которое будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии C9, такого как заболевание, связанное с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит.

В одном варианте осуществления средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на CFB, C3 или C9, вводят субъекту с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, которое описано в данном документе, таким образом, чтобы уровни CFB, C3 и/или C9, например, в клетке, ткани, крови, моче или другой ткани или жидкости субъекта, снижались по меньшей мере на приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере на приблизительно 99% или более, а затем субъекту вводят дополнительное терапевтическое средство.

Дополнительное терапевтическое средство может быть антителом к компоненту комплемента C5, или его антигенсвязывающим фрагментом, или его производным. В одном варианте осуществления антитело к компоненту комплемента C5 представляет собой экулизумаб (SOLIRIS®), или его антигенсвязывающий фрагмент, или его производное.

Способы по настоящему изобретению, включающие введение субъекту средства, представляющего собой иРНК, по настоящему изобретению и экулизумаба, могут дополнительно содержать введение субъекту менингококковой вакцины.

Дополнительное терапевтическое средство, например, экулизумаб и/или менингококковую вакцину, можно вводить субъекту одновременно со средством на основе iRNA, целенаправленно воздействующим на CFB, C3, и/или C9 (и/или C5), или в разное время.

Более того, дополнительное терапевтическое средство, например экулизумаб, можно вводить субъекту в том же составе, что и средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее на CFB, C3 и/или C9 (и/или C5), или в разных составах со средством на основе iRNA, целенаправленно воздействующим на CFB, C3 и/или C9 (и/или C5).

Схема приема экулизумаба описана, например, в инструкции на продукт экулизумаб (SOLIRIS®) и в заявке на патент США № 2012/0225056, полное содержание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. В иллюстративных способах согласно настоящему изобретению для лечения заболевания, связанного с компонентом комплемента, например, PNH, aHUS или ревматоидный артрит, средство на основе iRNA, целенаправленно воздействующее, например, на CFB, C3 или C9, вводят (например, подкожно) субъекту первым таким образом, чтобы уровни C5 у субъекта снижались (например, по меньшей мере на приблизительно 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере приблизительно на 99% или более), а затем вводят экулизумаб в более низких дозах, чем описанные в листке-вкладыше для SOLIRIS®. Например, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг приблизительно каждые две недели после этого. Экулизумаб также можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через приблизительно одну неделю менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого. Если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг в течение 4 недель с последующей пятой дозой через одну неделю в дозе менее чем приблизительно 1200 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 1200 мг приблизительно каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 900 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 900 мг каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 2 недель с последующей третьей дозой приблизительно через одну неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 600 мг приблизительно каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту в раз неделю в дозе менее чем приблизительно 600 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого; или если субъект младше 18 лет, экулизумаб можно вводить субъекту раз в неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг в течение 1 недели с последующей второй дозой через приблизительно одну неделю в дозе менее чем приблизительно 300 мг, а затем в дозе менее чем приблизительно 300 мг приблизительно каждые две недели после этого. Если объекту проводят плазмоферез или замещение плазмы, экулизумаб можно вводить субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 300 мг) или меньше, чем приблизительно 600 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 600 мг или более). Если объекту проводят инфузию плазмы, экулизумаб можно вводить субъекту в дозе менее чем приблизительно 300 мг (например, если последняя доза экулизумаба составила приблизительно 300 мг или более). Более низкие дозы экулизумаба можно вводить либо подкожно, или внутривенно.

При комбинированной терапии по настоящему изобретению, включающей экулизумаб, экулизумаб можно вводить субъекту, например, подкожно в дозе от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, или от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг, или от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг. Например, экулизумаб можно вводить субъекту, например, подкожно в дозе 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 мг/кг, в дозе 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5 или 15 мг/кг.

Способы и применения согласно настоящему изобретению включают введение композиции, описанной в данном документе, таким образом, чтобы экспрессия целевого гена CFB, C3 и/или C9 (и/или C5) снижалась, как например, снижалась в течение приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 или приблизительно 80 ч. В одном варианте осуществления экспрессия целевого гена снижается в течение более длительного периода времени, например, по мень-

шей мере приблизительно двух, трех, четырех, пяти, шести, семи суток или более, например, в течение приблизительно одной недели, двух недель, трех недель или приблизительно четырех недель или дольше.

Введение dsRNA в соответствии со способами и применениями согласно настоящему изобретению может приводить в результате к снижению тяжести, ослаблению выраженности признаков, симптомов и/или маркеров таких заболеваний или нарушений у пациента с заболеванием, связанным с компонентом комплемента. "Снижение" в данном контексте подразумевает статистически значимое снижение такого уровня. Снижение может произойти, например, на по меньшей мере приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или приблизительно 100%.

Эффективность лечения или предотвращения заболевания можно оценить, например, путем определения прогрессирования заболевания, ремиссии, тяжести симптомов, уменьшения боли, качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимого для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеряемого параметра, подходящего для данного заболевания, подвергнутого лечению или нацеленного на его предотвращение. Вполне в пределах способности специалиста в данной области техники контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения гемолитического нарушения можно оценить, например, с помощью периодического контроля уровней LDH и CH₅₀. Сравнение поздних показаний с начальными показаниями обеспечивает врача показаниями, является ли лечение эффективным. Вполне в пределах способности специалиста в данной области техники контролировать эффективность лечения или профилактики путем измерения любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Применительно к введению iRNA, целенаправленно воздействующей на CFB, C3 и/или C9, или фармацевтической композиции с ней, "эффективность в отношении" заболевания, связанного с компонентом комплемента, указывает на то, что введение клинически приемлемым способом приводит в результате к благоприятному эффекту по меньшей мере у статистически значимой доли пациентов, такому как улучшение симптомов, излечение, ослабление заболевания, продление жизни, улучшение качества жизни или другой эффект, обычно считающийся положительным врачом, знакомым с лечением заболевания, связанного с компонентом комплемента, и связанными вопросами.

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

Кроме того, эффективность может быть оценена при уменьшении тяжести заболевания, что определяется специалистом в данной области диагностики, основываясь на клинически принятой шкале оценки тяжести заболевания, как один из примеров шкала интенсивности боли при ревматоидном артрите (RASS). Любое позитивное изменение, приводящее, например, к уменьшению тяжести заболевания, оцениваемому с использованием соответствующего масштаба, представляет адекватное лечение с применением iPHK или состава, представляющего собой iPHK, как описано в данном документе.

Субъекту можно вводить терапевтическое количество iPHK, например, приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 мг/кг dsRNA, 2,6 мг/кг dsRNA, 2,7 мг/кг dsRNA, 2,8 мг/кг dsRNA, 2,9 мг/кг dsRNA, 3,0 мг/кг dsRNA, 3,1 мг/кг dsRNA, 3,2 мг/кг dsRNA, 3,3 мг/кг dsRNA, 3,4 мг/кг dsRNA, 3,5 мг/кг dsRNA, 3,6 мг/кг dsRNA, 3,7 мг/кг dsRNA, 3,8 мг/кг dsRNA, 3,9 мг/кг dsRNA, 4,0 мг/кг dsRNA, 4,1 мг/кг dsRNA, 4,2 мг/кг dsRNA, 4,3 мг/кг dsRNA, 4,4 мг/кг dsRNA, 4,5 мг/кг dsRNA, 4,6 мг/кг dsRNA, 4,7 мг/кг dsRNA, 4,8 мг/кг dsRNA, 4,9 мг/кг dsRNA, 5,0 мг/кг dsRNA, 5,1 мг/кг dsRNA, 5,2 мг/кг dsRNA, 5,3 мг/кг dsRNA, 5,4 мг/кг dsRNA, 5,5 мг/кг dsRNA, 5,6 мг/кг dsRNA, 5,7 мг/кг dsRNA, 5,8 мг/кг dsRNA, 5,9 мг/кг dsRNA, 6,0 мг/кг dsRNA, 6,1 мг/кг dsRNA, 6,2 мг/кг dsRNA, 6,3 мг/кг dsRNA, 6,4 мг/кг dsRNA, 6,5 мг/кг dsRNA, 6,6 мг/кг dsRNA, 6,7 мг/кг dsRNA, 6,8 мг/кг dsRNA, 6,9 мг/кг dsRNA, 7,0 мг/кг dsRNA, 7,1 мг/кг dsRNA, 7,2 мг/кг dsRNA, 7,3 мг/кг dsRNA, 7,4 мг/кг dsRNA, 7,5 мг/кг dsRNA, 7,6 мг/кг dsRNA, 7,7 мг/кг dsRNA, 7,8 мг/кг dsRNA, 7,9 мг/кг dsRNA, 8,0 мг/кг dsRNA, 8,1 мг/кг dsRNA, 8,2 мг/кг dsRNA, 8,3 мг/кг dsRNA, 8,4 мг/кг dsRNA, 8,5 мг/кг dsRNA, 8,6 мг/кг dsRNA, 8,7 мг/кг dsRNA, 8,8 мг/кг dsRNA, 8,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 9,1 мг/кг dsRNA, 9,2 мг/кг dsRNA, 9,3 мг/кг dsRNA, 9,4 мг/кг dsRNA, 9,5 мг/кг dsRNA, 9,6 мг/кг dsRNA, 9,7 мг/кг dsRNA, 9,8 мг/кг dsRNA, 9,9 мг/кг dsRNA, 9,0 мг/кг dsRNA, 10 мг/кг dsRNA, 15 мг/кг dsRNA, 20 мг/кг dsRNA, 25 мг/кг dsRNA, 30 мг/кг dsRNA, 35 мг/кг dsRNA, 40 мг/кг dsRNA, 45 мг/кг dsRNA или приблизительно 50 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как

близительно 35 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 40 до приблизительно 45 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 30 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 35 до приблизительно 40 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 15 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг, приблизительно 20 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 25 до приблизительно 30 мг/кг, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,25 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 0,75 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 1,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 2,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 3,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 4,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 7,5 до приблизительно 20 мг/кг, от приблизительно 10 до приблизительно 20 мг/кг или от приблизительно 15 до приблизительно 20 мг/кг. В одном варианте осуществления, где композиция по настоящему изобретению содержит dsRNA, как описано в данном документе, и N-ацетилгалактозамин, субъекту можно вводить терапевтическое количество от приблизительно 10 до приблизительно 30 мг/кг dsRNA. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также подразумеваются как часть настоящего изобретения.

Например, субъектам можно вводить терапевтическое количество iRNA, такое как приблизительно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3,

1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49

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

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения, например, когда двухпочечное средство RNAi включает модификацию (например, один или несколько мотивов из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов), включающую один такой мотив в сайте расщепления средства или рядом с ним, шесть фосфоротиоатных связей и лиганд, такое средство вводят в дозе от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,01 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,02 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до

приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,02 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,03 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,03 мг/кг до приблизительно 0,05 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,04 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг, от приблизительно 0,04 мг/кг до приблизительно 0,06 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,5 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,4 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,3 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,2 мг/кг, от приблизительно 0,05 до приблизительно 0,1 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,09 мг/кг, от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,08 мг/кг или от приблизительно 0,05 мг/кг до приблизительно 0,07 мг/кг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к вышеупомянутым значениям, также являются частью настоящего изобретения, например, средство для RNAi можно вводить субъекту в дозе от приблизительно 0,015 мг/кг до приблизительно 0,45 мг/кг.

Например, средство для RNAi, например, средство для RNAi в фармацевтической композиции, можно вводить в дозе приблизительно 0,01, 0,0125, 0,015, 0,0175, 0,02, 0,0225, 0,025, 0,0275, 0,03, 0,0325, 0,035, 0,0375, 0,04, 0,0425, 0,045, 0,0475, 0,05, 0,0525, 0,055, 0,0575, 0,06, 0,0625, 0,065, 0,0675, 0,07, 0,0725, 0,075, 0,0775, 0,08, 0,0825, 0,085, 0,0875, 0,09, 0,0925, 0,095, 0,0975, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475 мг/кг или приблизительно 0,5 мг/кг. Значения, промежуточные по отношению к перечисленным значениям, также являются частью настоящего изобретения.

иРНК может быть введена путем внутривенной инфузии в течение некоторого периода времени, например, в течение 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или примерно 25-минутного периода. Введение могут повторять, например, регулярно, как, например, раз в неделю, раз в две недели (т. е. каждые две недели) в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев или дольше. После первичного режима обработки обработки можно вводить менее часто. Например, после введения раз в неделю или раз в две недели в течение трех месяцев введение можно повторять один раз в месяц в течение шести месяцев, или года, или дольше.

Введение iRNA может снижать уровни CFB, C3 и/или C9 (и/или C5), например, в клетке, ткани, крови, моче или другой части организма пациента, по меньшей мере на приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере приблизительно 99% или более.

Перед введением полной дозы иРНК пациентам можно вводить меньшую дозу, как, например, 5% инфузию и наблюдать их в отношении отрицательного действия, как, например, аллергических реакций. В другом примере пациента можно наблюдать в отношении нежелательного иммуностимулирующего действия, как, например, повышения уровней цитокина (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Благодаря ингибирующим эффектам в отношении экспрессии CFB, C3 и/или C9 композиция согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, полученная из нее, могут повышать качество жизни.

иРНК по настоящему изобретению можно вводить в "голой" форме или в виде "свободной иРНК". Голую иРНК вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Голая иРНК может быть в подходящем буферном растворе. Буферный раствор может содержать ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию. В одном варианте осуществления буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). pH и осмолярность буферного раствора иРНК можно корректировать, с тем чтобы он подходил для введения субъекту.

Альтернативно, иРНК по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, например, в составе липосомной dsRNA.

Субъекты, на которых будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена CFB, C3 и/или C9, представляют собой таковых с заболеванием или нарушением, связанным с компонентом комплемента, которое описано в данном документе. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH). В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет астму. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет ревматоидный артрит. В еще одном варианте осуществления

субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет системную красную волчанку. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет гломерулонефрит. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет псориаз. В еще одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет дерматомиозит с буллезным пемфигоидом. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет атипичный гемолитико-уремический синдром. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет гемолитико-уремический синдром, связанный с Шига-подобным токсином *E. coli*. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет миастению гравис. В еще одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет оптиконевромиелит. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет болезнь плотного осадка. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет С3 неврпатию. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет связанную с возрастом дегенерацию желтого пятна. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет болезнь Холодовых агглютининов. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет васкулит, связанный с антителами к цитоплазме нейтрофилов. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет реакцию отторжения трансплантата, вызванную гуморальным и сосудистым механизмами. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет дисфункцию трансплантата. В одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имел инфаркт миокарда. В другом варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, является сенсibilизированным реципиентом трансплантата. В еще одном варианте осуществления субъект с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, имеет сепсис.

Лечение субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии гена CFB, С3 и/или С9, включает терапевтическое и профилактическое лечение (например, субъект должен подвергнуться хирургическому лечению с трансплантацией, предусматривающей сенсibilизацию (или аллогенной трансплантации)).

Настоящим изобретением дополнительно предусматриваются способы и применения средства на основе iRNA или фармацевтической композиции с ним (в том числе способы и применения средства на основе iRNA или фармацевтической композиции, содержащей средство на основе iRNA и дополнительное терапевтическое средство, например, антитело к компоненту комплемента С5 или его антигенсвязывающий фрагмент) для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение и/или ингибирование экспрессии целевого гена согласно настоящему изобретению, например CFB, С3 и С9, например субъекта с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, в комбинации с другими фармацевтическими средствами и/или другими терапевтическими способами, например, с известными фармацевтическими средствами и/или известными терапевтическими способами, такими как, например, используемые в настоящее время для лечения этих нарушений. Например, в определенных вариантах осуществления iRNA, целенаправленно воздействующую на CFB, вводят в комбинации, например, со средством, полезным при лечении заболевания, связанного с компонентом комплемента, которое описано в других местах в данном документе.

