

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292182** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.14

(22) Дата подачи заявки
2021.01.22

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ РНК-АГЕНТА ГЕНА БОГАТОЙ ЛЕЙЦИНОВЫМИ ПОВТОРАМИ КИНАЗЫ 2 (LRRK2) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/965,452; 63/138,717**

(32) **2020.01.24; 2021.01.18**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/014729**

(87) **WO 2021/150969 2021.07.29**

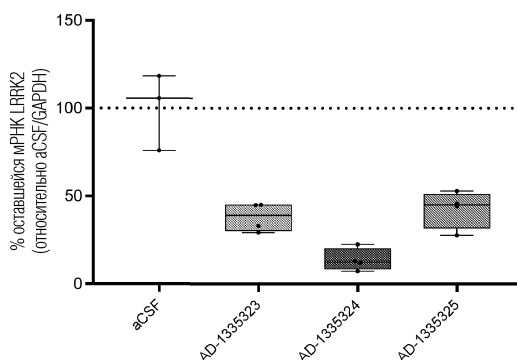
(71) Заявитель:
**ЭЛНИЛЭМ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Макайнинч Джеймс Д., Гилберт
Джейсон, Касторено Адам, Данг
Лан Тхи Хоанг, Леблан Сара, Пэн
Хайянь, Каитганис Чараламбос,
Соундарапандиан Мангала Минакши
(US)**

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

(57) Изобретение относится к агентам и композициям на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНКи), нацеленным на ген богатой лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2), а также к способам ингибирования экспрессии гена LRRK2 и способам лечения субъектов, страдающих заболеванием или расстройством, ассоциированным с LRRK2, например болезнью Паркинсона, с использованием таких агентов и композиций дцРНКи.

Соединение-инструмент для скрининга мышины LRRK2
300 мкг ICV сутки 30
Правое полушарие кПЦР



A1

202292182

202292182

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575073EA/032

КОМПОЗИЦИИ РНК-АГЕНТА ГЕНА БОГАТОЙ ЛЕЙЦИНОВЫМИ ПОВТОРАМИ КИНАЗЫ 2 (LRRK2) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/965452, поданной 24 января 2020 г., и заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 63/138717, поданной 18 января 2021 г. Содержание вышеприведенных заявок в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

Список последовательностей

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен посредством ссылки во всей своей полноте. Копия ASCII, созданная 20 января 2021 г., имеет название A108868_1010WO_SL.txt и имеет размер 170470 байт.

Уровень техники

Ген богатой лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2), кодирующий белок Lrrk2, расположен в хромосомной области 12q11.2-q13.1. Lrrk2 относится к семейству белков Росо суперсемейства Ras/ГТФазы. Высококонсервативный белок Lrrk2 состоит из 51 экзона с общим количеством аминокислот 2527, содержащих ферментативные домены, включая ROC-домен (комплекс Ras) ГТФазы и домен серин/треонинкиназы. Другие белок-взаимодействующие домены в белке Lrrk2 включают домен лейцин-богатых повторов, С-концевой домен повтора WD40 и повторяющиеся домены арматилло и анкирина.

Мутации в гене LRRK2 являются причиной доминантно наследуемой формы болезни Паркинсона (PD), прогрессирующего инвалидизирующего нейродегенеративного синдрома. Мутации LRRK2 ассоциировались с фенотипическими проявлениями лобно-височной долевого дегенерации, кортико-базальной дегенерации, дегенерацией дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции (SNpc), наличием телец Леви (нейрональные включения агрегированного α -синуклеина и других убиквитинированных белков) и ассоциированной болезни двигательных нейронов у пациентов. Мутации LRRK2 также были обнаружены при спорадических случаях PD с однонуклеотидными полиморфизмами (SNP), которые придают повышенную экспрессию LRRK2 (увеличение примерно в 2 раза), что может способствовать этиологии заболевания за счет установленной повышенной активности киназы. Учитывая сходство клинических проявлений семейной и спорадической PD, ассоциированной с LRRK2, вполне вероятно, что миссенс-мутации и/или делеционные мутации в LRRK2 играют критическую роль в этиологии семейной и спорадической PD.

В настоящее время отсутствует лечение болезни Паркинсона, и лечение направлено только на ослабление симптомов и улучшение качества жизни пациента по мере прогрессирования болезни. Следовательно, существует потребность в агентах, которые могут избирательно и эффективно ингибировать экспрессию гена LRRK2, чтобы можно

было эффективно лечить пациентов, страдающих расстройством, ассоциированным с LRRK2, например, болезнью Паркинсона.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям РНКи, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинговым комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена LRRK2. Ген LRRK2 может находиться в клетке, например, в клетке субъекта, такого как человек. Применение этих иРНК делает возможным целенаправленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена LRRK2) у млекопитающих.

иРНК по изобретению были разработаны для нацеливания на ген LRRK2, например, ген LRRK2, имеющий миссенс-мутацию и/или делеционную мутацию в экзонах гена, и имеют комбинацию нуклеотидных модификаций. иРНК по изобретению ингибируют экспрессию гена LRRK2, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90% или, по меньшей мере, примерно на 95% относительно контрольных уровней, и снижают уровень смысловых и антисмысловых фокусов. Не желая ограничиваться конкретной теорией, полагается, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств и специфических сайтов-мишеней или специфических модификаций в этих иРНК придают иРНК по изобретению повышенную эффективность, стабильность, активность, продолжительность действия и безопасность. В одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии LRRK2, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии LRRK2, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности к мРНК, кодирующей LRRK2, и где область комплементарности включает, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к агенту на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии LRRK2, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности к