Например, дополнительные терапевтические средства и терапевтические способы, подходящие для лечения субъекта, на которого будет оказывать благоприятное воздействие снижение экспрессии CFB, С3 и/или С9, например субъекта с заболеванием, связанным с компонентом комплемента, включают следующие: плазмаферез, тромболитическая терапия (например, стрептокиназа), антитромбоцитарные средства, фолиевая кислота, кортикостероиды; иммунодепрессивные средства; эстрогены, метотрексат, 6-МР, азатиоприн, сульфасалазин, месалазин, олсалазин, хлорохин/гидрохлорохин, пеницилламин, ауротиомалат (внутримышечный и пероральный), азатиоприн, колхицин, кортикостероиды (пероральные, ингаляционные и местная инъекция), агонисты бета-2-адренорецепторов (сальбутамол, тербуталин, сальметераль), ксантины (теофиллин, аминофиллин), кромогликат, недокромил, кетотифен, ипратропий и окситропий, циклоспорин, FK506, рапамицин, микофенолата мофетил, лефлуномид, NSAID, например, ибупрофен, кортикостероиды, такие как преднизолон, ингибиторы фосфодиэстеразы, аденозиновые агонисты, антитромботические средства, ингибиторы комплемента, адренергические средства, средства, которые препятствуют передаче сигнала провоспалительными цитокинами, такими как TNF- α или IL-1 (например, ингибиторы киназ IRAK, NIK, IKK, p38 или MAP-киназы), ингибиторы IL-1 β -превращающего фермента, ингибиторы TNF α -превращающего фермента (TACE), ингибиторы передачи сигнала в Т-клетках, такие как ингибиторы киназ, ингибиторы металлопротеиназы, сульфасалазин, азатиоприн, 6-меркаптопурины, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, растворимые цитокиновые рецепторы и их производные (например, растворимые p55 или p75 TNF-рецепторы и производные p75TNFRlgG (Enbrel™ и p55TNFRlgG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII и sIL-6R), противовоспалительные

цитокины (например, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 и TGF β), цефекоксиб, фолиевая кислота, гидроксихлорохина сульфат, рофекоксиб, этанерцепт, инфликсимоноклональное антитело, напроксен, вальдекоксиб, сульфасалазин, метилпреднизолон, мелоксикам, метилпреднизолон ацетат, золота-натрия тиомалат, аспирин, триамцинолона ацетонид, пропоксифена напсилат/ацетоаминофен, фолат, набуметон, диклофенак, пироксикам, этодолак, диклофенак натрия, оксапрозин, оксикодона гидрохлорид, гидрокодона бигартрат/ацетоаминофен, диклофенак натрия/мизопростол, фентанил, анакинра, человеческие рекомбинантные молекулы, трамадола гидрохлорид, салсалат, сулиндак, цианокобаламин/фолиевая кислота/пиридоксин, ацетаминофен, алендронат натрия, преднизолон, морфина сульфат, лидокаина гидрохлорид, индометацин, глюкозамина сульфат/хондроитин, амитриптилина гидрохлорид, сульфадиазин, оксикодона гидрохлорид/ацетаминофен, олопатадина гидрохлорид, мизопростол, напроксен натрия, омепразол, циклофосфамид, ритуксимоноклональное антитело, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, антитело к IL-18, антитело к IL5, VIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, рофлумиласт, IC-485, CDC-801, мезопрам, циклоспорин, цитокин-супрессирующее противовоспалительное лекарственное средство(средства) (CSAID); CDP-571/BAY-10-3356 (гуманизированное антитело к TNF α ; Celltech/Bayer); сA2/инфликсимоноклональное антитело (химерное антитело к TNF α ; Centocor); 75 kdTNFR-IgG/этанерцепт (белок слияния 75 КДа TNF-рецептора и IgG; Immunex; см., например, (1994) *Arthr. Rheum.* 37: S295; (1996) *J. Invest. Med.* 44: 235A); 55 кД TNF-IgG (55 кД рецептор TNF-IgG слитый белок Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (не осуществляющее деплецию приматизированное антитело к CD4; IDEC/SmithKline; см., например, (1995) *Arthr. Rheum.* 38: S185); DAB 486-IL-2 и/или DAB 389-IL-2 (IL-2 слитые белки; Seragen; см., например, (1993) *Arthrit. Rheum.* 36: 1223); антитело к Tac (гуманизированное антитело к IL-2R α ; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (противовоспалительный цитокин; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; рекомбинантный IL-10, противовоспалительный цитокин; DNAX/Schering); IL-4; IL-10 и/или IL-4 агонисты (например, антитела агонистов); IL-1RA (антагонист IL-1-рецептора; Synergen/Amgen); анакинра (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (растворимый TNF-связывающий белок; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S284; (1995) *Amer. J. Physiol. - Heart and Circ. Physiol.* 268: 37-42); R973401 (ингибитор фосфодиэстеразы тип IV; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S282); МК-966 (COX-2-ингибитор; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S81); илопрост (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S82); метотрексат; талидомид (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S282) и талидомид-связанные лекарственные препараты (например, Celgen); лефлуномид (противовоспалительный и ингибитор цитокина, см. например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S131; (1996) *Inflamm. Res.* 45: 103-107); транексамовая кислота (ингибитор активации плазминогена, см. например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S284); T-614 (ингибитор цитокина; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S282); простагландин E1 (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S282); тенидап (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат; см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S280); напроксен (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат; см., например, (1996) *Neuro. Report* 7: 1209-1213); мелоксикам (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); ибупрофен (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); диклофенак (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); индометацин (нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат); сульфасалазин (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S281); азатиоприн(см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S281); ингибитор ICE (ингибитор интерлейкин-1 β превращающего фермента); ингибитор zap-70 и/или lck (ингибитор тирозинкиназы zap-70 или lck); ингибитор VEGF и/или ингибитор VEGF-R (ингибиторы фактора роста клеток эндотелия сосудов или рецептор фактора роста клеток эндотелия сосудов; ингибиторы ангиогенеза); кортикостероидные противовоспалительные лекарственные средства (например, SB203580); ингибиторы конвертазы TNF; антитела к IL-12; антитела к IL-18; интерлейкин-11 (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S296); интерлейкин-13 (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S308); ингибиторы интерлейкин-17 (см., например, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (supplement)): S120); золото; пеницилламин; хлорохин; хлорамбуцил; гидроксихлорохин; циклоспорин; циклофосфамид; тотальное облучение лимфоидной ткани; антитромбоцитарный глобулин; антитела к CD4; CD5-токсины; перорально вводимые пептиды и коллаген; лобензарит динатрия; цитокин-регулирующие средства (CRA) HP228 и HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); антисмысловые фосфоротиоатные олигонуклеотиды к ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); растворимый рецептор комплемента 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); преднизон; орготеин; гликозаминогликан-полисульфат; миноциклин; антитела к IL2R; липиды морских организмов и растений (жирные кислоты из рыбы и семян растений; см., например, DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21: 759-777); ауранофин; фенилбутазон; меклофенамовая кислота; флуфенамовая кислота; внутривенный иммунный глобулин; зилеутон; азарибин; микофеноловая кислота (RS-61443); такролимус (FK-506); сиролимус (рапамицин); амиприлоза (терафектин); кладрибин (2-хлордезоксаденозин); метотрексат; ингибиторы bcl-2 (см., Bruncko, M. et al. (2007) *J. Med. Chem.* 50(4): 641-662); противовирусные и иммуномодулирующие средства, малая молекула-ингибитор KDR, малая молекула-ингибитор Tie-2; метотрексат;

преднизон; целекоксиб; фолиевая кислота; гидроксихлорохина сульфат; рофексикс; этанерцепт; инфликсимоноклональное антитело; лефлуномид; напроксен; вальдекоксид; сульфасалазин; метилпреднизолон; ибупрофен; мелоксикам; метилпреднизолон ацетат; золота-натрия тиомалат; аспирин; азатиоприн; триамцинолона ацетонид; пропоксифена напсилат/ацетоаминофен; фолат; набуметон; диклофенак; пироксикам; этодолак; диклофенак натрия; оксапрозин; оксикодон-hcl; гидрокодона битартрат/ацетоаминофен; диклофенак натрия/мизопростол; фентанил; анакинра, человеческие рекомбинантные молекулы; трамадол-hcl; салсанат; сулиндак; цианокобаламин/фа/пиридоксин; ацетоаминофен; алендронат натрия; преднизолон; морфина сульфат; лидокаина гидрохлорид; индометацин; глюкозамина сульфат/хондроитин; циклоспорин; амилтриптилина гидрохлорид; сульфадиазин; оксикодон-hcl/ацетоаминофен; олопатадин-hcl; мизопростол; напроксен натрия; омепразол; микофенолята мофетил; циклофосфамид; ритуксимоноклональное антитело; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; антитело к IL 18; антитело к IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; рофлумиласт; IC-485; CDC-801; мезопрам, альбутерол, салметерол/флутиказон, монтелукаст натрия, флутиказона пропионат, будезонид, преднизон, салметерола ксинафоат, левалбутерол-hcl, альбутерола сульфат/ипратропий, преднизолон натрия фосфат, триамцинолона ацетонид, беклометазона дипропионат, ипратропия бромид, азитромицин, пирбутерола ацетат, преднизолон, теофиллин безводный, метилпреднизолон натрия сукцинат, кларитромицин, зафирлукаст, формотерола фумарат, вакцина против вируса гриппа, метилпреднизолон, амоксициллина тригидрат, флунизолид, противоаллергическая инъекция, кромолин натрия, фексофенадина гидрохлорид, флунизолид/ментол, амоксициллин/клавуланат, левофлоксацин, вспомогательное устройство для ингаляции, гвайфенезин, дексаметазона натрия фосфат, моксифлоксацин-hcl, доксициклина гиклат, гвайфенезин/d-метопран, р-эфедрин/cod/хлорфенир, гатифлоксацин, цетиризина гидрохлорид, мометазона фураат, салметерола ксинафоат, бензонатат, цефалексин, ре/гидрокодон/хлорфенир, цетиризин-hcl/псевдоэфедрин, фенилэфрин/cod/прометазин, кодеин/прометазин, цефпрозил, дексаметазон, гвайфенезин/псевдоэфедрин, хлорфенирамин/гидрокодон, недокромил натрия, тербуталина сульфат, эпинефрин, метилпреднизолон, метапротеренола сульфат, аспирин, нитроглицерин, метопролола тартрат, эноксапарин натрия, гепарин натрия, клопидогреля бисульфат, карведилол, атенолол, морфина сульфат, метопролола сукцинат, варфарин натрия, лизиноприл, изосорбида мононитрат, дигоксин, фуросемид, симвастатин, рамиприл, тенектеплаза, эналаприла малеат, торсемид, ретаваза, лозартан калия, хинаприл-hcl/карбонат магния, буметанид, альтеплаза, эналаприлат, амиодарона гидрохлорид, тирофибан-hcl m-гидрат, дилтиазема гидрохлорид, каптоприл, ирбесартан, валсартан, пропранолола гидрохлорид, фозиноприл натрия, лидокаина гидрохлорид, эптифибатида, цефазолин натрия, атропина сульфат, аминокaproновая кислота, спиринолактон, интерферон, соталола гидрохлорид, хлорид калия, докузат натрия, добутамин-hcl, алпразолам, правастатин натрия, аторвастатин кальция, мидазолама гидрохлорид, меперидина гидрохлорид, изосорбида динитрат, эпинефрин, дофамина гидрохлорид, бивалирудин, росувастатин, эзетимиб/симвастатин, авазимиб и карипорид.

Средство, представляющее собой иРНК (и/или антитело к компоненту комплемента C5) и дополнительное терапевтическое средство и/или лечение можно вводить одновременно и/или в одной комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельного состава, или в разное время, и/или другим способом, известным в данной области техники или описанных в данном документе.

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

Примеры

Пример 1. Синтез иРНК.

Происхождение реагентов.

Если происхождение реагента конкретно не приведено в данном документе, такой реагент можно получать от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии со стандартным качеством/чистотой для применения в молекулярной биологии.

Транскрипты.

Конструирование siRNA осуществляли для идентификации siRNA, целенаправленно воздействующих на транскрипты человека (*Homo sapiens*), макака-крабоеда (*Macaca fascicularis*, далее "суно"), мышцы (*Mus musculus*) и крысы (*Rattus norvegicus*). В целом, в конструировании дуплексов использовали транскрипты человека, мыши и крысы из коллекции эталонных последовательностей NCBI, аннотированные в базе данных генов NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). В случае суно в конструировании использовали транскрипты, загруженные с сайта проекта по расшифровке генома *M.fascicularis*

(<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/download.jsp>), и/или транскрипты, полученные из библиотеки кДНК, полученных из печени.

В конструировании siRNA для CFB использовали следующие из коллекции эталонных последовательностей NCBI: человек - NM_001710; Суно (из проекта по расшифровке генома *M.fascicularis*) - ENSMMUP00000000985 (локус=scaffold3881:47830:53620); мышь - NM_001142706 и NM_008198; и крыса - NM_212466.3.

В конструировании siRNA для C3 использовали следующие из коллекции эталонных последовательностей NCBI: человек - NM_000064; Суно (из проекта по расшифровке генома *M.fascicularis*) - ENSP00000245907 (locus=chr19:6921416:6963034); мышь - NM_009778; и крыса - NM_016994.

В конструировании siRNA для C9 использовали следующие из коллекции эталонных последовательностей NCBI: человек - NM_001737; Суно (из библиотеки кДНК из печени) - isotig05361; мышь - NM_013485; и крыса - NM_057146.

Дуплексы siRNA конструировали несколькими отдельными партиями, в том числе, но без ограничения, партии, которые содержали дуплексы, совпадающие только с транскриптами человека; транскриптами человека и суно; транскриптами человека, суно и мыши и транскриптами человека, суно, мыши и крысы. Большинство дуплексов siRNA конструировали таким образом, чтобы они имели 100% идентичность с приведенным транскриптом человека и транскриптами других видов, рассматриваемыми в каждой конструируемой партии (выше). Тем не менее, в некоторых случаях, когда пара комплементарных оснований антисмысловая цепь:целевая мРНК представляла собой пару GC или CG, дуплексы siRNA конструировали с ошибочно спаренными основаниями между дуплексом и целевой мРНК в первом положении в антисмысловой (последнем - в смысловой) цепи (см., например, табл. 5, олигонуклеотиды с меткой G21U, G21A, C21A, G21A). В этих случаях дуплексы конструировали с парами оснований UA или AU в паре первое основание антисмысловой:последнее основание в смысловой цепи. Таким образом, дуплексы сохраняли комплементарность, но являлись несовпадающими по отношению к мишени (U:C, U:G, A:C или A:G).

Конструирование siRNA, специфичность и прогноз эффективности.

Прогнозируемую специфичность всех возможных 19mers предсказывали из каждой последовательности. Затем отбирали 19mers кандидаты, не имеющих повторы более чем 7 нуклеотидов.

Следующие наборы siRNA-кандидатов использовали при обширных поисках в отношении соответствующих транскриптомов (определенных как набор из записей NM_ и XM_ в пределах наборов эталонных последовательностей человека, мыши или крысы в NCBI, и набор транскриптомов суно в базе нуклеотидов NCBI) с применением исчерпывающего алгоритма "грубой силы", включенного в скрипт 'BruteForce.py' на языке программирования "питон".

C3: 46 человек/суно/мышь/крыса, 80 человек/суно/мышь, 2384 человек/суно.

C9: 7 человек/суно/мышь/крыса, 12 человек/суно/мышь, 816 человек/суно.

CFB: 23 человек/суно/мышь, 1232 человек/суно.

Далее скрипт разбирал на транскрипт-олиго выравнивания для создания показателя на основе положения и числа несоответствий между siRNA и любым потенциальным "нецелевым" транскриптом. Нецелевой показатель взвешивали, чтобы подчеркнуть различия в "исходном" участке siRNAs, в положениях 2-9 от 5'-конца молекулы.

Каждая пара олиго-транскрипт из полного перебора получала значение несовпадения путем суммирования индивидуальных баллов несовпадения; несовпадения в положении 2-9 считали как 2,8, несовпадения в положениях сайта расщепления 10-11 считали как 1,2, и несовпадения в участке 12-19 считали как 1,0. Дополнительное нецелевое предсказание осуществляли путем сравнения частоты гептамеров и октомеров, полученных из 3 различных, производных исходных гексамеров каждого олигонуклеотида. Гексамеры с позиций 2-7 по отношению к началу 5' применяли для создания 2 гептамеров и одного октамера. "Гептамер 1" создавали путем добавления 3'-А к гексамеру; гептамер 2 создавали путем добавления 5'-А к гексамеру; октомер создавали путем добавления А и к 5'-, и к 3'-концам гексамера. Предварительно рассчитывали частоту октамеров и гептамеров в 3'-UTRome человека, макак-резус, мыши или крысы (определяется как подпоследовательность транскриптома из базы данных RefSeq NCBI, где конец кодирующего участка, "CDS", четко определен). Частоту октамера приводили в соответствие с частотой гептамера, используя среднее значение из диапазона частот октамера. Затем рассчитывали "mirSeedScore" путем расчета суммы (3× подсчет приведенного в соответствие октамера) (2× подсчет гептамера 2) (1× подсчет гептамера 1)).

Обе цепи siRNA назначали к категории специфики в соответствии с расчетными баллами: оценка выше 3 квалифицируется как весьма специфическая, при значении 3 как специфическая, и между 2,2 и 2,8 как умеренно специфическая. Дуплексы сортировали по специфике антисмысловой цепи и отбирали те дуплексы, чьи антисмысловые олигонуклеотиды не содержали GC в первом положении, не содержали G в обоих положениях 13 и 14, и содержали 3 или больше U или A в исходном участке.

Для GalNaC-конъюгированных дуплексов конструировали смысловой 21мер и антисмысловый 23мер олигонуклеотиды путем расширения антисмысловых 19mers (описано выше) до 23 нуклеотидов в

целевой комплементарной последовательности. Все виды транскриптов, включенные в конструкцию партии, проверяли на комплементарность. Применяли только 23mers, сохранившие 100% комплементарность последовательности по меньшей мере у 2 видов. Для каждого дуплекса определяли смысловые 21mer как обратную комплементарность первых 21 нуклеотидов антисмысловой цепи. Выбор последовательности siRNA.

Синтезировали и образовывали дуплексы в следующих наборах дуплексов из 21/23 мономерных единиц для конструирования конъюгата с GalNac.

C3: пары, полученные из двадцати смысловых и 20 антисмысловых олигонуклеотидов от человека/супо/мыши/крысы, в том числе 6, где первое положение в антисмысловой цепи поменяли на UA (выше); пары, полученные из 10 смысловых и 10 антисмысловых олигонуклеотидов от человека/супо/мыши, в том числе 3, где первое положение в антисмысловой цепи поменяли на UA (выше); пары, полученные из 12 смысловых и 12 антисмысловых олигонуклеотидов от человека/супо.

C9: пара, полученная из одного смыслового и 1 антисмыслового олигонуклеотидов от человека/супо/мыши/крысы; пары, полученные из 2 смысловых и 2 антисмысловых олигонуклеотидов от человека/супо/мыши; пара, полученная из 1 смыслового и 1 антисмыслового олигонуклеотидов от человека/супо/крысы; пары, полученные из 19 смысловых и 19 антисмысловых олигонуклеотидов от человека/супо.

CFB: пары, полученные из девяти смысловых и 9 антисмысловых олигонуклеотидов от человека/супо/мыши, в том числе 4, где первое положение в антисмысловой цепи поменяли на UA (выше); пары, полученные из 23 смысловых и 23 антисмысловых олигонуклеотидов от человека/супо.

Подробный перечень последовательностей смысловых и антисмысловых цепей для CFB приведен в табл. 3-4.

Подробный перечень последовательностей смысловых и антисмысловых цепей для C3 приведен в табл. 5-6.

Подробный перечень последовательностей смысловых и антисмысловых цепей для C9 приведен в табл. 7-8.

Синтез siRNA.

Общие Способы Синтеза РНК малого и среднего размера.

РНК-олигонуклеотиды синтезировали в масштабах между 0,2-500 мкмоль с применением коммерчески доступных 5'-О-(4,4'-диметокситриил)-2'-О-*t*-бутилдиметилсиллил-3'-О-(2-цианоэтил-N,N-диизопропил)фосфорамидит-мономеров уридина, 4-N-ацетилцитидин, 6-N-бензоиладенозина и 2-N-изобутиргуанозина и соответствующих 2'-О-метил и 2'-фтор фосфорамидитов, согласно стандартным протоколам синтеза олигонуклеотидов в твердой фазе. Растворы амидита готовили в концентрации 0,1-0,15M и применяли 5-этилтио-1H-тетразол (0,25-0,6M в ацетонитриле) в качестве активатора. В процессе синтеза вводили фосфотиоатные модификации остова с применением 0,2M фенилацетил дисульфида (PADS) в лутидин: ацетонитрил (1:1) (об./об.) или 0,1M 3-(диметиламинометил)амино-3H-1,2,4-дигиазол-5 тиона (DDTT) в пиридине для стадии окисления. После завершения синтеза последовательности отщепляли от твердой подложки и снимали защиту с применением метиламина с последующим триметиламином 3HF для удаления присутствующих 2'-О-*t*-бутилдиметилсиллил-защитных групп.

Для масштабов синтеза между последовательностей (5-500 мкмоль и полностью 2'-модифицированных 2'-фтор и/или 2'-О-метил или их комбинации), у олигонуклеотидов удаляли защитную группу с применением 3:1 (об./об.) этанола и концентрированного (28-32%) водного раствора аммиака либо при 35°C 16 ч, или при 55°C в течение 5,5 ч. Перед удалением защитной группы аммиака олигонуклеотиды обрабатывали 0,5M пиперидином в ацетонитриле в течение 20 мин на твердой подложке. Неочищенные олигонуклеотиды анализировали с помощью LC-MS и анионообменной HPLC (IEX-HPLC). Очистку олигонуклеотидов проводили с помощью IEX HPLC в применении: 20 mM фосфата, 10-15% ACN, pH=8,5 (буфер А) и 20 mM фосфата, 10-15% ACN, 1M NaBr, pH=8,5 (буфер В). Фракции анализировали на чистоту с помощью аналитической HPLC. Содержащие продукт фракции с приемлемой чистотой объединяли и концентрировали на ротационном испарителе до обессоливания. Образцы обессоливали с помощью эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали до сухости. Равные мольные количества смысловых и антисмысловых цепей отжигали в 1× PBS-буфере с получением соответствующих дуплексов siRNA.

Для малых масштабов (0,2-1 мкмоль) синтез проводили на синтезаторе MerMade 192 в формате 96 лунок. В случае полностью 2'-модифицированных последовательностей (2'-фтор и/или 2'-О-метил или их комбинаций), у олигонуклеотидов удаляли защитную группу с применением метиламина при комнатной температуре в течение 30-60 мин с последующей инкубацией при 60°C в течение 30 мин или с применением 3:1 (об./об.) этанола и концентрированного (28-32%) водного раствора аммиака при комнатной температуре в течение 30-60 мин с последующей инкубацией при 40°C в течение 1,5 ч. Неочищенные олигонуклеотиды затем осаждали в растворе ацетонитрил:ацетон (9:1) и выделяли центрифугированием и декантацией супернатанта. Неочищенный олигонуклеотидный осадок ресуспендировали в 20 мМ буфера NaOAc и анализировали с помощью LC-MS и анионообменной HPLC. Неочищенные олигонуклеотидные последовательности обессоливали в глубоких 96-луночных планшетах на колонке HiTrap Se-

phadex G25 5 мл (GE Healthcare). Из каждой лунки отбирали 1,5 мл образцов, соответствующих индивидуальной последовательности. Эти очищенные обессоленные олигонуклеотиды анализировали с помощью LC-MS и анионообменной хроматографии. Дуплексы получали путем отжига эквимольных количеств смысловых и антисмысловых последовательностей на работе Тесап. Концентрацию дуплексов доводили до 10 мкМ в 1× PBS-буфере.

I. Синтез GalNAc-конъюгированных олигонуклеотидов для анализа.

In Vivo.

Олигонуклеотиды, конъюгированные с лигандом GalNAc на их 3'-конце, синтезировали в масштабах между 0,2-500 мкмоль с применением твердой подложки, предварительно загруженной Y-образной линкером, несущим 4,4-диметокситритил (DMT)- защитную первичную группу гидроксидов для синтеза олигонуклеотида и GalNAc-лиганда, присоединенного через фрагмент.

Для синтеза конъюгатов GalNAc в масштабах между 5-500 мкмоль, указанный протокол синтеза РНК дополняли следующими модификациями: Для подложек синтеза на основе полистирола применяли 5% дихлоруксусную кислоту в толуоле для DMT-расщепления в процессе синтеза. Отщепление от подложки и удаление защиты проводили, как описано выше. Фосфотиоатно-богатые последовательности (обычно > 5 фосфотиоатов) синтезированы без удаления конечной 5'-OMT-группы ("с DMT") и после расщепления и удаления защитной группы, как описано выше, очищали с помощью обращенно-фазовой HPLC с применением 50 мМ ацетата аммония в воде (буфер А) и 50 мМ ацетат аммония в 80% ацетонитриле (буфер В). Фракции анализировали на чистоту с помощью аналитической HPLC и/или LC-MS. Содержащие продукт фракции с приемлемой чистоты, объединяли и концентрировали на роторном испарителе. DMT-группу удаляли с применением 20-25% уксусной кислоты в воде до завершения процесса. Образцы обессоливали с помощью эксклюзионной хроматографии и лиофилизировали до сухости. Равные мольные количества смысловых и антисмысловых цепей отжигали в 1× PBS-буфере с получением соответствующих дуплексов siRNA.

Для синтеза малых масштабов конъюгатов GalNAc (0,2-1 мкмоль), включая последовательности с несколькими фосфотиоатными связями, применяли протоколы, описанные выше для синтеза РНК или полностью 2'-F/2'-ОМЕ-содержащих последовательностей на платформе MerMade. Синтез проводили на предварительно упакованных колонках, содержащих GalNAc-функционализированную управляемую подложку со стеклянными порами.

Пример 2. Скрининг in vitro.

Клеточная культура и трансфекции.

Клетки Hep3B (ATCC, Манассас, Вирджиния) выращивали практически до слияния при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в минимальной поддерживающей среде Игла (ATCC), дополненной 10% FBS, стрептомицином и глутамином (ATCC), перед отделением от чашки Петри путем обработки трипсином. Клетки промывали и ресуспендировали до 0,25×10⁶ клеток/мл. Во время трансфекций клетки высевали на 96-луночный планшет с приблизительно 20000 клеток на лунку.

Первичные гепатоциты мыши (PMH) выделяли непосредственно перед процедурой из самок мышей линии C57BL/6 (Charles River Laboratories International, Inc. Willmington, MA), меньше чем за 1 ч до трансфекций, и выращивали в среде первичных гепатоцитов. Клетки ресуспендировали в концентрации 0,11×10⁶ клеток/мл в среде (для посева) InVitroGRO CP Rat (Celsis In Vitro Technologies, номер в каталоге S01494). Во время трансфекции клетки высевали на 96-луночный коллагеновый планшет BD Bioscoat (BD, 356407), 10000 клеток на лунку, и инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для Hep3B и PMH трансфекцию выполняли путем добавления 14,8 мкл Opti-MEM с 0,2 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Кралсбад, Калифорния, номер в каталоге 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса siRNA в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Смесь затем инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Восемьдесят мкл полных питательных сред без антибиотика, содержащих соответствующее количество клеток, затем добавляли к смеси siRNA. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед очисткой РНК.

Эксперименты с использованием разовых доз проводили с конечной концентрацией дуплекса 1 нМ и 0,01 нМ для модифицированных GalNAc последовательностей. Эксперименты зависимости дозы-ответ проводили при 3, 1, 0,3, 0,1, 0,037, 0,0123, 0,00412 и 0,00137 нМ конечной концентрации дуплекса для первичных гепатоцитов мыши и при 3, 1, 0,3, 0,1, 0,037, 0,0123, 0,00412, 0,00137, 0,00046, 0,00015, 0,00005 и 0,000017 нМ конечной концентрации дуплекса для клеток Hep3B.

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

Клетки собирали и лизировали в 150 мкл лизирующего/связывающего буфера, затем смешивали в течение 5 мин при 850 об/мин с помощью Eppendorf Thermomixer (скорость смешивания была одинаковой на протяжении процесса). Десять микролитров магнитных гранул и 80 мкл смеси лизирующего/связывающего буфера добавляли в круглодонный планшет и смешивали в течение 1 мин. Магнитные гранулы фиксировали при помощи магнитного стенда и супернатант удаляли без смещения гранул. После удаления супернатанта лизированные клетки добавляли к оставшимся гранулам и смешивали в течение

ние 5 мин. После удаления супернатанта магнитные гранулы промывали 2 раза 150 мкл промывочного буфера А и смешивали в течение 1 мин. Гранулы фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Гранулы затем промывали 150 мкл промывочного буфера В, фиксировали и супернатант удаляли. Наконец, гранулам давали возможность высохнуть в течение 2 мин. После высыхания добавляли 50 мкл элюирующего буфера и смешивали в течение 5 мин при 70°C. Гранулы фиксировали на магните в течение 5 мин. Удаляли сорок пять мкл супернатанта и добавляли в другой 96-луночный планшет.

Синтез кДНК с использованием набора "ABI High capacity cDNA reverse transcription kit" (Applied Biosystems, Форстер-Сити, Калифорния, № по кат. 4368813)

Готовили мастер-микс из 2 мкл 10× буфера, 0,8 мкл 25× dNTP, 2 мкл случайных праймеров, 1 мкл обратной транскриптазы, 1 мкл ингибитора РНКазы и 3,2 мкл H₂O на реакцию. Равные объемы мастер-микса и РНК смешивали до конечного объема 12 мкл для *in vitro* скрининга или 20 мкл для *in vivo* скрининга образцов. кДНК получали с применением термоциклера Bio-Rad C-1000 или S-1000 (Hercules, Калифорния) посредством следующих стадий: 25°C в течение 10 мин, 37°C в течение 120 мин, 85°C в течение 5 с и хранение при 4°C.

PCR в режиме реального времени.