мРНК, кодирующей LRRK2, и где область комплементарности включает, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 3-4 и 6-7.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидной последовательностей нуклеотидов 3383-3403, 2105-2125, 2356-2376, 5413-5433, 2603-2623, 3563-3583, 2192-2212, 3088-3108, 3105-3125, 2203-2223, 7348-7368, 7097-7117, 6319-6339, 3886-3906, 5190-5210, 3964-3984, 5138-5158, 1254-1274, 7098-7118, 7048-7068, 7050-7070, 2764-2784, 3087-3107, 7526-7546, 4849-4869, 5272-5292, 468-488, 7520-7540, 3720-3740, 4016-4036, 7792-7812, 2515-2535, 2286-2306, 4014-4034, 3721-3741, 2284-2304, 1896-1916, 3876-3896, 7788-7808, 4013-4033, 1275-1295, 7527-7547, 3606-3626, 7525-7545, 2356-2376, 3105-3125 и 5413-5433 из SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

В одном варианте смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 468-488, 1254-1274, 2105-2125, 2192-2212, 2203-2223, 2603-2623, 2764-2784, 3087-3107, 3088-3108, 3383-3403, 3563-3583, 3876-3896, 3886-3906, 3964-3984, 4849-4869, 5138-5158, 5190-5210, 5272-5292, 6319-6339, 7097-7117, 7098-7118 и 7348-7368 из SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-601140.1, AD-599927.1, AD-612673.1, AD-615420.1, AD-600406.1, AD-601294.1, AD-600013.1, AD-600853.1, AD-613382.1, AD-600024.1, AD-604701.1, AD-604452.1, AD-603747.1, AD-601616.1, AD-602766.1, AD-601694.1, AD-602734.1, AD-599139.1, AD-604453.1, AD-616783.1, AD-616785.1, AD-600566.1, AD-600852.1, AD-617239.1, AD-602466.1, AD-602848.1, AD-598424.1, AD-617233.1, AD-613965.1, AD-614239.1, AD-617466.1, AD-612820.1, AD-612611.1, AD-614237.1, AD-613966.1, AD-612609.1, AD-612246.1, AD-601606.1, AD-617462.1, AD-614236.1, AD-611650.1, AD-617240.1, AD-613851.1, AD-617238.1, AD-1335323.1, AD-1335325.1 и AD-1335324.1.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного из группы, состоящей из AD-1508169, AD-1508884, AD-1509672, AD-1509758, AD-1509769, AD-1510151, AD-1510311, AD-1510597, AD-1510598, AD-1510885, AD-1511039, AD-

1511351, AD-1511361, AD-1511439, AD-1512211, AD-1512479, AD-1512511, AD-1512593, AD-1513492, AD-1514197, AD-1514198 и AD-1514446.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность смысловой и антисмысловой цепи содержит любую из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи, представленных в любой из таблиц 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность смысловой и антисмысловой цепи содержит любую из нуклеотидных последовательностей смысловой нити, представленных в любой из таблиц 6 или 7.

В одном варианте осуществления смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая, так и антисмысловая цепь конъюгированы с одной или более липофильными группами.

В одном варианте осуществления липофильная группа конъюгирована с одним или более внутренними положениями в двухцепочечной области дцРНК-агента.

В одном варианте липофильная группа конъюгирована через линкер или носитель.

В одном варианте осуществления липофильность липофильной группы, определенная по значению коэффициента распределения октанол/вода ($\log K_{ow}$), превышает 0.

В одном варианте гидрофобность двухцепочечного РНКи-агента, определенная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы агента двухцепочечной РНКи превышает 0,2.

В одном варианте осуществления анализ связывания с белками плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием сывороточного белка альбумина человека.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент содержит, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид.

В одном варианте осуществления не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

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

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого нуклеотида дезокситимидина(dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, заблокированного нуклеотида, разблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидрокси-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата,

нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфонат, нуклеотида, содержащего аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, и конечного нуклеотида, связанного с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты; и их комбинаций.

В одном варианте осуществления модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-деокси-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-деокси-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых нуклеотидов дезокситимидинов (dT), заблокированного нуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

В одном варианте осуществления модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность 3'-концевых нуклеотидов дезокситимидинов (dT).

В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил-модификацию, GNA и 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит, по меньшей мере, одну фосфотиоатную межнауклеотидную связь.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент содержит 6-8 фосфотиоатных межнауклеотидных связей.

В одном варианте каждая цепь имеет длину не более 30 нуклеотидов.

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов.

Длина двухцепочечной области может составлять 15-30 пар нуклеотидов; 17-23 пары нуклеотидов в длину; 17-25 пар нуклеотидов в длину, 23-27 пар нуклеотидов в длину; 19-21 пара нуклеотидов в длину; или 21-23 пары нуклеотидов в длину.

Каждая цепь может иметь 19-30 нуклеотидов; 19-23 нуклеотида; или 21-23 нуклеотида.

В одном варианте осуществления одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, по меньшей мере, в одной цепи, например, через линкер или носитель.

В одном варианте осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением двух концевых положений от каждого конца, по меньшей мере, одной цепи.

В еще одном варианте осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением трех концевых положений от каждого конца, по меньшей мере, одной цепи.

В одном варианте осуществления внутренние положения не включают область сайта расщепления смысловой цепи.

В одном варианте осуществления внутренние положения включают все положения, кроме положений 9-12, где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи.

В другом варианте осуществления внутренние положения включают все положения, кроме положений 11-13, где нумерация начинается от 3'-конца смысловой цепи.

В одном варианте осуществления внутренние положения не включают область сайта расщепления антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 12-14, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления внутренние положения включают все положения, за исключением положений 11-13 в смысловой цепи, считая от 3'-конца, и положений 12-14 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца.

В одном варианте осуществления одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 в смысловой цепи и положений 6-10 и 15-18 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца каждой цепи.

В другом варианте осуществления одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 в смысловой цепи и положений 15 и 17 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца каждой цепи.

В одном варианте осуществления внутренние положения в двухцепочечной области не включают область сайта расщепления смысловой цепи.

В одном варианте осуществления смысловая цепь имеет длину 21 нуклеотид, антисмысловая цепь имеет длину 23 нуклеотида, и липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи.

В еще одном варианте липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

В еще одном варианте осуществления липофильная группа конъюгирована с положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

В одном варианте липофильная группа конъюгирована с положением 16 антисмысловой цепи.