Два мкл кДНК добавляли к мастер-миксу, содержащему 2 мкл H₂O, 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan (Life Technologies, номер в каталоге 4326317E для клеток Hep3В, номер в каталоге 352339E для первичных гепатоцитов мыши, или сделанный по индивидуальному заказу зонд для первичных гепатоцитов макака-крабоведа), 0,5 мкл соответствующего зонда TaqMan (Life Technologies, номер в каталоге Hs00156197_m1 для клеток Hep3В или mm00439275_m1 для первичных гепатоцитов мыши, или сделанный по индивидуальному заказу зонд для первичных гепатоцитов макака-крабоведа) и 5 мкл мастер-микса с зондом Lightcycler 480 (Roche, номер в каталоге 04887301001) на лунку в 384-луночных планшетах (Roche, номер в каталоге 04887301001). PCR в режиме реального времени выполняли в системе "Roche LC480 Real Time PCR system" (Roche) с применением ΔΔCt(RQ)-анализа. Для скрининга *in vitro* каждый дуплекс испытывали с двумя биологическими повторами, если не указано иное, и каждый раз PCR в режиме реального времени проводили в одинаковых технических повторях. Для скрининга *in vitro* каждый дуплекс испытывали в одном или нескольких экспериментах (3 мыши на группу) и каждый раз PCR в режиме реального времени проводили в одинаковых технических повторях.

Для вычисления относительного кратного изменения уровней мРНК данные в реальном времени анализировали с применением ΔΔCt-способа и нормализовали к анализам, проведенным с клетками, трансфицированными 10 нМ AD-1955, или клетками с имитацией трансфекции. IC₅₀ вычисляли с применением модели согласования по 4 параметрам с использованием XLFit и нормализовали в соответствии с таковыми для клеток, трансфицированных AD-1955 в таком же диапазоне доз или в отношении его наиболее низкой дозы.

Смысловая и антисмысловая последовательности AD-1955 представляют собой:

смысловая: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO: 39);

антисмысловая: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO: 40).

В табл. 9 приведены результаты скрининга в отношении разовой дозы в клетках Hep3В, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAC iRNA к CFB. Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК в сравнении с необработанными клетками.

В табл. 10 приведены результаты скрининга в отношении разовой дозы в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAC iRNA к CFB. Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК в сравнении с необработанными клетками.

В табл. 11 показан дозозависимый эффект в клетках Hep3В, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAC iRNA к CFB. Указанные значения IC₅₀ представляют значения IC₅₀ в сравнении с необработанными клетками.

В табл. 12 показан дозозависимый эффект в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAC iRNA к CFB. Указанные значения IC₅₀ представляют значения IC₅₀ в сравнении с необработанными клетками.

В табл. 13 приведены результаты скрининга в отношении разовой дозы в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAC iRNA к C9. Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК в сравнении с необработанными клетками.

В табл. 14 приведены результаты скрининга в отношении разовой дозы в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAC iRNA к C3. Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК в сравнении с необработанными клетками.

В табл. 15 приведены результаты скрининга в отношении разовой дозы в клетках Hep3В, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAC iRNA к C3. Данные выражены в виде процента оставшейся матричной РНК в сравнении с необработанными клетками.

В табл. 16 показан дозозависимый эффект в первичных гепатоцитах мыши, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAC iRNA к C3. Указанные значения IC₅₀ представляют значения

IC₅₀ в сравнении с необработанными клетками.

В табл. 17 показан дозозависимый эффект в клетках Hep3В, трансфицированных указанными конъюгированными с GalNAc iRNA к С3. Указанные значения IC₅₀ представляют значения IC₅₀ в сравнении с необработанными клетками.

Таблица 2. Сокращения нуклеотидных мономеров, применяемые в представлении последовательности нуклеиновой кислоты. Следует понимать, что эти мономеры, если они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями

Сокращение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфотиоат
As	аденозин-3'-фосфотиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфотиоат
Cs	цитидин-3'-фосфотиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфотиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфотиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфотиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфотиоат
Us	уридин-3'-фосфотиоат
N	любой нуклеотид (G, A, C, T или U)
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфотиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфотиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфотиоат
t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфотиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфотиоат
s	фосфотиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеканонил]-4-гидроксипролинол-Нур-(GalNAc-алкил)3

Таблица 3. Немодифицированные последовательности фактора комплемента В (CFB)

Последовательности CFB человека						
ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность (SEQ ID NO: 41-71, соответственно, по порядку)	Положение в NM_001710.5	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NO: 72-102, соответственно, по порядку)	Положение в NM_001710.5
AD-60315.1	A-122021.1	AUUUCGUAUUUUUAUGACUAU	1987-2007	A-122022.1	AUAGUCAUAAAAUUCAGGAUUUC	1985-2007
AD-60326.1	A-122009.1	CCUGAUAACGCUCAAGAAUAA	2016-2036	A-122010.1	UUUUUUUAGAGCUUUAUCAGGGC	2014-2036
AD-60303.1	A-122017.1	GAAGCAGGAUUCCUGAAUUU	1978-1998	A-122018.1	AAAUUCAGGAUUCCUGCUUUUU	1976-1998
AD-60331.1	A-121995.1	AGCAACUGUGUUCAAAGUCA	1628-1648	A-121996.1	UGACUUUUAACACAUUGUCUCA	1626-1648
AD-60344.1	A-122015.1	GCUGUGGUGUCUGAGUACUUU	1822-1842	A-122016.1	AAAGUACUAGACACCAAGCC	1820-1842
AD-60345.1	A-122031.1	AAGUGUCUAGUCAACUAAUU	1153-1173	A-122032.1	AAUUUAAGUAGACUAGACAUUUU	1151-1173
AD-60319.1	A-121991.1	AGCUGUGAGAGAGUAGUCA	2245-2265	A-121992.1	UUGAGAUUCUCUCACAGCUGC	2243-2265
AD-60308.1	A-122003.1	AGCCAAAAGUGUCUAGUCA	1146-1166	A-122004.1	UUGACUAGACAUUUUUGGCUC	1144-1166
AD-60332.1	A-122011.1	UGUGAGUGAUGAGAUUCUUU	648-668	A-122012.1	AAAGAGAUUCUACUCACAAU	646-668
AD-60313.1	A-121989.1	AAUUGAGAAGGUGGCAAGUUA	1170-1190	A-121990.1	UAACUUGCCACCUUCUCAAUUAA	1168-1190
AD-60321.1	A-122023.1	CAACAUUGUUCAAAGUCAAG	1630-1650	A-122024.1	CUUGACUUUGAACACAUUGUCU	1628-1650
AD-60327.1	A-122025.1	UGUGAGAGAGAUUCUAAUU	2248-2268	A-122026.1	AUUUAGACAUUCUCUCACAGC	2246-2268
AD-60302.1	A-122001.1	GUCUAGUCAACUAAUUGAGA	1157-1177	A-122002.1	UCUCAUUUAAGUAGACUAGACAC	1155-1177
AD-60325.1	A-121993.1	UCCAAGAAAGACAAGUCAAG	1612-1632	A-121994.1	UUGUCACUUGACUUCUUGGAAAG	1610-1632
AD-60337.1	A-121997.1	UGUGUUCAAAGUCAAGGAUUA	1635-1655	A-121998.1	AUAUCUUGACUUGAACACAUUG	1633-1655
AD-60333.1	A-122027.1	AUUGAUGAGAUCCGGGCAUUG	1486-1506	A-122028.1	CAAGUCCCGGACUUCUCAAUGA	1484-1506
AD-60314.1	A-122005.1	CUGUGAGAGAGAUUCUAAUA	2247-2267	A-122006.1	AUUUAGACAUUCUCACAGCU	2245-2267
AD-60320.1	A-122007.1	GAGCCAAAAGUGUCUAGUCA	1145-1165	A-122008.1	UGACUAGACAUUUUUGGCUCU	1143-1165
AD-60339.1	A-122029.1	UCCAAGAUAGGAAUUGGGUU	2549-2569	A-122030.1	AACCCAAUCCUACUUCUUGGAGU	2547-2569
AD-60338.1	A-122013.1	CCCUUGAUGUUCACAAGAGA	2386-2406	A-122014.1	UCUCUUGUAGACUUCAGGGGC	2384-2406
AD-60307.1	A-121987.1	CAAAGUCAAGGAUUGGAAAA	1641-1661	A-121988.1	UUUUCCAUAUCCUUGACUUGAA	1639-1661
AD-60309.1	A-122019.1	UAGUUCACAAGAGAAGUCUU	2393-2413	A-122020.1	AACGACUUCUCUUGUAGAAUUC	2391-2413
AD-60343.1	A-121999.1	GGCCCUUGAUGAUCACAAG	2383-2403	A-122000.1	CUUGUAGACUUAUAAAGGGCCGC	2381-2403
AD-60324.1	A-121977.1	UGGUGCUAGAUGAUCAGACA	1100-1120	A-121978.1	UGUCUGAUCCAUCUAGCACCAGG	1098-1120
AD-60318.1	A-121975.1	GCUAGAUGGAUCAGACAGCAU	1104-1124	A-121976.1	AUGCUGUCUGAUCCAUCUAGCAC	1102-1124
AD-60300.1	A-121969.1	UACCUUGUUCUAGAUGGAUCA	1096-1116	A-121970.1	UGAUCCAUCUAGCACCAGGUAG	1094-1116
AD-60330.1	A-121979.1	GGUGCUAGAUGGAUCAGACAA	1101-1121 (G19A)	A-121980.1	UUGUCUGAUCCAUCUAGCACCAG	1099-1121 (G19A)
AD-60306.1	A-121971.1	UCUGAGUCUCUGGCAUGGU	1704-1724	A-121972.1	ACCAUGCCACAGAGACUCAGAGA	1702-1724
AD-60336.1	A-121981.1	GUGCUAGAUGGAUCAGACAGA	1102-1122 (C19A)	A-121982.1	UCUGUCUGAUCCAUCUAGCACCA	1100-1122 (C19A)
AD-60301.1	A-121985.1	CUACCUUGGUCUAGAUGGAUA	1095-1115 (C19A)	A-121986.1	UAUCCAUCUAGCACCAGGUAGAU	1093-1115 (C19A)
AD-60342.1	A-121983.1	ACCUGGUCUAGAUGGAUCA	1097-1117 (G19A)	A-121984.1	UUGAUCCAUCUAGCACCAGGUAG	1095-1117 (G19A)
Последовательности CFB грызуна						
ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность (SEQ ID NO: 103-117, соответственно, по порядку)	Положение в NM_001142706.1	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NO: 118-132, соответственно, по порядку)	Положение в NM_001142706.1
AD-60334.1	A-122043.1	GCAAGCCAAGAUUCAGUCAC	1888-1908	A-122044.1	GUGACUGAGACUUGGGCUUGCCA	1886-1908
AD-60304.1	A-122033.1	GAUUGAGAAGGUGGCGAUUA	1291-1311	A-122034.1	UAACUCGCCACCUUCUCAAUCAA	1289-1311
AD-60310.1	A-122035.1	CACAAGAGAAGCCGCUUUAU	2515-2535	A-122036.1	AAUGAAGCGGCUUCUUGUGAA	2513-2535
AD-60328.1	A-122041.1	UUUGAGAGAGAUUCUACAAA	2364-2384	A-122042.1	UUUGUAGACUUCUCUACAAA	2362-2384
AD-60322.1	A-122039.1	UCCUUCAUAGAAUUCGGGGA	193-213	A-122040.1	UCCCGGAACUUCUAGAAGGAGG	191-213
AD-60316.1	A-122037.1	UCACAGAGAAGCUCACACAAA	1407-1427	A-122038.1	UUUGGUUAGACUUCUCUGAGCC	1405-1427
AD-60346.1	A-122047.1	CUCAACCAAAUCAGUUUAGAA	1418-1438	A-122048.1	UUCUAACUAGAUUUGGUUAGCU	1416-1438
AD-60335.1	A-122059.1	CCCUGACAGACCAUCGAAG	1113-1133	A-122060.1	CUUCGAUGGUCUCUGAGGGAG	1111-1133
AD-60323.1	A-122055.1	GAGCAGAUUGCAUAAAAGGUU	261-281	A-122056.1	AACCUUUUUGCAUUCUGCUCUG	259-281
AD-60340.1	A-122045.1	CUUCAUGAAUUCGGGGAAG	195-215	A-122046.1	CUUCCGGGAACUUCUAGAAGGA	193-215
AD-60305.1	A-122049.1	CUUCAUUCAGAUUGGUGUGAU	2529-2549	A-122050.1	AUCACACCAACUUGAAUGAAGCG	2527-2549
AD-60317.1	A-122053.1	GAUUUUAAGAGGUCUUCUUA	2050-2070	A-122054.1	UGGAACAGGACCUUCUCAAUCUC	2048-2070
AD-60329.1	A-122057.1	AUUUCUUUUAUUGAAUUAU	782-802	A-122058.1	AUCAUAGCAUUGAAAAGAAUCU	780-802
AD-60341.1	A-122061.1	CCAGAGCAGAUUGCAUAAAAG	258-278	A-122062.1	CUUUUUAUGCAUUCGUCUGGCA	256-278
AD-60311.1	A-122051.1	CACAGAGAAGCUACCAAAU	1408-1428	A-122052.1	AUUUGUUGAGCUUCUCUGGAC	1406-1428

Таблица 4. Модифицированные последовательности фактора комплемента В (CFB)

Последовательности CFB человека				
ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность (SEQ ID NO 133-163, соответственно, по порядку)	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NO 164-194, соответственно, по порядку)
AD-60315.1	A-122021.1	AfsusUfcCfuGfaAfuUfUfaUfgAfcUfaUfl96	A-122022.1	asUfsaGfuCfaUfaAfaauUfcAfgGfaAfususc
AD-60326.1	A-122009.1	CfscsUfgAfuCfaAfGfCfuCfaAfgAfaUfaAfl96	A-122010.1	usUfsaUfuCfuUfgAfgcuUfgAfuCfaGfgsgsc
AD-60303.1	A-122017.1	GfsasAfgCfaGfgAFAFUfuCfcUfgAfaUfuUfl96	A-122018.1	asAfsaUfuCfaGfgAfaauCfcUfgCfuUfcsusu
AD-60331.1	A-121995.1	AfsgsCfaAfcAfuGfUfGfuUfcAfaAfgUfcAfl96	A-121996.1	usGfsaCfuUfuGfaAfcacAfuGfuUfgCfusca
AD-60344.1	A-122015.1	GfscsUfgUfgGfuGfUfCfuGfaGfuAfcUfuUfl96	A-122016.1	asAfsaGfuAfcUfcAfgacAfcCfaCfaGfscsc
AD-60345.1	A-122031.1	AfsasGfuGfuCfuAfGfUfcAfaCfuUfaAfuUfl96	A-122032.1	asAfsuUfaAfgUfuGfauAfgAfcAfcUfususu
AD-60319.1	A-121991.1	AfsgsCfuGfuGfaGfAfgGfaUfgCfuCfaAfl96	A-121992.1	usUfsgAfgCfaUfcUfcuUfcAfcAfgCfusgsc
AD-60308.1	A-122003.1	AfsgsCfcAfaAfaAfGfUfgUfcUfaCfuAfaAfl96	A-122004.1	usUfsgAfcUfaGfaCfauUfcUfgGfgCfusgsc
AD-60332.1	A-122011.1	UfsgsUfgAfgUfgAfuUfgGfaUfcUfcUfuUfl96	A-122012.1	asAfsaGfaGfaUfcUfcuUfcCfaCfaCfasusu
AD-60313.1	A-121989.1	AfsasUfuGfaGfaAfgGfUfgGfgCfaAfgUfaAfl96	A-121990.1	usAfsaCfuUfgCfcAfcuUfcUfcAfaUfusasa
AD-60321.1	A-122023.1	CfsasAfcAfuGfuGfUfUfcAfaAfgUfcAfaGfl96	A-122024.1	csUfsuGfaCfuUfuGfaacAfcAfuGfuUfgscsu
AD-60327.1	A-122025.1	UfsgsUfgAfgAfgAfuGfcUfcAfaUfaUfl96	A-122026.1	asUfsaUfuGfaGfcAfcuUfcUfcCfaAfcgsc
AD-60302.1	A-122001.1	GfsusCfuAfgUfcAfcUfcUfaAfuUfgAfaAfl96	A-122002.1	usCfsuCfaAfuUfaAfguuGfaCfuAfgAfcsc
AD-60325.1	A-121993.1	UfscsCfaAfgAfaAfGfAfcAfaUfgAfaAfl96	A-121994.1	usUfsgCfuCfaUfuGfuuUfuCfuUfgGfasag
AD-60337.1	A-121997.1	UfsgsUfgUfuCfaAfAfgGfuCfaAfgGfaUfaUfl96	A-121998.1	asUfsaUfcCfuUfgAfcuuUfgAfaCfaCfasug
AD-60333.1	A-122027.1	AfsusUfgAfuGfaGfAfuUfcCfGfgAfcUfaGfl96	A-122028.1	csAfsaCfuUfgAfcuUfcUfcCfaAfcgsgsa
AD-60314.1	A-122005.1	CfsusGfuGfaGfaGfAfgGfaUfgCfuCfaAfuAfl96	A-122006.1	usAfsuUfgAfgCfaUfcuUfcUfcAfcAfcgscsu
AD-60320.1	A-122007.1	GfsasGfcCfaAfaAfAfgGfuCfuAfgUfcAfl96	A-122008.1	usGfsaCfuUfgAfcAfcuuUfuUfgGfcUfcscsu
AD-60339.1	A-122029.1	UfscsCfaAfgAfuGfAfgGfaUfuUfgGfuUfl96	A-122030.1	asAfcscCfaAfaAfcuUfcuUfcUfgGfgsgsc
AD-60338.1	A-122013.1	CfscsCfuUfgAfuUfgGfUfcCfaCfaAfgAfl96	A-122014.1	csCfsuCfuUfgAfcuUfcUfcCfaAfcgfgsgsc
AD-60307.1	A-121987.1	CfsasAfaGfuCfaAfgGfaUfaUfgGfaAfaAfl96	A-121988.1	usUfsuUfcCfaUfaUfcuUfcUfcAfcUfuUfgsasa
AD-60309.1	A-122019.1	UfsasGfuUfcAfcAfaAfgGfaAfgUfgGfuUfl96	A-122020.1	asAfcscGfaCfuUfcUfcuuGfuGfaAfcUfasusc
AD-60343.1	A-121999.1	GfsgsCfcCfcUfuGfAfuUfcUfcAfaAfgGfl96	A-122000.1	csUfsuGfuGfaAfcUfaucAfaGfgGfcCfcsgsc
AD-60324.1	A-121977.1	UfsgsGfuGfcUfaGfAfgUfgGfaUfcAfgAfl96	A-121978.1	usGfsuGfuCfuUfcCfaucUfaGfaAfcCfasgsg
AD-60318.1	A-121975.1	GfscsUfaGfaUfgGfAfuUfcAfgAfaUfl96	A-121976.1	asUfsgCfuCfaUfcCfaucUfaCfaAfcgscsc
AD-60300.1	A-121969.1	UfsasCfcUfgGfuGfCfuUfaGfaUfgGfaUfcAfl96	A-121970.1	usGfsaUfcCfaUfcUfagcAfcCfaGfgUfasgsa
AD-60330.1	A-121979.1	GfsgsUfgCfuAfgAfuUfgGfuCfaGfaCfaAfl96	A-121980.1	usUfsgUfcUfgAfuCfcuUfcUfgCfaCfcscag
AD-60306.1	A-121971.1	UfscsUfgAfgUfcUfcUfgUfgGfcAfuGfgUfl96	A-121972.1	asCfscAfuGfcCfaCfagaGfaCfuCfaGfasgsa
AD-60336.1	A-121981.1	GfsgsGfcUfaGfaUfgGfGfaUfcAfgAfaAfl96	A-121982.1	csCfsuGfuCfuGfaUfcuUfcUfaGfaAfcgscsa
AD-60301.1	A-121985.1	CfsusAfcCfuGfgUfgCfuAfgAfuGfgAfuAfl96	A-121986.1	usAfsuCfcAfuCfuAfgcaCfcAfgGfuAfgsasu
AD-60342.1	A-121983.1	AfscsCfuGfgUfgCfuAfgAfuGfgAfuCfaAfl96	A-121984.1	usUfsgAfuCfcAfuCfuagCfaCfaAfgGfusag
Последовательности CFB грызуна				
ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность (SEQ ID NO 195-209, соответственно, по порядку)	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NO 210-224, соответственно, по порядку)
AD-60334.1	A-122043.1	GfscsAfaGfcCfaAfgAfuCfuCfaGfaCfaCfl96	A-122044.1	gsUfsgAfcUfgAfgAfcuUfgGfcUfuGfscsa
AD-60304.1	A-122033.1	GfsasUfuGfaGfaAfgGfGfuGfgCfuUfaAfl96	A-122034.1	usAfsaCfuCfcCfcAfcuUfcUfcAfaUfcsasa
AD-60310.1	A-122035.1	CfsasCfaAfgAfgAfaGfcCfGcuUfcAfuUfl96	A-122036.1	asAfsuGfaAfgCfGcuUfcUfcUfgUfgsasa
AD-60328.1	A-122041.1	UfsusGfuGfaGfaGfAfgGfaUfgCfuCfaAfl96	A-122042.1	usUfsuGfuAfgCfaUfcuUfcUfcAfcAfcscsu
AD-60322.1	A-122039.1	UfscsCfuUfcAfuGfAfuUfcUfcCfGfgAfl96	A-122040.1	usCfscCfGfaAfcAfcuUfcUfgAfgGfasgsg
AD-60316.1	A-122037.1	UfscsAfcAfgAfgAfaGfcUfcAfaCfaAfaAfl96	A-122038.1	usUfsuGfgUfuGfaGfcuuCfuCfuGfasgsc
AD-60346.1	A-122047.1	CfsusCfaAfcCfaAfaUfcAfgUfuAfuGfaAfl96	A-122048.1	usUfscAfuAfaCfuGfauuUfgGfuUfgAfgscsu
AD-60335.1	A-122059.1	CfscsCfuGfaCfaGfAfgGfaCfcAfuCfGfaAfl96	A-122060.1	csUfsuCfGfaUfgUfcuUfcUfgAfgGfgsag
AD-60323.1	A-122055.1	GfsasGfcAfgAfuUfgGfCfaUfaAfaAfgGfuUfl96	A-122056.1	asAfcscCfuUfuUfgAfcuUfcUfcUfcUfcusg
AD-60340.1	A-122045.1	CfsusUfcAfuGfaAfuUfgUfcUfcCfGfgAfaGfl96	A-122046.1	csUfsuCfcCfGfaAfcuUfcUfcUfgAfgsgsa
AD-60305.1	A-122049.1	CfsusUfcAfuUfcAfaGfuUfgGfuGfaUfl96	A-122050.1	asUfscAfcAfcCfaAfcuUfcUfcUfgAfgscsg
AD-60317.1	A-122053.1	GfsasUfuGfaAfgAfgGfGfuCfcUfgUfuCfcAfl96	A-122054.1	usGfsgAfaCfaGfgAfcuUfcUfcAfaUfcsusc
AD-60329.1	A-122057.1	AfsusUfuCfuUfuUfcAfaUfgCfuAfuGfaUfl96	A-122058.1	asUfscAfuAfgCfaUfugaAfaAfaAfcscsu
AD-60341.1	A-122061.1	CfscsAfgAfgCfaGfAfuUfcUfcAfaAfaGfl96	A-122062.1	csUfsuUfuAfuGfcAfaUfcUfcUfgCfuGfgscsa
AD-60311.1	A-122051.1	CfsasCfaGfaGfaAfgGfCfuCfaAfaAfl96	A-122052.1	asUfsuUfgGfuUfgAfgcuUfcUfcUfgUfgsasc

Таблица 5. Немодифицированные последовательности СЗ

ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность (SEQ ID NO 225-265, соответственно, по порядку)	Положение в NM_000064.2	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NO 266-306, соответственно, по порядку)	Положение в NM_000064.2
AD-60149.1	A-121853.1	CGUGGUCAGGUCUUCUCUCU	3309-3329	A-121854.1	AGAGAGAAGACCUUGACCACGUA	3307-3329
AD-60151.1	A-121885.1	ACGUGGUCAGGUCUUCUCUA	3308-3324_C21A	A-121886.1	UAGAGAAGACCUUGACCACGUAG	3306-3324_C21A
AD-60152.1	A-121901.1	UUUGACCUCAUGGUGUUCGUG	1174-1194	A-121902.1	CACGAACACCAUGAGGUCAAAGG	1172-1194
AD-60153.1	A-121917.1	GGAGAAUUGCUUCAUACAAA	4611-4631	A-121918.1	UUUUGUAUGAAGCAAUUCUCCUC	4609-4631
AD-60154.1	A-121933.1	UGUAAAUGGUCUGAUCCUGGA	3375-3395	A-121934.1	UCCAGGAUCAGCCAUUUAACAGC	3373-3395
AD-60155.1	A-121855.1	GACAGACAAGACCAUCUACAC	465-485	A-121856.1	GUGUAGAUGGUCUUGUCUGUCUG	463-485
AD-60156.1	A-121871.1	CCAGACAGACAAGACCAUCUA	462-482	A-121872.1	UAGAUGGUCUUGUCUGUCUGGAU	460-482
AD-60157.1	A-121887.1	CCAGAUCACUUCACCAAGAA	1125-1141_C21A	A-121888.1	UUCUUGGUGAAGUGGAUCUGGUA	1123-1141_C21A
AD-60158.1	A-121903.1	UUGACCUCAUGGUGUUCGUGA	1175-1195	A-121904.1	UCACGAACACCAUGAGGUCAAAAG	1173-1195
AD-60159.1	A-121919.1	CCCCUUCGAGGUCACAGUAAU	2523-2543	A-121920.1	AUUACUUGAGCCUCCGAAAGGGGUC	2521-2543
AD-60160.1	A-121935.1	AUGAACAAAACUGGGCUGUU	2878-2898	A-121936.1	AACGCCACAGUUUUGUUAUUC	2876-2898
AD-60161.1	A-121857.1	AGACAGACAAGACCAUCUACA	464-484	A-121858.1	UGUAGAUGGUCUUGUCUGUCUGG	462-484
AD-60162.1	A-121873.1	CCAGAUCACUUCACCAAGAC	1125-1145	A-121874.1	GUCUUGGUGAAGUGGAUCUGGUA	1123-1145
AD-60163.1	A-121889.1	AGGGAUCUGUGGGCAGACCA	2505-2521_C21A	A-121890.1	UGGUCUGCCACACAGAUCCUUU	2503-2521_C21A
AD-60164.1	A-121905.1	GACAAGACCAUCUACACCCCU	469-489	A-121906.1	AGGGGUGAUGAUGGUCUUGUCUG	467-489
AD-60165.1	A-121921.1	GCUGAGGAGAAUUGCUUCAUA	4606-4626	A-121922.1	UAUGAAGCAAUUCUCCACAGCAC	4604-4626
AD-60166.1	A-121859.1	ACGUGGUCAGGUCUUCUCUC	3308-3328	A-121860.1	GAGAGAAGACCUUGACCACGUAG	3306-3328
AD-60167.1	A-121875.1	GGAUUCUGUGGCAGACCCCU	2507-2527	A-121876.1	AGGGGUCGCCACACAGAUCCCU	2505-2527
AD-60168.1	A-121891.1	ACAGACAAGACCAUCUACACA	466-482_C21A	A-121892.1	UGUGAUGAUGGUCUUGUCUGUCU	464-482_C21A
AD-60169.1	A-121907.1	AUCCAGACAGACAAGACCAUU	460-476_C21U	A-121908.1	AAUGGUCUUGUCUUGCUGGAUGA	458-476_C21U
AD-60170.1	A-121923.1	CUCCGUGUGGGUGGACGUCAA	1713-1733	A-121924.1	UUGACGUCCACCCACAGGAGUC	1711-1733
AD-60171.1	A-121861.1	UCCAGACAGACAAGACCAUCU	461-481	A-121862.1	AGAUGGUCUUGUCUGUCUGGAUG	459-481
AD-60172.1	A-121877.1	AGGGAUCUGUGUGGCAGACCC	2505-2525	A-121878.1	GGGUCUGCCACACAGAUCCUUU	2503-2525
AD-60173.1	A-121893.1	CAAGAAAGGGAUCUGUGUGGA	2499-2515_C21A	A-121894.1	UCCACACAGAUCCUUUCUUGUC	2497-2515_C21A
AD-60174.1	A-121909.1	UGACCUCAUGGUGUUCGUGAU	1176-1192_C21U	A-121910.1	AUCACGAACACCAUGAGGUCAA	1174-1192_C21U
AD-60175.1	A-121925.1	GCAGCUAAAAGACUUUGACUU	3789-3809	A-121926.1	AAGUCAAGUCUUUAGUCGACAG	3787-3809
AD-60176.1	A-121863.1	CAUCCAGACAGACAAGACCAU	459-479	A-121864.1	AUGGUCUUGUCUGUCUGGAUGAA	457-479
AD-60177.1	A-121879.1	ACAGACAAGACCAUCUACACC	466-486	A-121880.1	GGUGAUGAUGGUCUUGUCUGUCU	464-486
AD-60178.1	A-121895.1	AUCCAGACAGACAAGACCAUC	460-480	A-121896.1	GAUGGUCUUGUCUGUCUGGAUGA	458-480
AD-60179.1	A-121911.1	UUUGACCUCAUGGUGUUCGUU	1174-1190_G21U	A-121912.1	AACGAACACCAUGAGGUCAAAGG	1172-1190_G21U
AD-60180.1	A-121927.1	GGAUGCCAAGAACACUUAUGAU	4200-4220	A-121928.1	AUCAUAGUGUUCUUGGCAUCCUG	4198-4220
AD-60181.1	A-121865.1	AAGAAAGGGAUCUGUGUGCA	2500-2520	A-121866.1	UGCCACACAGAUCCUUUCUUGU	2498-2520
AD-60182.1	A-121881.1	CAAGAAAGGGAUCUGUGUGGC	2499-2519	A-121882.1	GCCACACAGAUCCUUUCUUGUC	2497-2519
AD-60183.1	A-121897.1	UACGUGGUCAGGUCUUCUCU	3307-3327	A-121898.1	AGAGAAGACCUUGACCACGUAGG	3305-3327
AD-60184.1	A-121913.1	CAGUUUCGAGGUCUAGUGGA	756-776	A-121914.1	UCCACUAGACCUUGAAACUGGG	754-776
AD-60185.1	A-121929.1	CGUGCCGGAAGGAAUCAGAAU	2859-2879	A-121930.1	AUUCUGAUCCUUCGGCAGCAGC	2857-2879
AD-60186.1	A-121867.1	GAAAGGGAUCUGUGUGGCAGA	2502-2522	A-121868.1	UCUGCCACACAGAUCCUUUCUU	2500-2522
AD-60187.1	A-121883.1	GACAGACAAGACCAUCUACAA	465-481_C21A	A-121884.1	UUGUAGAUGGUCUUGUCUGUCUG	463-481_C21A
AD-60188.1	A-121899.1	UGACCUCAUGGUGUUCGUGAC	1176-1196	A-121900.1	GUCACGAACACCAUGAGGUCAA	1174-1196
AD-60189.1	A-121915.1	UGUAAUAAUUCGACCUCAAG	4138-4158	A-121916.1	CUUGAGGUCGAAUUUUAACAGG	4136-4158
AD-60190.1	A-121931.1	AACUACAUAAACUACAGAGA	3601-3621	A-121932.1	UCUCUGAAGGUCAUGUAGUUGG	3599-3621