В одном варианте липофильная группа представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

В одном варианте липофильная группа выбрана из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиноевой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, 1-пиренмасляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилксигексанола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О-3-(олеоил)литохолевой кислоты, О-3-(олеоил)холеновой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

В одном варианте липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

В одном варианте липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь.

В одном варианте липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

В одном варианте осуществления насыщенная или ненасыщенная C16 углеводородная цепь конъюгирована с положением 6, считая от 5'-конца цепи.

В одном варианте осуществления липофильная группа конъюгирована через носитель, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем положении(ях) или двухцепочечной области.

В одном варианте осуществления носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклическую группу, основанную на остове серинола или остове диэтаноламина.

В одном варианте липофильная группа конъюгирована с двухцепочечным иРНК-агентом через линкер, содержащий эфирную, тиоэфирную, карбамидную, карбонатную связь, аминосвязь, амидную, малеимидтиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

В одном варианте осуществления липофильная группа конъюгирована с азотистым основанием, группой сахара или межнуклеозидной связью.

В одном варианте осуществления липофильная группа или нацеливающий лиганд конъюгированы через биорасщепляемый линкер, выбранный из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинаций.

В одном варианте осуществления 3'-конец смысловой цепи защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, где указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолидинила, пиразолидинила, имидазолидинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит нацеливающий лиганд, который нацелен на ткань печени.

В одном варианте осуществления нацеливающий лиганд представляет собой GalNAc-конъюгат.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

В еще одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

В еще одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой, второй и третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющую связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

В еще одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, находящуюся в третьей межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой

межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

В еще одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в S_p-конфигурации, концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в R_p-конфигурации, и концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в R_p-конфигурации, либо в S_p-конфигурации.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

В одном варианте осуществления пара оснований в положении 1 от 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит в целом 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь содержит в целом 23 нуклеотида.

Настоящее изобретение также относится к клеткам и фармацевтическим композициям для ингибирования экспрессии гена, кодирующего LRRK2, включающим дцРНК-агенты по изобретению.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент находится в незабуференном растворе, таком как солевой раствор или вода.

В еще одном варианте осуществления дцРНК-агент находится в буферном растворе, таком как буферный раствор, содержащий ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию; или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования экспрессии гена LRRK2 в клетке, где способ включает приведение клетки в контакт с дцРНК-агентом по изобретению или фармацевтической композицией по изобретению, тем самым ингибируя экспрессию гена LRRK2 в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится в организме субъекта.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления у субъекта имеется расстройство, ассоциированное с LRRK2.

В одном варианте осуществления расстройство, ассоциированное с LRRK2, у субъекта представляет собой нейродегенеративное заболевание. В другом варианте осуществления расстройство, ассоциированное с LRRK2, у субъекта представляет собой болезнь глаз.

В одном варианте осуществления расстройство, ассоциированное с LRRK2, выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона или родственных расстройств и болезней глаз.

В некоторых вариантах осуществления контактирование клетки с дцРНК-агентом ингибирует экспрессию LRRK2, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90% или, по меньшей мере, примерно на 95% относительно контрольных уровней.

В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии LRRK2 снижает уровень белка LRRK2 в сыворотке крови субъекта, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90% или, по меньшей мере, примерно на 95% относительно контрольных уровней.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего заболеванием, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению, тем самым обеспечивая лечение субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики, по меньшей мере, одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2, включающему введение субъекту профилактически эффективного количества дцРНК-агента по изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, тем самым обеспечивая профилактику, по меньшей мере, одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2.

В одном варианте осуществления расстройство представляет собой расстройство, ассоциированное с LRRK2.

В некоторых вариантах осуществления расстройство, ассоциированное с LRRK2, выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона, болезни Крона и болезней глаз.

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

В одном варианте осуществления введение агента субъекту вызывает уменьшение накопления белка LRRK2.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент вводят субъекту в дозе примерно от 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент вводят субъекту подкожно.

В еще одном варианте осуществления дцРНК-агент вводят субъекту интратекально.

В еще одном варианте осуществления дцРНК-агент вводят субъекту

интрацистернально. Неограничивающее примерное интрацистернальное введение включает инъекцию в большую цистерну (мозжечково-медуллярную цистерну) путем субокципитальной пункции.

В одном варианте осуществления способы по изобретению дополнительно включают определение уровня LRRK2 в образце(ах) субъекта.

В одном варианте осуществления уровень LRRK2 в образце(ах) субъекта представляет собой уровень белка LRRK2 в образце(ах) крови, сыворотки или спинномозговой жидкости.

В одном варианте осуществления способы по изобретению дополнительно включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к набору, содержащему дцРНК-агент по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к флакону, содержащему дцРНК-агент по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к шприцу, содержащему дцРНК-агент по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к интратекальному насосу, содержащему дцРНК-агент по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 приведен график, показывающий снижение уровня мРНК LRRK2 в головном мозге (правом полушарии) после введения репрезентативных РНКи-агентов, AD-1335323.1, AD-1335324.1 или AD-1335325.1, мышам, которые экспрессируют мышинный LRRK2. Результаты демонстрируют снижение уровней мРНК LRRK2 у животных, которым вводили РНКи-агент, по сравнению с контрольными животными.

На фиг. 2 приведен график, показывающий относительное снижение уровня мРНК LRRK2 в головном мозге (правом полушарии), легком (левой доле) и почке (правой) после введения репрезентативных РНКи-агентов, AD-1335323.1, AD-1335324.1 или AD-1335325.1, мышам, которые экспрессируют мышинный LRRK2. Результаты показывают, что снижение уровней мРНК LRRK2 в легком (левой доле) и почке (правой) соответствует той же тенденции по КД, что и в головном мозге (правом полушарии), но в меньшей степени и с большей вариабельностью. При гистологическом исследовании в легких и почках признаков токсических эффектов не наблюдали.