Таблица 6. Модифицированные последовательности СЗ

ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность (SEQ ID NO 308-347, соответственно, по порядку)	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NO 348-388, соответственно, по порядку)
AD-60149.1	A-121853.1	CfsgsUfgGfuCfaAfgGfGfuCfuUfcUfcUfl96	A-121854.1	asGfsaGfaGfaAfgAfcuUfgAfcCfaCfsgusa
AD-60151.1	A-121885.1	AfscsGfuGfgUfcAfaGfgUfcUfuCfuAfl96	A-121886.1	usAfsGfgAfaGfaCfcuuGfaCfcAfcGfusasg
AD-60152.1	A-121901.1	UfsusUfgAfcCfuCfaUfgGfuGfuUfcUfgL96	A-121902.1	csAfcGfaAfcAfcCfaugAfgGfuCfaAfasgsg
AD-60153.1	A-121917.1	GfsgsAfgAfaUfuGfCfuCfaUfaCfaAfl96	A-121918.1	usUfsuUfgUfaUfgAfgcAfaUfuCfuCfcsusc
AD-60154.1	A-121933.1	UfsgsUfuAfaAfuGfGfCfuGfaUfcCfuGfafl96	A-121934.1	usCfscAfgGfaUfcAfgccAfuUfuAfaCfasgsc
AD-60155.1	A-121855.1	GfsasCfaGfaCfaAfgAfcCfaUfaCfaCfl96	A-121856.1	gsUfsgUfaGfaUfgGfuuUfgUfcUfgUfcsusg
AD-60156.1	A-121871.1	CfscsAfgAfcAfcAfaGfaCfaCfuAfl96	A-121872.1	usAfsGfgUfcUfuGfuCfuCfuGfsgasu
AD-60157.1	A-121887.1	CfscsAfgAfuCfcAfcUfuCfaCfaAfl96	A-121888.1	usUfscUfgUfgUfaGfaUfgAfuCfuGfsgusa
AD-60158.1	A-121903.1	UfsusGfaCfcUfcAfuUfgUfgUfuCfuGfafl96	A-121904.1	usCfsaCfaCfaCfcuuGfaGfgUfcAfasasg
AD-60159.1	A-121919.1	CfscsCfcUfuCfuAfgGfGfuCfaCfaAfl96	A-121920.1	asUfsuAfcUfgUfgAfcuUfgGfgGfsgusc
AD-60160.1	A-121935.1	AfsusGfaAfaAfaAfcUfuGfuGfgUfuUfl96	A-121936.1	asAfcAfgCfcAfcAfcuuUfuUfuUfcAfususc
AD-60161.1	A-121857.1	AfsgsAfcAfgAfcAfaGfaCfaCfuAfl96	A-121858.1	usGfsuAfgAfuGfgUfcuuGfuCfuGfcsusg
AD-60162.1	A-121873.1	CfscsAfgAfuCfcAfcUfuCfaCfaGfaCfl96	A-121874.1	gsUfcUfuGfgUfgAfguGfgAfuCfuGfsgusa
AD-60163.1	A-121889.1	AfsgsGfgAfuCfuGfUfgUfgCfaGfaCfl96	A-121890.1	usGfsgUfcUfgCfcAfcAfcAfuCfuUfcsusu
AD-60164.1	A-121905.1	GfsasCfaAfgAfcCfaUfcUfaCfaCfcUfl96	A-121906.1	asGfsgGfgUfgUfaGfaugGfuCfuUfgUfcsusg
AD-60165.1	A-121921.1	GfscsUfgAfgGfaGfaAfuUfgUfuAfl96	A-121922.1	usAfsuGfaAfgCfaAfuucUfcCfuCfaGfcsasc
AD-60166.1	A-121859.1	AfscsGfuGfgUfcAfaGfgUfcUfuCfuCfl96	A-121860.1	gsAfsGfgAfaGfaCfcuuGfaCfcAfcGfusasg
AD-60167.1	A-121875.1	GfsgsAfuCfuGfuGfUfgCfaGfaCfcUfl96	A-121876.1	asGfsgGfgUfcUfgCfcAfcAfcAfuCfcsusu
AD-60168.1	A-121891.1	AfscsAfgAfcAfaGfAfcAfuCfuAfcAfl96	A-121892.1	usGfsuGfaAfgAfuGfgUfcUfuCfuGfscusu
AD-60169.1	A-121907.1	AfsusCfcAfgAfcAfgAfcAfaGfaCfuAfl96	A-121908.1	asAfsuGfgUfcUfuGfuuGfuCfuGfgAfusgsa
AD-60170.1	A-121923.1	CfsusCfcGfuGfuGfGfgUfgAfcUfuAfl96	A-121924.1	usUfsgAfcGfuCfcAfcAfcAfcAfgAfgsusc
AD-60171.1	A-121861.1	UfscsCfaGfaCfaGfAfcAfaGfaCfuUfl96	A-121862.1	asGfsaUfgGfuCfuUfgUfcUfgUfgGfasusg
AD-60172.1	A-121877.1	AfsgsGfgAfuCfuGfUfgUfgCfaGfaCfcUfl96	A-121878.1	gsGfsgUfcUfgCfcAfcAfcAfuCfuUfcsusu
AD-60173.1	A-121893.1	CfsasAfgAfaAfgGfgAfuCfuGfuGfgAfl96	A-121894.1	usCfscAfcAfcAfgAfcuUfuCfuUfcsusc
AD-60174.1	A-121909.1	UfsgsAfcCfuCfaUfgGfgUfuUfcGfuUfl96	A-121910.1	asUfscAfcGfaAfcAfcAfcUfgAfgUfcfasasa
AD-60175.1	A-121925.1	GfscsAfgCfuAfaAfaGfgCfuUfuGfaUfl96	A-121926.1	asAfsGfgUfcAfaAfgUfcuuUfuAfgCfuGfcsasg
AD-60176.1	A-121863.1	CfsasUfcCfaGfaCfaAfcAfaAfcAfl96	A-121864.1	asUfsgGfuCfuUfgUfcUfgUfgGfaUfcsasa
AD-60177.1	A-121879.1	AfscsAfgAfcAfaGfAfcAfuCfuAfcAfl96	A-121880.1	gsGfsuGfaAfgAfuGfgUfcUfuCfuGfscusu
AD-60178.1	A-121895.1	AfsusCfcAfgAfcAfcAfaGfaCfuAfl96	A-121896.1	gsAfsuGfgUfcUfuGfuuGfuCfuGfgAfusgsa
AD-60179.1	A-121911.1	UfsusUfgAfcCfuCfaUfgGfuGfuUfcUfl96	A-121912.1	asAfcGfaAfcAfcCfaugAfgGfuCfaAfasgsg
AD-60180.1	A-121927.1	GfsgsAfuGfcCfaAfgAfaCfaCfuAfl96	A-121928.1	asUfscAfuAfgUfgUfcuUfgGfaCfuCfcsusg
AD-60181.1	A-121865.1	AfsasGfaAfaGfgGfAfuUfgUfgGfgAfl96	A-121866.1	usGfscCfaCfaCfaCfaucCfuUfuUfcsusu
AD-60182.1	A-121881.1	CfsasAfgAfaAfgGfgAfuCfuGfuGfgCfl96	A-121882.1	gsCfscAfcAfcAfcAfcuUfuCfuUfcsusc
AD-60183.1	A-121897.1	UfsasCfgUfgGfuCfaAfgGfgUfuUfl96	A-121898.1	asGfsaGfaAfgAfcCfuugAfcCfaCfuUfasgsg
AD-60184.1	A-121913.1	CfsasGfuUfuCfuAfgGfgUfuGfuGfgAfl96	A-121914.1	usCfscAfcUfaUfgAfcuUfgAfaCfuUfcsusg
AD-60185.1	A-121929.1	CfsgsUfgCfcGfaAfgGfgAfaUfcAfgAfl96	A-121930.1	asUfsuCfuGfaUfuCfcuuCfcGfgCfcsasc
AD-60186.1	A-121867.1	GfsasAfaGfgGfaUfcUfgUfgGfgAfl96	A-121868.1	usCfsuGfcCfaCfaCfagaUfcCfuUfcsusu
AD-60187.1	A-121883.1	GfsasCfaGfaCfaAfgAfcCfaUfaCfaAfl96	A-121884.1	usUfsgUfaGfaUfgGfuuUfgUfcUfgUfcsusg
AD-60188.1	A-121899.1	UfsgsAfcCfuCfaUfgGfgUfuUfcGfuGfaCfl96	A-121900.1	gsUfscAfcGfaAfcAfcAfcUfgAfgUfcfasasa
AD-60189.1	A-121915.1	UfsgsUfaAfaAfuUfcGfaCfcUfcAfl96	A-121916.1	csUfsuGfaGfgUfcGfaauUfuAfuUfaCfasgsg
AD-60190.1	A-121931.1	AfsasCfuAfcAfuGfAfcCfuAfcAfgAfl96	A-121932.1	usCfsuCfuGfaAfgGfuuCfuGfaUfgUfcsusg

Таблица 7. Немодифицированные последовательности С9

ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность (SEQ ID NO 389-411, соответственно, по порядку)	Положение в NM_001737.3	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NO 412-434, соответственно, по порядку)	Положение в NM_001737.3
AD-59663.1	A-121046.1	UUUUGACAAUGAGUUCUACAA	606-626	A-121047.1	UUGUAGAACUCAUUGUCAAAAGG	604-626
AD-59664.1	A-121062.1	AUCAAUGAAUUUAGUGUAAGA	1597-1617	A-121063.1	UCUUACACUAAAUUCAUUGAUAU	1595-1617
AD-59665.1	A-121078.1	AGACAAAUGUUUCGUUCAAGA	268-288	A-121079.1	UCUUGAACGAAACAUUUGUCUGA	266-288
AD-59668.1	A-121048.1	CUUUUGACAAUGAGUUCUACA	605-625	A-121049.1	UGUAGAACUCAUUGUCAAAAGGU	603-625
AD-59669.1	A-121064.1	AACUUGGAAAGAGCCAUUGAA	1570-1590	A-121065.1	UUCAUUGGCUCUUUCCAAGUUUU	1568-1590
AD-59670.1	A-121080.1	UACCUAGAGAAGCUGAUUAACA	2589-2609	A-121081.1	UGUUAUACAGCUUCUCAGGUAGG	2587-2609
AD-59673.1	A-121050.1	ACCUUUUGACAAUGAGUUCUA	603-623	A-121051.1	UAGAACUCAUUGUCAAAAGGUGU	601-623
AD-59674.1	A-121066.1	GACUCGCGAAAUUGACUUUCA	391-411	A-121067.1	UUGAAAGUCAUUUCCGAGUCAU	389-411
AD-59675.1	A-121082.1	GCCCAUCAAUUUAGAGGGAA	1682-1702	A-121083.1	UUCUCAAUUUUGAAUUGGGCAG	1680-1702
AD-59678.1	A-121052.1	UUUUGGAUAAAGCUCCAUGA	1175-1195	A-121053.1	UCAUGGAAGCUUUAUCCAAAACA	1173-1195
AD-59679.1	A-121068.1	AACCAAAGGCGAGAAAUUUU	708-728	A-121069.1	AAAUUUUUCUCGCCUUUGUUUUC	706-728
AD-59680.1	A-121084.1	CUUUGCCAACUACCUAUGAAA	1067-1087	A-121085.1	UUUCAUAGGUAGUUGGCAAAGCU	1065-1087
AD-59683.1	A-121054.1	CACCUUUUGACAAUGAGUUCU	602-622	A-121055.1	AGAACUCAUUGUCAAAAGGUGUG	600-622
AD-59684.1	A-121070.1	GAGAAGACAUCAAUUUUUAU	781-801	A-121071.1	AUUAAAAUUUGAUGUCUUCUCU	779-801
AD-59685.1	A-121086.1	GACAAUGAGUUCUACAUGGA	610-630	A-121087.1	UCCAUUGUAGAACUCAUUGUCA	608-630
AD-59688.1	A-121056.1	UUUGGAUAAAGCUUCAUGAA	1176-1196	A-121057.1	UUCAUGGAAGCUUUAUCCAAAAC	1174-1196
AD-59689.1	A-121072.1	AUCUAUGAAACCAAAGGCGAG	700-720	A-121073.1	CUCGCCUUUGUUUCAUAGAUCA	698-720
AD-59690.1	A-121088.1	AUAUCAUUGAAUUUAGUGUAA	1595-1615	A-121089.1	UUACACUAAAUCUUAUUGAUUAG	1593-1615
AD-59692.1	A-121058.1	CACACUUUUGACAAUGAGUU	600-620	A-121059.1	AACUCAUUGUCAAAAGGUGUGCU	598-620
AD-59693.1	A-121074.1	UAGGGUCUGAGACUUUUUGAA	2648-2668	A-121075.1	UUCAAAAGGUCUCAGACCCUAAG	2646-2668
AD-59694.1	A-121090.1	CAAAACUUGGAAAGAGCCAUU	1567-1587	A-121091.1	AAUGGCUCUUCCAAGUUUUGUU	1565-1587
AD-59696.1	A-121060.1	GCACACUUUUGACAAUGAGUx	599-619	A-121061.1	ACUCAUUGUCAAAAGGUGUGCUU	597-619
AD-59697.1	A-121076.1	UGAAACCAAAGGCGAGAAAA	705-725	A-121077.1	UUUUUCUGCCUUUGGUUUAUAU	703-725

Таблица 8. Модифицированные последовательности С9

ID дуплекса	ID смысловой	Смысловая последовательность (SEQ ID NO 435-457, соответственно, по порядку)	ID антисмысловой	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NOS 458-480, соответственно, по порядку)
AD-59663.1	A-121046.1	UfsusUfuGfaCfaAfuFgfaGfuUfcUfaCfaAfl96	A-121047.1	usUfsgUfaGfaAfcUfcauUfgUfcAfaAfasgsg
AD-59664.1	A-121062.1	AfsusCfaAfuGfaAfuUfuUfgUfaAfgAfl96	A-121063.1	usCfsuUfaCfaCfuAfaauUfcAfuUfgAfasasu
AD-59665.1	A-121078.1	AfsgsAfcAfaAfuGfuUfuUfgUfaAfgAfl96	A-121079.1	usCfsuUfgAfaCfGfaAfaCfuUfuGfcUfsgsa
AD-59668.1	A-121048.1	CfsusUfuUfgAfcAfaUfgUfaAfgAfl96	A-121049.1	usGfsuAfgAfaCfuCfauuGfuCfaAfaAfgsgsu
AD-59669.1	A-121064.1	AfsasCfuUfgGfaAfaGfaGfcCfaUfuGfaAfl96	A-121065.1	usUfscAfaUfgGfcUfcuuUfcCfaAfgUfususu
AD-59670.1	A-121080.1	UfsasCfcUfgAfaAfaGfcUfgAfuUfaAfcAfl96	A-121081.1	usGfsuUfaAfuCfaGfcuuCfuCfaGfgUfasgsg
AD-59673.1	A-121050.1	AfscsCfuUfuUfgAfcAfaUfgAfuUfuUfaAfl96	A-121051.1	usAfsGfaCfuCfaUfuguCfaAfaAfgUfsgsu
AD-59674.1	A-121066.1	GfsasCfuGfcGfgAfaAfuGfaCfuUfuCfaAfl96	A-121067.1	usUfsgAfaAfgUfcAfuuuCfcGfcAfgUfcsasu
AD-59675.1	A-121082.1	GfscsCfcAfuUfcAfaAfuUfuGfaGfgGfaAfl96	A-121083.1	usUfscCfcUfcAfaAfuuuGfaAfuGfgGfcsasg
AD-59678.1	A-121052.1	UfsusUfuGfgAfuAfaAfgCfuUfcCfaUfgAfl96	A-121053.1	usCfsaUfgGfaAfgCfuuuUfaCfaAfaAfascsa
AD-59679.1	A-121068.1	AfsasCfcAfaAfgGfcGfaGfaAfaUfuUfl96	A-121069.1	asAfsaUfuUfuUfcUfscCfuUfuGfgUfususc
AD-59680.1	A-121084.1	CfsusUfuGfcCfaAfcUfaCfcUfaUfgAfaAfl96	A-121085.1	usUfsuCfaUfaGfgUfaguUfgGfcAfaAfgscsu
AD-59683.1	A-121054.1	CfsasCfcUfuUfuGfaAfcAfuGfaGfuUfuUfl96	A-121055.1	asGfsaAfcUfcAfuUfgucAfaAfaGfgUfsgsusg
AD-59684.1	A-121070.1	GfsasGfaAfgAfcAfuUfcAfaUfuUfuUfaUfl96	A-121071.1	asUfsuAfaAfaUfuUfgauGfuUfuUfcsusu
AD-59685.1	A-121086.1	GfsasCfaAfuGfaGfuUfcUfaCfaAfuGfgAfl96	A-121087.1	usCfscAfuUfgUfaGfaacUfcAfuUfgUfcsasa
AD-59688.1	A-121056.1	UfsusUfgGfaUfaAfaGfcUfuCfcAfuGfaAfl96	A-121057.1	usUfscAfuGfgAfaGfcuuUfaUfcCfaAfasasc
AD-59689.1	A-121072.1	AfsusCfuAfuGfaAfaAfcCfaAfaAfgGfcGfaGfl96	A-121073.1	csUfscGfcCfuUfuGfguuUfcAfuAfgAfuscsa
AD-59690.1	A-121088.1	AfsusAfuCfaAfuGfaAfuUfuUfgUfaAfl96	A-121089.1	usUfsaCfaCfuAfaAfuucAfuUfgAfuAfasasg
AD-59692.1	A-121058.1	CfsasCfaCfuUfuUfgGfaCfaAfuGfaGfuUfl96	A-121059.1	asAfsuUfcAfuUfgUfcaAfaGfgUfgUfsgscsu
AD-59693.1	A-121074.1	UfsasGfgGfuCfuUfgAfaCfcUfuUfuGfaAfl96	A-121075.1	usUfscAfaAfaGfgUfcuAfgAfcCfcUfasasg
AD-59694.1	A-121090.1	CfsasAfaAfcUfuUfgGfaAfgAfcCfuUfl96	A-121091.1	asAfsuGfgCfuCfuUfuccAfaGfuUfuUfsgusu
AD-59696.1	A-121060.1	GfscsAfcAfcCfuUfuUfgAfcAfaUfgAfuUfl96	A-121061.1	asCfsuCfaUfuGfuCfaaaAfgGfuGfuGfcsusu
AD-59697.1	A-121076.1	UfsgsAfaAfcCfaAfaGfgCfGfgAfaAfaAfl96	A-121077.1	usUfsuUfuCfuCfGfcuuUfgGfuUfuCfasusa

Таблица 9. Скрининг в отношении разовой дозы для СFB в клетках Нер3В

	10 нМ	0,1 нМ	10 нМ, SD	0,1 нМ, SD
AD-60315.1	22,82	17,15	20,03	9,73
AD-60326.1	9,33	17,49	0,29	4,75
AD-60303.1	8,45	28,08	4,67	10,75
AD-60331.1	14,47	29,99	4,36	4,99
AD-60344.1	17,61	30,59	6,96	1,70
AD-60345.1	8,98	33,88	0,65	7,11
AD-60319.1	14,36	33,98	1,17	12,16
AD-60308.1	12,64	34,07	0,19	11,41
AD-60332.1	20,19	35,92	3,53	3,23
AD-60313.1	23,94	38,26	19,92	13,16
AD-60321.1	13,32	46,50	4,83	1,00
AD-60327.1	18,44	50,40	6,45	5,21
AD-60302.1	13,82	53,31	4,21	12,46
AD-60325.1	11,73	54,59	0,27	15,34
AD-60337.1	16,17	56,04	3,64	33,50
AD-60333.1	17,72	65,14	2,22	8,79
AD-60314.1	27,79	67,44	2,02	9,10
AD-60320.1	18,12	85,78	5,39	33,24
AD-60339.1	20,86	88,73	9,59	10,47
AD-60338.1	18,14	91,03	4,11	10,07
AD-60307.1	21,76	91,13	3,49	43,21
AD-60309.1	20,64	95,13	0,34	53,77
AD-60343.1	61,82	112,57	5,56	17,11
AD-60324.1	24,20	81,08	3,41	18,95
AD-60318.1	43,11	99,07	13,83	17,69
AD-60300.1	35,21	111,33	5,35	12,86
AD-60330.1	58,80	111,85	8,86	32,76
AD-60306.1	85,87	113,97	12,01	33,11
AD-60336.1	35,90	119,80	3,75	4,92
AD-60301.1	28,95	121,90	7,73	23,23
AD-60342.1	49,16	123,56	17,53	14,88
AD-60334.1	26,12	55,28	22,52	7,86
AD-60304.1	20,62	74,38	4,43	16,50
AD-60310.1	18,93	77,08	0,87	35,20
AD-60328.1	63,55	86,20	1,91	4,07
AD-60322.1	81,67	86,30	21,22	25,58
AD-60316.1	105,01	93,22	8,55	14,39
AD-60346.1	109,11	99,09	2,07	25,51
AD-60335.1	42,63	101,00	5,91	54,15
AD-60323.1	81,31	103,20	4,03	3,86
AD-60340.1	50,41	109,25	20,73	1,67
AD-60305.1	30,06	114,59	5,00	17,97
AD-60317.1	102,87	126,87	1,95	30,25
AD-60329.1	106,30	131,90	0,20	53,49
AD-60341.1	112,98	137,99	3,94	31,92
AD-60311.1	162,39	140,07	10,04	63,65

Таблица 10. Скрининг в отношении разовой дозы для СФВ в первичных гепатоцитах мыши

	Средн. 10 нМ	Средн. 0,1 нМ	10 нМ, SD	0,1 нМ, SD
AD-60302.1	112,73	109,72	15,29	1,75
AD-60303.1	119,44	102,70	0,15	23,82
AD-60307.1	67,92	99,67	2,91	6,47
AD-60308.1	116,89	111,68	12,15	4,51
AD-60309.1	100,72	112,85	10,72	4,84
AD-60313.1	50,21	102,05	10,08	4,13
AD-60314.1	74,12	113,15	4,99	12,59
AD-60315.1	101,22	104,79	6,07	29,27
AD-60319.1	18,56	81,28	4,22	6,27
AD-60320.1	103,08	123,28	8,71	18,51
AD-60321.1	45,03	104,98	3,91	25,35
AD-60325.1	121,99	127,67	4,63	24,72
AD-60326.1	55,24	102,10	4,66	13,35
AD-60327.1	79,42	108,21	4,77	21,99
AD-60331.1	4,51	52,03	0,35	8,06
AD-60332.1	115,05	120,93	6,06	4,00
AD-60333.1	102,19	113,88	0,38	31,81
AD-60337.1	3,93	31,08	1,12	0,49
AD-60338.1	120,85	115,74	9,02	8,93
AD-60339.1	16,97	75,02	0,27	10,17
AD-60343.1	126,10	131,79	24,11	14,66
AD-60344.1	8,06	35,14	0,31	11,86
AD-60345.1	132,64	133,75	7,96	27,82
AD-60300.1	27,05	81,40	8,63	8,86
AD-60301.1	10,24	72,49	0,46	5,41
AD-60306.1	97,07	114,32	4,87	18,27
AD-60318.1	37,73	98,00	3,09	7,56
AD-60324.1	42,83	99,93	1,21	12,09
AD-60330.1	70,05	116,47	1,46	15,23
AD-60336.1	31,97	95,19	13,63	1,75
AD-60342.1	38,22	108,31	4,90	6,76
AD-60304.1	7,88	18,03	3,57	18,03
AD-60305.1	13,09	64,61	2,19	11,26
AD-60310.1	1,36	21,17	0,24	1,27
AD-60311.1	2,11	28,70	0,22	4,79
AD-60316.1	2,23	28,29	1,11	4,66
AD-60317.1	60,25	84,11	5,23	5,66
AD-60322.1	70,53	115,47	1,47	11,72
AD-60323.1	108,71	117,31	17,38	7,90
AD-60328.1	4,04	38,52	0,21	10,03
AD-60329.1	6,73	36,47	0,21	8,72
AD-60334.1	49,74	99,41	2,74	8,64
AD-60335.1	34,99	99,57	3,64	1,59
AD-60340.1	99,13	106,94	5,71	9,81
AD-60341.1	92,74	112,17	0,34	8,10
AD-60346.1	5,65	53,30	0,52	5,28

Таблица 11. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для СФВ в клетках Hep3В

ID дуплекса	IC50 в Hep3В (нМ)
AD-60303.1	0,119
AD-60326.1	0,062
AD-60319.1	0,351
AD-60331.1	0,225
AD-60337.1	0,418
AD-60344.1	0,347
AD-60304.1	>10
AD-60324.1	7,039

Таблица 12. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для СFB в первичных гепатоцитах мыши

ID дуплекса	IC50 в первичных гепатоцитах мыши (нМ)
AD-60303.1	Не достигнуто
AD-60326.1	4,063
AD-60319.1	0,162
AD-60331.1	0,031
AD-60337.1	0,014
AD-60344.1	0,003
AD-60304.1	0,028
AD-60324.1	0,854

Таблица 13. Скрининг в отношении разовой дозы для С9 в первичных гепатоцитах мыши

ID дуплекса	Средн. 10 нМ	Средн. 0,1 нМ	SD 10 нМ	SD 0,1 нМ
AD-59663.1	5,92	27,33	2,13	16,40
AD-59664.1	83,71	76,56	42,80	21,75
AD-59665.1	91,76	85,56	20,62	26,31
AD-59668.1	30,66	49,06	4,23	13,47
AD-59669.1	95,36	64,74	18,69	19,30
AD-59670.1	96,91	103,65	26,38	7,23
AD-59673.1	22,34	31,20	7,34	20,44
AD-59674.1	12,16	45,36	5,13	14,79
AD-59675.1	93,18	109,59	3,77	8,45
AD-59678.1	47,33	47,23	14,22	6,86
AD-59679.1	98,53	30,06	12,88	32,30
AD-59680.1	33,75	86,68	1,20	28,07
AD-59683.1	25,81	44,31	9,78	23,12
AD-59684.1	58,89	96,75	16,45	21,05
AD-59685.1	68,90	115,36	8,17	6,36
AD-59688.1	32,69	41,63	6,49	21,72
AD-59689.1	86,86	102,46	24,47	0,38
AD-59690.1	101,98	131,95	4,87	0,16
AD-59692.1	33,98	36,81	9,73	3,38
AD-59693.1	84,70	75,60	35,91	16,09
AD-59694.1	108,88	132,73	2,53	45,43
AD-59696.1	32,87	45,82	9,72	15,79
AD-59697.1	110,00	120,20	1,21	3,98
AD-1955	109,44	92,04	24,08	32,14
AD-1955	105,93	104,33	4,54	6,01
AD-1955	87,62	93,01	6,11	3,30
AD-1955	90,95	117,91	3,90	29,31
AD-1955	91,04	93,49	6,80	8,35
AD-1955	106,63	107,78	1,44	9,89
AD-1955	95,33	82,10	9,45	2,92
AD-1955	123,15	121,27	44,13	11,42

Таблица 14. Скрининг в отношении разовой дозы для С3 в первичных гепатоцитах мыши

ID дуплекса	Средн. 10 нМ	Средн. 0,1 нМ	10 нМ, SD	0,1 нМ, SD
AD-60149.1	0,08	33,89	0,04	44,73
AD-60151.1	0,11	81,49	0,14	7,88
AD-60152.1	1,72	92,02	0,89	9,34
AD-60153.1	93,57	97,06	17,16	4,16
AD-60154.1	97,73	122,73	0,66	28,17
AD-60155.1	12,94	91,38	17,39	9,28
AD-60156.1	8,02	41,58	9,16	56,27
AD-60157.1	23,61	98,22	33,22	8,77
AD-60158.1	0,75	77,42	0,76	8,61
AD-60159.1	100,47	93,53	11,61	7,44
AD-60160.1	89,34	92,97	18,42	9,21
AD-60161.1	2,33	82,37	0,32	21,06
AD-60162.1	60,59	46,83	1,37	65,96
AD-60163.1	104,09	53,32	5,42	75,38
AD-60164.1	61,13	40,41	5,57	57,13
AD-60165.1	61,93	86,61	4,44	11,53
AD-60166.1	2,27	96,48	0,70	17,52
AD-60167.1	87,51	84,41	3,70	9,19
AD-60168.1	35,16	98,47	0,28	20,95
AD-60169.1	0,42	51,78	0,13	18,79
AD-60170.1	125,00	99,12	1,46	12,72
AD-60171.1	0,44	59,53	0,01	1,82
AD-60172.1	89,05	102,11	4,20	10,62
AD-60173.1	81,29	95,39	16,08	3,86
AD-60174.1	0,06	25,26	0,02	31,64
AD-60175.1	0,89	80,59	0,23	6,61
AD-60176.1	0,88	52,71	0,02	6,12
AD-60177.1	63,14	85,00	16,41	9,25
AD-60178.1	42,97	64,33	4,75	14,00
AD-60179.1	0,12	54,36	0,01	6,05
AD-60180.1	94,57	98,11	13,68	5,65
AD-60181.1	69,28	85,66	6,99	31,48
AD-60182.1	84,22	79,05	2,63	8,99
AD-60183.1	0,08	44,17	0,05	7,27
AD-60184.1	80,50	81,13	9,59	14,73
AD-60185.1	92,21	99,75	12,00	2,32
AD-60186.1	60,60	93,85	18,81	29,73
AD-60187.1	2,33	71,77	0,20	1,49
AD-60188.1	0,33	78,13	0,37	14,56
AD-60189.1	57,75	91,38	43,16	14,16
AD-60190.1	29,40	94,84	41,57	7,55
AD-1955	103,85	90,86	8,96	3,45
AD-1955	71,27	115,36	36,17	13,40
AD-1955	99,16	95,85	5,16	8,09
AD-1955	112,29	104,37	3,65	12,88
AD-1955	108,44	97,01	1,40	0,36
AD-1955	118,26	109,90	2,10	12,76
AD-1955	98,09	98,72	11,81	1,81