На фиг. 3А-3В показано дозозависимое снижение экспрессии мРНК LRRK2, наблюдаемое при введении AD-1335324 в головной мозг мыши, экспрессирующей LRRK2. На фиг. 3А приведен график, показывающий снижение уровня мРНК LRRK2 в головном мозге (правом полушарии) после введения репрезентативного РНКи-агента AD-1335324.1

мышам, экспрессирующим мышинный LRRK2. Результаты демонстрируют дозозависимое снижение уровней мРНК LRRK2 у животных, которым вводили РНКи-агент, по сравнению с контрольными животными. На фиг. 3В приведен график, показывающий значение IC50 AD-1335324.1 в ЦНС. Было установлено, что абсолютное значение IC50 составляет 108,5 мкг.

На фиг. 4 приведен график, показывающий относительное снижение уровня мРНК LRRK2 в головном мозге (правом полушарии), легком (левой доле) и почке (правой) после введения репрезентативного РНКи-агента AD-1335324 мышам, экспрессирующим мышинный LRRK2. Результаты демонстрируют статистически значимое изменение KD в легком (левой доле) при использовании доз без наблюдаемого дозозависимого снижения мРНК LRRK2. В почке (правой) не наблюдали снижения уровня мРНК LRRK2 при введении различных доз в диапазоне от 10 до 300 мкг AD-1335324.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям РНКи, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинговым комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена LRRK2. Ген LRRK2 может находиться в клетке, например, в клетке субъекта, такого как человек. Применение этих иРНК делает возможным целенаправленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена LRRK2) у млекопитающих.

иРНК по изобретению были разработаны для нацеливания на ген LRRK2, например, ген LRRK2, имеющий миссенс-мутацию и/или делеционную мутацию в экзонах гена, и имеют комбинацию нуклеотидных модификаций. иРНК по изобретению ингибируют экспрессию гена LRRK2, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90% или, по меньшей мере, примерно на 95% относительно контрольных уровней, и снижают уровень смысловых и антисмысловых фокусов. Не желая ограничиваться конкретной теорией, полагается, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств и специфических сайтов-мишеней или специфических модификаций в этих иРНК придают иРНК по изобретению повышенную эффективность, стабильность, активность, продолжительность действия и безопасность.

Следовательно, настоящее изобретение также относится к способам применения композиций РНКи по настоящему изобретению для ингибирования экспрессии гена LRRK2 или для лечения субъекта, имеющего расстройство, при котором было бы полезно ингибирование или снижение экспрессии гена LRRK2, например, LRRK2-ассоциированного заболевания, например, нейродегенеративного заболевания, такого как болезнь Паркинсона или болезнь глаз.

РНК-агенты по настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую участок длиной примерно 30 нуклеотидов или меньше, 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 в длину, где эта область по существу комплементарна, по меньшей мере, участку транскрипта мРНК гена LRRK2, например, экзону LRRK2. В некоторых вариантах осуществления РНК-агенты по настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую участок длиной примерно 21-23 нуклеотидов, который по существу комплементарен, по меньшей мере, участку транскрипта мРНК гена LRRK2.

В некоторых вариантах осуществления РНК-агенты по настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), которая может включать более длинные цепи, например, до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотида в длину с участком, состоящим, по меньшей мере, из 19 последовательных нуклеотидов, который по существу комплементарен по меньшей мере участку транскрипта мРНК гена LRRK2. Эти РНК-агенты с более длинными антисмысловыми цепями предпочтительно включают вторую цепь РНК (смысловую цепь) длиной 20-60 нуклеотидов, где смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 18-30 последовательных нуклеотидов.

Применение этих РНК-агентов делает возможным целенаправленную деградацию и/или ингибирование мРНК гена LRRK2 у млекопитающих. Таким образом, способы и композиции, включающие указанные РНК-агенты, применимы для лечения субъекта, для которого было бы полезно снижение уровней или активности белка LRRK2, такого как субъект, страдающий LRRK2-ассоциированным заболеванием, таким как болезнь Паркинсона или болезнь глаз.

Следующее подробное описание раскрывает способы получения и применения композиций, содержащих РНК-агенты, для ингибирования экспрессии гена LRRK2, а также композиции и способы лечения субъектов, страдающих заболеваниями и расстройствами, при которых было бы полезно ингибирование или снижение экспрессии генов.

I. Определения

Для того чтобы настоящее раскрытие можно было легче понять, сначала приводятся определения некоторых терминов. Кроме того, следует отметить, что, когда указывается значение или диапазон значений параметра, то предполагается, что значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также являются частью этого раскрытия.

Артикли «а» и «an» используются здесь для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере, одного) грамматического объекта артикля. Например, «элемент» означает один элемент или более одного элемента, например, множество элементов.

Термин «включая» используется здесь для обозначения и используется взаимозаменяемо с выражением «включая, не ограничиваясь этим». Термин «или» используется здесь для обозначения и используется взаимозаменяемо с термином «и/или»,

если из контекста явно не следует иное.

Термин «примерно» используется здесь для обозначения типичных диапазонов допусков, используемых в данной области техники. Например, «примерно» можно понимать как примерно 2 стандартных отклонения от среднего значения. В некоторых вариантах осуществления примерно означает $\pm 10\%$. В некоторых вариантах осуществления примерно означает $\pm 5\%$. Когда термин «примерно» стоит перед рядом чисел или диапазонов, то подразумевается, что «примерно» может изменить каждое из чисел в ряду или диапазоне.

Термин «по меньшей мере» перед числом или рядом чисел понимается как включающий число, соседнее с термином «по меньшей мере», и все последующие числа или целые числа, которые могут быть включены логически, как ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере» 18 нуклеотидов из 21-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты означает, что 18, 19, 20 или 21 нуклеотид обладают указанным свойством. Когда выражение «по меньшей мере» стоит перед рядом чисел или диапазонов, то подразумевается, что «по меньшей мере» может изменить каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В рамках настоящего изобретения, термины «не более чем» или «или менее чем» понимаются как значение, смежное с выражением, и последовательные меньшие значения или целые числа, следующие из контекста, до нуля. Например, дуплекс с выступом из «не более 2 нуклеотидов» имеет выступ из 2, 1 или 0 нуклеотидов. Когда выражение «не более чем» стоит перед рядом чисел или диапазонов, то подразумевается, что «не более чем» может изменить каждое из чисел в ряду или диапазоне.

В рамках настоящего изобретения, термин «по меньшей мере, примерно» применительно к измеримому значению, такому как параметр, количество и т.п., означает, что он включает вариации $\pm 20\%$, предпочтительно $\pm 10\%$, более предпочтительно $\pm 5\%$, и еще более предпочтительно $\pm 1\%$ от указанного значения, если такие изменения подходят для выполнения в раскрытом изобретении. Например, ингибирование экспрессии гена LRRK2 «по меньшей мере, примерно на 25%» означает, что ингибирование экспрессии гена LRRK2 может быть измерено как любое значение $\pm 20\%$ от указанных 25%, т.е. 20%, 30% или любое промежуточное значение между 20-30%.

В рамках настоящего изобретения, термин «контрольный уровень» относится к уровням экспрессии гена или уровню экспрессии молекулы РНК, или уровню экспрессии одного или более белков или белковых субъединиц в не подвергшейся модуляции клетке, ткани или системе, идентичных клетке, ткани или системе, в которых экспрессируются РНКи-агенты, описанные здесь. Клетка, ткань или система, в которых экспрессируются РНКи-агенты, имеет, по меньшей мере, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 2-кратную, 3-кратную, 4-кратную, 5-кратную или более экспрессию гена, РНК и/или белка, описанных выше, по сравнению с наблюдаемой в отсутствие РНКи-агента. Разницу в % и/или кратную разницу можно рассчитать относительно контрольных уровней,

например, используя следующее уравнение:

$$\% \text{ разница} = \frac{[\text{экспрессия с РНКи-агентом} - \text{экспрессия без РНКи-агента}]}{\text{экспрессия без РНКи-агента}} \times 100$$

В рамках настоящего изобретения, методы детектирования могут включать определение того, что количество присутствующего аналита ниже предела детектирования метода.

В случае противоречия между указанным сайтом-мишенью и нуклеотидной последовательностью смысловой или антисмысловой цепи, то указанная последовательность имеет приоритет.

В случае противоречия между химической структурой и химическим названием, то указанная химическая структура имеет приоритет.

Термин «ген LRRK2», также известный как «DRDN», «RIPK7», «PARK8», «AURA17», «ROCO2» и ген «богатой лейциновыми повторами киназы 2», относится к гену, кодирующему белок, называемый дардарином. Ген LRRK2 активен в головном мозге и других тканях по всему организму. LRRK2 экспрессируется во многих областях головного мозга, включая микроглию, олигодендроциты, нейроны и астроциты. Также сообщалось о его экспрессии в клетках как врожденной, так и адаптивной иммунной системы.

LRRK2 кодирует белок, известный как дардарин, который содержит несколько функциональных доменов, включая домен лейцин-богатых повторов (LRR), домен GTPase, домен киназы и домен WD40. Вероятно, дардарин функционирует как активная ГТФаза и киназа. Будучи крупным белком с несколькими различными функциональными и белок-взаимодействующими доменами, LRRK2 может иметь разных партнеров по связыванию в разных типах клеток. В условиях *in vitro* в поддержку многочисленных функций за счет наличия множества белок-взаимодействующих доменов, было показано, что LRRK2 оказывает влияние на регуляцию аутофагии, макроаутофагии, метаболизма церамидов, роста нейритов, везикулярного транспорта, компонентов цитоскелета и клеточных сигнальных путей с участием ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT), Wnt и ядерного фактора κB. Один из доменов белка дардарина представляет собой лейцин-богатую область, которая, вероятно, играет роль в событиях, требующих взаимодействия с другими белками, таких как передача сигналов или помощь в сборке структурного каркаса клетки (цитоскелета). Полагается, что другие участки белка дардарина также участвуют в белок-белковых взаимодействиях. Дардарин обладает киназной и ГТФазной активностью. Белки с киназной активностью способствуют переносу фосфатной группы (кластер атомов кислорода и фосфора) от молекулы АТФ, обладающей энергетической функцией, на аминокислоты в некоторых белках. Такое фосфорилирование является важной стадией включения и выключения многих видов клеточной активности. Среди киназных субстратов LRRK2 имеется подмножество Rab ГТФаз (гуанозинтрифосфатаз), включая Rab10, которые участвуют в поддержании эндоплазматического ретикулума, перемещении везикул и аутофагии. LRRK2-индуцированное фосфорилирование Rab10, вероятно, ингибирует его

функцию, предотвращая связывание с факторами ингибитора диссоциации Rab ГТФ (гуанозиндифосфат), необходимыми для доставки и рециркуляции мембраны. Аномально повышенную активность киназы LRRK2 связывали со сниженной активностью Rab10 и его эффекторов (Maio et al., Science Translational Medicine, 25 Jul 2018 г.: Vol. 10, Issue 451, eaar5429). ГТФазная активность дардарина связана с областью белка, называемого ROC-доменом. ROC-домен способствует контролированию общей формы белка дардарина. По меньшей мере, 20 различных мутаций в гене LRRK2 считаются причиной наследственной и спорадической болезни Паркинсона. Миссенс-мутации в LRRK2 вызывают семейную болезнь Паркинсона. Кроме того, результаты полногеномных ассоциативных исследований, включающие сканирование маркеров в геномах многих пациентов с болезнью Паркинсона, с целью выявления ассоциаций специфических генетических вариаций с болезнью Паркинсона, указывают на то, что локус LRRK2 является фактором риска болезни Паркинсона. Анализ локусов количественных признаков экспрессии (eQTL) для выявления генетических вариантов, которые влияют на экспрессию одного или нескольких генов, позволяет предположить, что экспрессия LRRK2 увеличивается примерно в 2 раза при спорадической болезни Паркинсона.