Таблица 15. Скрининг в отношении разовой дозы для С3 в клетках Нер3В

ID дуплекса	Средн. 10 нМ	Средн. 0,1 нМ	10 нМ, SD	0,1 нМ, SD
AD-60149.1	7,49	55,90	7,75	4,41
AD-60151.1	24,05	101,65	14,22	8,27
AD-60152.1	16,58	112,51	10,66	19,82
AD-60153.1	20,13	22,40	22,87	3,76
AD-60154.1	24,21	112,90	8,93	25,58
AD-60155.1	20,48	68,97	2,10	1,73
AD-60156.1	18,22	66,39	0,80	1,67
AD-60157.1	29,07	125,72	5,80	8,08
AD-60158.1	81,03	105,18	14,03	14,20
AD-60159.1	27,58	92,91	4,77	2,22
AD-60160.1	11,49	60,48	4,68	11,60
AD-60161.1	27,49	80,57	10,88	16,13
AD-60162.1	49,58	89,22	3,76	6,06
AD-60163.1	91,18	99,19	5,14	21,40
AD-60164.1	33,93	85,93	4,07	1,00
AD-60165.1	5,54	13,05	0,43	2,69
AD-60166.1	35,21	81,66	21,31	14,48
AD-60167.1	106,64	115,02	8,09	39,17
AD-60168.1	26,91	92,99	2,50	5,86
AD-60169.1	10,66	49,63	6,66	17,36
AD-60170.1	52,73	104,43	2,71	22,03
AD-60171.1	23,77	60,35	7,94	7,27
AD-60172.1	143,57	99,22	8,09	11,58
AD-60173.1	100,25	108,80	12,25	44,49
AD-60174.1	16,68	92,68	0,45	45,25
AD-60175.1	24,94	42,14	4,74	7,68
AD-60176.1	17,30	66,19	8,83	13,81
AD-60177.1	50,71	116,18	20,19	1,49
AD-60178.1	22,65	90,84	5,82	15,23
AD-60179.1	15,21	85,30	3,55	23,07
AD-60180.1	45,91	93,35	16,19	28,54
AD-60181.1	63,50	109,82	10,07	14,56
AD-60182.1	110,82	121,62	1,09	6,78
AD-60183.1	13,82	69,24	8,64	3,35
AD-60184.1	26,47	97,94	9,64	9,88
AD-60185.1	41,42	103,45	7,77	2,47
AD-60186.1	72,24	88,39	6,37	51,31
AD-60187.1	9,49	51,15	3,28	11,65
AD-60188.1	55,44	95,66	7,05	30,36
AD-60189.1	52,59	89,41	4,25	20,79
AD-60190.1	16,67	95,38	1,22	11,83

Таблица 16. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для СЗ в первичных гепатоцитах мыши

ID дуплекса	IC50 в РМН (нМ)
AD-60149.1	0,03
AD-60152.1	1,03
AD-60156.1	0,19
AD-60165.1	1,96
AD-60169.1	0,04
AD-60171.1	0,04
AD-60174.1	0,01
AD-60175.1	0,54
AD-60176.1	0,05
AD-60179.1	0,03
AD-60183.1	0,03
AD-60187.1	0,24

Таблица 17. Скрининг в отношении дозозависимого эффекта для СЗ в клетках Hep3В

ID дуплекса	IC50 в Hep3В (нМ)
AD-60149.1	0,88
AD-60152.1	2,87
AD-60156.1	2,06
AD-60165.1	0,08
AD-60169.1	0,41
AD-60171.1	5,51
AD-60174.1	2,60
AD-60175.1	0,48
AD-60176.1	2,29
AD-60179.1	1,70
AD-60183.1	0,94
AD-60187.1	1,65

Пример 3. Скрининг *in vivo*.

Подгруппу из трех конъюгированных с GalNAc iRNA к CFB выбрали для дополнительной оценки *in vivo*, AD-60304, AD-60331 и AD-60344. Нуклеотидные последовательности смысловой и антисмысловой цепей у этих средств на основе iRNA приведены в табл. 18. Как указано в табл. 19, нуклеотидная последовательность AD-60304 точно подходит к нуклеотидным последовательностям мыши и крысы. Нуклеотидная последовательность AD-60331 и нуклеотидная последовательность AD-60344 имеет ошибочно спаривающиеся нуклеотиды ("ММ"; см. выделенные жирным шрифтом и подчеркиванием нуклеотиды) с геном мыши, но проявляет активность в гепатоцитах мыши.

Мышам C57BL/6 (N=3 на группу) вводили инъекцией подкожно либо 1 мг/кг, либо 10 мг/кг конъюгированных с GalNAc дуплексов или равный объем 1× фосфатно-буферного раствора Дульбекко (DPBS) (Life Technologies, кат. № 14040133). 96 ч спустя мышей умерщвляли и печени вырезали и подвергали быстрой заморозке в жидком азоте. Печень измельчали в 2000 Geno/Grinder (SPEX, SamplePrep, Metuchen, Нью-Джерси). Применяли приблизительно 10 мг порошка печени на образец для выделения РНК. Образцы сначала гомогенизировали в TissueLyserII (Qiagen Inc., Валенсия, Калифорния), а затем экстрагировали РНК с набора RNeasy 96 Universal Tissue Kit (Qiagen Inc., номер по каталогу 74881) в соответствии с протоколом производителя с использованием вакуум/отжим технологии. Концентрацию РНК измеряли с помощью NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Уилмингтон, Делавэр) и доводили до 100 нг/мкл. к ДНК получали и RT-PCR проводили, как описано выше.

На фиг. 2 демонстрируется эффективность iRNA к CFB в отношении ингибирования мРНК к CFB в дозе либо 1 мг/кг, либо 10 мг/кг. В дозе 10 мг/кг в среднем наблюдали приблизительно 80% сайленсинг для всех трех исследуемых iRNA. В дозе 1 мг/кг в среднем наблюдали приблизительно 30% сайленсинг для AD-60331 и AD-60344.

Способность AD-60331 подавлять экспрессию мРНК CFB *in vivo* также оценивали с использованием разовой дозы 1,25, 2,5 и 10 мг/кг. Мышам C57BL/6 вводили инъекцией подкожно следующие дозы, а 70 ч спустя мышей умерщвляли. Выделение РНК из печеней животных, получение к ДНК и RT-PCR осуществляли, как описано выше. На фиг. 3 демонстрируется, что AD-60331 снижает уровень мРНК к CFB дозозависимым образом с ED₅₀ приблизительно 2,5 мг/кг. Ожидается, что при введении субъектам людям эти iRNA будут еще более эффективны с учетом строения последовательностей.

Таблица 18

Дуплекс	Смысловая последовательность (SEQ ID NO 481-483, соответственно, по порядку)	Антисмысловая последовательность (SEQ ID NO 484-486, соответственно, по порядку)	вид
AD-60304.1	GfsasUfuGfaGfaAfGfGfuGfgCfGfUfuAfl96	usAfsaCfuCfGfCfcAfccuUfcUfcAfaUfcsasa	MR
AD-60331.1	AfsgsCfaAfcAfuGfUfGfuUfcAfaAfgUfcAfl96	usGfsaCfuUfuGfaAfcacAfuGfuUfgCfuscsa	HC
AD-60344.1	GfscsUfgUfgGfuGfUfCfuGfaGfuAfcUfuUfl96	asAfsaGfuAfcUfcAfgacAfcCfaCfaGfscsc	HC

Таблица 19

Дуплекс	Антисмысловая ММ к мышинной (выделена жирным и подчеркиванием) (SEQ ID NO 487-489, соответственно, по порядку)	Антисмысловая ММ к крысиной (выделена жирным и подчеркиванием) (SEQ ID NO 490-492, соответственно, по порядку)	IC50 в первичных гепатоцитах мышы (нМ)	IC50 в Нер3b (нМ)
AD-60304.1	UAACUCGCCACCUUCUCAAUCAA	UAACUCGCCACCUUCUCAAUCAA	0,028	2,876
AD-60331.1	UGACUUU <u>G</u> AACACAUG <u>U</u> UGCUCU	UGAC <u>U</u> UUGAACACAUG <u>U</u> UGCUCU	0,031	0,225
AD-60344.1	<u>A</u> AAGUACUCAGACACCAC <u>A</u> GCCC	<u>A</u> AAGUACUC <u>A</u> GACACCAC <u>A</u> GCCC	0,017	0,347

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (dsRNA) для ингибирования экспрессии компонента комплемента С3 в клетке, где указанная dsRNA содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечный участок,

где смысловая цепь содержит по меньшей мере 18 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-CGUGGUCAAGGUCUUCUCUCU-3' (SEQ ID NO: 225) и антисмысловая цепь содержит по меньшей мере 18 смежных нуклеотидов из нуклеотидной последовательности 5'-AGAGAGAAGACCUUGACCACGUA-3' (SEQ ID NO: 266),

где смысловая цепь имеет длину 18-21 нуклеотидов, а антисмысловая цепь имеет длину 18-23 нуклеотидов,

где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи являются модифицированными нуклеотидами, и по меньшей мере один из модифицированных нуклеотидов является 2'-О-метил-модифицированным нуклеотидом или 2'-фтор-модифицированным нуклеотидом, и

где по меньшей мере одна цепь конъюгирована с лигандом, который представляет собой одно или несколько производных N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

2. dsRNA по п.1, где по меньшей мере один модифицированный нуклеотид имеет нуклеотидную модификацию, выбранную из группы, состоящей из LNA, CRN, сЕТ, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтила, 2'-О-метила, 2'-О-алкила, 2'-О-аллила, 2'-С-аллила, 2'-фтора, 2'-дезокси, 2'-гидроксила и их комбинаций.

3. dsRNA по п.1, где все модифицированные нуклеотиды независимо содержат 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

4. dsRNA по п.1, где указанное средство дополнительно содержит по меньшей мере одну фосфориатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

5. Выделенная клетка, содержащая dsRNA по п.1.

6. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена компонента комплемента С3, содержащая dsRNA по п.1.

7. Способ ингибирования экспрессии гена компонента комплемента С3 в клетке, включающий:

(а) приведение клетки в контакт с dsRNA по п.1 или фармацевтической композицией по п.6; и

(б) поддержание клетки, полученной на стадии (а), в течение времени, достаточного для разрушения транскрипта мРНК гена компонента комплемента С3 с ингибированием тем самым экспрессии гена компонента комплемента С3 в клетке.

8. Способ по п.7, где указанная клетка находится в субъекте.

9. Способ по п.8, где субъектом является человек.

10. Способ по п.9, где субъект-человек страдает от заболевания, связанного с компонентом комплемента С3.

11. Способ по п.10, где заболевание, связанное с компонентом комплемента С3, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), астмы, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, гломерулонефрита, псориаза, дерматомиозита с буллезным пемфигоидом, атипичного гемолитико-уремического синдрома, гемолитико-уремического синдрома, связанного с Шига-подобным токсином E.coli, миастении гравис, оптиконевромиелита, болезни плотного осадка, С3 невропатии, связанной с возрастом дегенерации желтого пятна, болезни холодных агглютининов, васкулита, связанного с антителами к цитоплазме нейтрофилов, реакций отторжения трансплантата, вызванных гу-

моральным и сосудистым механизмами, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда, сенсбилизированного реципиента трансплантата и сепсиса.

12. Способ лечения субъекта, страдающего нарушением, при котором снижение экспрессии компонента комплемента C3 окажет благоприятное воздействие, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества средства по п.1 или фармацевтической композиции по п.6 с лечением тем самым указанного субъекта.

13. dsRNA по п.1, в котором двухцепочный участок составляет 18-21 нуклеотидных пар.

14. dsRNA по п.1, в котором антисмысловая цепь имеет длину 18-23 нуклеотида.

15. dsRNA по п.1, в котором антисмысловая цепь имеет длину 18-21 нуклеотид.

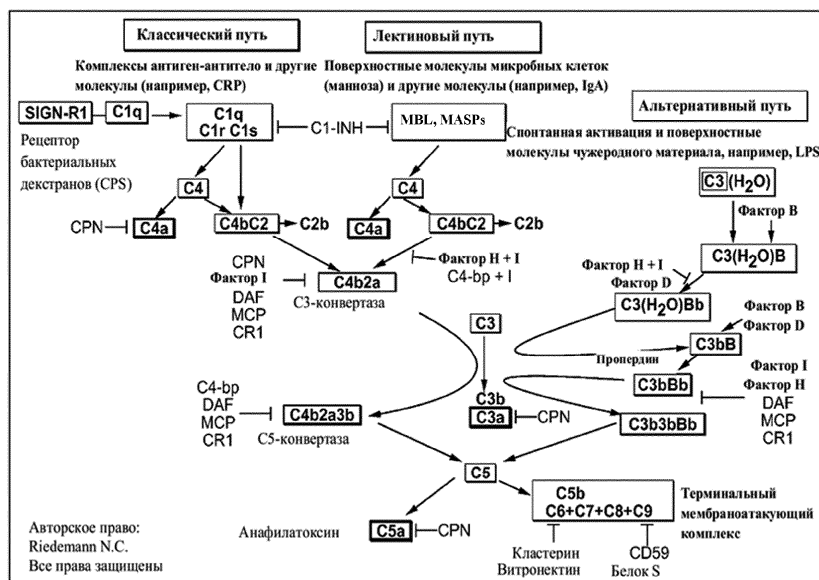
16. dsRNA по п.1, в котором по меньшей мере один из 5'-конца или 3'-конца смысловой цепи dsRNA является тупым концом.

17. dsRNA по п.16, в котором как 5'-конец, так и 3'-конец смысловой цепи dsRNA представляют собой тупой конец.

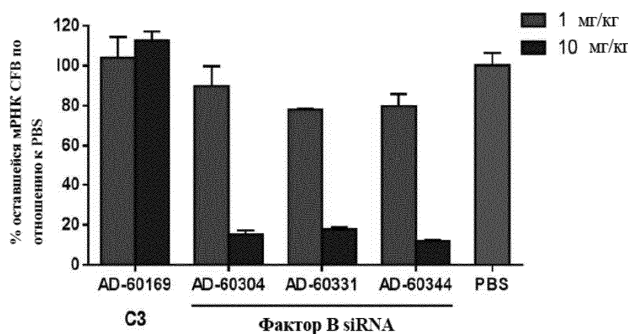
18. dsRNA по п.4, в котором фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

19. dsRNA по п.18, в котором фосфоротиоатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи.

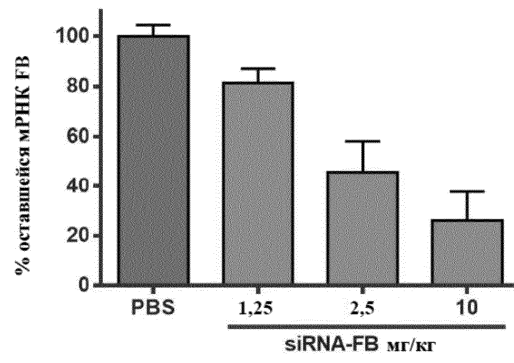
20. dsRNA по п.19, в котором цепь представляет собой антисмысловую цепь.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