Полиморфизмы LRRK2 связаны с болезнью Крона и проказой, демонстрируя связь с функцией иммунной системы. Недавно сообщалось о повышении экспрессии LRRK2 в моноцитах после стимуляции IFN- γ , что приводит к возможному механизму опосредованной LRRK2 патофизиологии при PD, где LRRK2 может играть роль регулятора воспалительных и иммунных реакций, модулирующих риск нейродегенерации. Хотя, механизмы патологии, опосредованной LRRK2, все еще изучаются, повышенная экспрессия WT и/или мутированного LRRK2 в клетках пациентов с PD, вероятно, вызывает нарушение регуляции функции и активации клеток как врожденной, так и адаптивной иммунной системы, что приводит к нежелательной воспалительной реакции и последующей нейродегенерации при PD.

Мутации в гене LRRK2 также связывали с более периферическими процессами, такими как функции почек, у крыс и мышей. Известно, что нокдаун LRRK2 у рыбок Данио вызывает нарушения развития, такие как дефекты искривления оси, глазные аномалии и отек глаз, хрусталика и слуховых пузырьков (Prabhudesai, et al. (2016) Neuroscience Research Vol. 94, Issue 8:717- 735)

Репрезентативные нуклеотидные и аминокислотные последовательности LRRK2 можно найти, например, в GenBank под идентификационным номером NM_198578.4 (Homo sapiens LRRK2, SEQ ID NO: 1, обратный комплемент, SEQ ID NO: 2); в GenBank под идентификационным номером XM_015151449.2 (Macaca fascicularis LRRK2, SEQ ID NO: 3, обратный комплемент, SEQ ID NO: 4); в GenBank под идентификационным номером NM_025730.3 (Mus musculus LRRK2, SEQ ID NO: 5; обратный комплемент, SEQ ID NO: 6); и в GenBank под идентификационным номером NM_001191789.1 (Rattus norvegicus LRRK2, SEQ ID NO: 7, обратный комплемент, SEQ ID NO: 8).

Нуклеотидную последовательность геномной области хромосомы человека,

содержащей ген LRRK2, можно найти, например, в Консорциуме референсного генома 38 (также относящемся к Консорциуме генома человека или GRCh38), доступном в GenBank. Нуклеотидную последовательность геномной области хромосомы 12 человека, несущей ген LRRK2, также можно найти, например, в GenBank под идентификационным номером NC_000012.12, что соответствует нуклеотидам 40196744-40369285 хромосомы 12 человека. Нуклеотидную последовательность гена LRRK2 человека можно найти, например, в базе данных GenBank под идентификационным номером NG_011709.1.

Дополнительные примеры последовательностей LRRK2 можно найти в общедоступных базах данных, например, GenBank, OMIM и UniProt.

Дополнительную информацию о LRRK2 можно найти, например, на веб-сайте NCBI, который относится к гену 120892. В рамках настоящего изобретения, термин LRRK2 также относится к вариантам гена LRRK2, включая варианты, представленные в базе данных клинических вариантов, например, на веб-сайте клинических вариантов NCBI, со ссылкой на термин NM_198578.4.

Полное содержание каждого из вышеуказанных идентификационных номеров в GenBank и номеров базы данных Gene включено в настоящий документ посредством ссылки на дату подачи настоящей заявки.

В рамках настоящего изобретения, термин «последовательность-мишень» относится к непрерывному участку нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, образованной во время транскрипции гена LRRK2, включая как продукт первичной транскрипции, так и мРНК, являющуюся продуктом процессинга РНК первичной транскрипции. В одном варианте осуществления участок-мишень последовательности должен быть, по меньшей мере, достаточно длинным, чтобы служить субстратом для РНКи-направленного расщепления на том участке нуклеотидной последовательности молекулы мРНК, которая образуется во время транскрипции гена LRRK2, или рядом с ней.

Последовательность-мишень имеет длину примерно 15-30 нуклеотидов. Например, последовательность-мишень может состоять примерно из 15-30 нуклеотидов, 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 в длину. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень имеет длину 19-23 нуклеотида, необязательно 21-23 нуклеотида. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются в качестве части раскрытия.

В рамках настоящего изобретения, термин «цепь, содержащая последовательность» относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь нуклеотидов, которая описывается последовательностью, на которую ссылаются, с использованием стандартной номенклатуры нуклеотидов. «G», «C», «A», «T» и «U» обычно обозначают нуклеотид, находящийся в качестве основания гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил

соответственно в контексте модифицированного или немодифицированного нуклеотида. Однако следует понимать, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или к группе заместителя-миметика (см., например, таблицу 2). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил могут быть заменены другими группами без существенного изменения способности к спариванию оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такую группу заместителя. Например, без ограничения, нуклеотид, содержащий в качестве основания инозин, может образовывать пару оснований с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, могут быть заменены в нуклеотидных последовательностях двухцепочечной РНК, представленных в описании, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В еще одном примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть заменены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначной пары оснований G-U с мРНК-мишенью. Последовательности, содержащие такие группы замещения, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем описании.

Термины «иРНК», «РНКи-агент», «иРНК-агент», «агент для РНК-интерференции», используемые здесь взаимозаменяемо, относятся к агенту, который содержит РНК, как этот термин определен в данном документе, и который опосредует целенаправленное расщепление транскрипта РНК через путь РНК-индуцированного сайленсингового комплекса (RISC). РНК-интерференция (РНКи) представляет собой процесс, который направляет последовательность-специфическую деградацию мРНК. РНКи модулирует, например, ингибирует экспрессию LRRK2 в клетке, например, в клетке субъекта, такого как субъект-млекопитающее.

В одном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению включает одноцепочечную РНКи, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени LRRK2, чтобы направлять расщепление РНК-мишени. Не желая ограничиваться конкретной теорией, полагается, что длинная двухцепочечная РНК, введенная в клетки, расщепляется на двухцепочечные малые интерферирующие РНК (миРНК), включающие смысловую и антисмысловую цепи, с участием эндонуклеазы типа III, известной как Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, фермент, подобный рибонуклеазе III, процессирует эту дцРНК с образованием малых интерферирующих РНК из 19-23 пар оснований с характерными 3'-выступами из двух оснований (Bernstein, et al. (2001) *Nature*, 409:363). Затем эти миРНК включаются в РНК-индуцированный сайленсинговый комплекс (RISC), где одна или несколько геликаз раскручивают дуплекс миРНК, позволяя комплементарной антисмысловой цепи направлять распознавание мишени (Nykanen, et al. (2001) *Cell*, 107:309). При связывании с соответствующей мРНК-мишенью одна или более эндонуклеаз в RISC расщепляют мишень, вызывая сайленсинг (Elbashir, et al. (2001) *Genes Dev.*, 15:188). Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к одноцепочечной РНК (оцРНК) (антисмысловая

цепь дуплекса миРНК), генерированной в клетке и способствующей образованию комплекса RISC для сайленсинга гена-мишени, т.е. гена LRRK2. Следовательно, термин «миРНК» также используется в данном документе для обозначения РНКи, как описано выше.

В еще одном варианте осуществления РНКи-агент может представлять собой одноцепочечную РНК, которую вводят в клетку или организм для ингибирования мРНК-мишени. Агенты на основе одноцепочечной РНКи связываются с эндонуклеазой RISC, Argonaute 2, которая затем расщепляет мРНК-мишень. Одноцепочечные миРНК обычно состоят из 15-30 нуклеотидов и являются химически модифицированными. Дизайн и тестирование одноцепочечных РНК описаны в патенте США № 8101348 и в публикации Lima et al. (2012) Cell, 150:883-894, полное содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки. Любая из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, описанных здесь, может быть использована в качестве одноцепочечной миРНК, как здесь описано, или химически модифицирована способами, описанными в публикации Lima et al. (2012) Cell, 150:883-894.

В еще одном варианте осуществления «РНКи-агент» для применения в композициях и способах по настоящему изобретению представляет собой двухцепочечную РНК и упоминается в настоящем документе как «агент на основе двухцепочечной РНКи», «молекула двухцепочечной РНК (дцРНК)», «дцРНК-агент» или «дцРНК». Термин «дцРНК» относится к комплексу молекул рибонуклеиновой кислоты, имеющих дуплексную структуру, состоящую из двух антипараллельных и по существу комплементарных цепей нуклеиновой кислоты, имеющих «смысловую» и «антисмысловую» ориентацию по отношению к РНК-мишени, т.е. гену LRRK2. В некоторых вариантах осуществления изобретения двухцепочечная РНК (дцРНК) «запускает» деградацию РНК-мишени, например, мРНК, посредством механизма посттранскрипционного сайленсинга генов, именуемого в настоящем документе РНК-интерференцией или РНКи.

Как правило, молекула дцРНК включает рибонуклеотиды, но, как здесь подробно описано, каждая или обе цепи также могут включать один или более нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид, модифицированный нуклеотид. Кроме того, в рамках настоящего изобретения «РНКи-агент» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями; РНКи-агент может включать существенные модификации нескольких нуклеотидов. В рамках настоящего изобретения, термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированную группу сахара, модифицированную межнуклеотидную связь или модифицированное азотистое основание. Таким образом, термин «модифицированный нуклеотид» включает замены, добавления или удаления, например, функциональной группы или атома в межнуклеозидных связях, группах сахара или азотистых основаниях. Модификации, подходящие для применения в агентах по настоящему изобретению, включают все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных в данной области техники. Любые такие

модификации, используемые в молекуле типа миРНК, охватываются термином «РНК-агент» для целей настоящего описания и формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения включение дезоксирибонуклеотида, если он присутствует в РНК-агенте, может рассматриваться в качестве составляющего компонента модифицированного нуклеотида.

Дуплексная область может иметь любую длину, которая обеспечивает специфическую деградацию желаемой РНК-мишени через путь RISC, и может иметь длину примерно от 15 до 36 пар оснований, например, примерно 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 в длину, например, примерно 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 пары оснований в длину. В некоторых вариантах осуществления длина дуплексной области составляет 19-21 пару оснований, например, 21 пару оснований. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть раскрытия.

Две цепи, образующие дуплексную структуру, могут представлять собой разные участки одной более крупной молекулы РНК или отдельные молекулы РНК. Если две цепи являются частью одной более крупной молекулы, то они могут быть соединены непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя дуплексную структуру, с соединяющей цепью РНК, обозначенной «петлей-шпилькой». Петля-шпилька может содержать, по меньшей мере, один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля-шпилька может содержать, 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 неспаренных нуклеотидов или нуклеотидов, не нацеленных на целевой сайт дцРНК. В некоторых вариантах осуществления петля-шпилька может состоять из 10 или менее нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля-шпилька может состоять из 8 или менее неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля-шпилька может состоять из 4-10 неспаренных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петля-шпилька может состоять из 4-8 нуклеотидов.

Когда две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, то эти молекулы не обязательно, но могут быть ковалентно связаны. В некоторых вариантах осуществления, где две цепи соединены ковалентно с помощью средств, отличных от непрерывной цепи нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих дуплексную структуру, то соединяющая структура называется «линкером» (хотя следует отметить, что некоторые другие структуры, определенные в других местах настоящего документа, также могут называться «линкером»). Цепи РНК могут иметь одинаковое или разное число нуклеотидов.

Максимальное число пар оснований равно числу нуклеотидов в самой короткой цепи дцРНК за вычетом любых выступов, присутствующих в дуплексе. В дополнение к дуплексной структуре, РНКи может содержать один или более нуклеотидных выступов. В одном варианте осуществления РНКи-агента по меньшей мере одна цепь содержит 3'-выступ по меньшей мере из 1 нуклеотида. В другом варианте осуществления, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В еще одних вариантах осуществления, по меньшей мере, одна цепь РНКи-агента содержит 5'-выступ, по меньшей мере, из 1 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна цепь содержит 5'-выступ, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В еще одних вариантах осуществления как 3'-конец, так и 5'-конец одной цепи РНКи-агента содержат выступ, по меньшей мере, из 1 нуклеотида.

В одном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению представляет собой двухцепочечную РНК, каждая цепь которой независимо содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени LRRK2, направляя расщепление РНК-мишени.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению представляет собой дцРНК из 24-30 нуклеотидов, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени LRRK2, направляя расщепление РНК-мишени.

В рамках настоящего изобретения, термин «нуклеотидный выступ» относится, по меньшей мере, к одному неспаренному нуклеотиду, выступающему из дуплексной структуры РНКи-агента, например, дцРНК. Например, когда 3'-конец одной цепи дцРНК выступает за пределы 5'-конца другой цепи или наоборот, то возникает нуклеотидный выступ. дцРНК может содержать выступ, по меньшей мере, из одного нуклеотида; альтернативно выступ может содержать по меньшей мере два нуклеотида, по меньшей мере три нуклеотида, по меньшей мере четыре нуклеотида, по меньшей мере пять нуклеотидов или более. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может находиться в смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа могут находиться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи дцРНК.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступ на 3'-конце или 5'-конце. В одном варианте смысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступ на 3'-конце или 5'-конце. В еще одном варианте осуществления один или более нуклеотидов в выступе заменены нуклеозидтиофосфатом.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце или на 5'-конце. В одном варианте смысловая цепь

дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов, выступающих на 3'-конце или 5'-конце. В еще одном варианте осуществления один или несколько нуклеотидов в выступе заменены нуклеозидтиофосфатом.

В некоторых вариантах осуществления выступ на смысловой цепи или антисмысловой цепи может включать удлинённые участки длиной более 10 нуклеотидов, например, длиной 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления удлинённый выступ находится на смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлинённый выступ находится на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлинённый выступ находится на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлинённый выступ находится на антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлинённый выступ находится на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлинённый выступ находится на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов в выступе заменены нуклеозидтиофосфатом. В некоторых вариантах осуществления выступ включает самокомплементарный участок, так что выступ способен образовывать шпилькообразную структуру, стабильную в физиологических условиях.

Термины «тупой» или «тупой конец», используемые в данном документе по отношению к двухцепочечной РНК, означают, что на данном терминальном конце двухцепочечной РНК отсутствуют неспаренные нуклеотиды или аналоги нуклеотидов, т. е. отсутствует нуклеотидный выступ. Один или оба конца дцРНК могут быть тупыми. Когда оба конца дцРНК являются тупыми, то говорят, что дцРНК имеет тупые концы. Для ясности, дцРНК с «тупыми концами» представляет собой дцРНК, которая является тупой на обоих концах, т. е. не имеет нуклеотидных выступов на обоих концах молекулы. Чаще всего такая молекула будет двухцепочечной по всей своей длине.

Термин «антисмысловая цепь» или «направляющая цепь» относится к цепи РНК-агента, например, дцРНК, которая включает область, по существу комплементарную последовательности-мишени, например, мРНК LRRK2.

В рамках настоящего изобретения, термин «область комплементарности» относится к области антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности LRRK2, как определено в настоящем документе. Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, то несовпадения могут находиться во внутренних или концевых областях молекулы. Как правило, наиболее допустимые несовпадения находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'- или 3'-конца РНК-агента. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечного РНК-агента по изобретению включает несовпадение нуклеотидов в антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь двухцепочечного РНК-агента по изобретению включает не более 4 несовпадений с мРНК-

мишенью, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений с мРНК-мишенью. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь двухцепочечного РНК-агента по изобретению включает не более 4 несовпадений со смысловой цепью, например, антисмысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений со смысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный РНК-агент по изобретению включает несовпадение нуклеотидов в смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь двухцепочечного РНК-агента по изобретению включает не более 4 несовпадений с антисмысловой цепью, например, смысловая цепь включает 4, 3, 2, 1 или 0 несовпадений с антисмысловой цепью. В некоторых вариантах осуществления несовпадение нуклеотидов находится, например, в пределах 5, 4, 3 нуклеотидов от 3'-конца иРНК. В еще одном варианте осуществления несовпадение нуклеотидов имеет место, например, в 3'-концевом нуклеотиде иРНК-агента. В некоторых вариантах осуществления несовпадение(я) не находится в затравочной области.

Таким образом, РНКи-агент, описанный здесь, может содержать одно или более несовпадений с последовательностью-мишенью. В одном варианте осуществления РНКи-агент, описанный здесь, содержит не более 3 несовпадений (т.е. 3, 2, 1 или 0 несовпадений). В одном варианте осуществления РНКи-агент, описанный здесь, содержит не более 2 несовпадений. В одном варианте осуществления РНКи-агент, описанный здесь, содержит не более 1 несовпадения. В одном варианте осуществления РНКи-агент, описанный здесь, содержит 0 несовпадений. В некоторых вариантах осуществления, когда антисмысловая цепь РНКи-агента содержит несовпадения с последовательностью-мишенью, то необязательно это несовпадение может ограничиваться последними 5 нуклеотидами либо с 5'-, либо с 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах осуществления РНКи-агента из 23 нуклеотидов цепь, комплементарная области гена LRRK2, обычно не содержит какого-либо несовпадения в пределах центральных 13 нуклеотидов. Способы, описанные в настоящем документе, или способы, известные в данной области, можно использовать для определения того, насколько эффективен РНКи-агент, содержащий несовпадение с последовательностью-мишенью, в ингибировании экспрессии гена LRRK2. Например, Jackson et al. (Nat. Biotechnol., 2003; 21: 635-637) описали результаты исследования профиля экспрессии, в котором экспрессия небольшого набора генов с идентичной последовательностью миРНК MAPK14 только на уровне 12-18 нуклеотидов смысловой цепи подавлялась с помощью сходная кинетика с MAPK14. Аналогично Lin et al. (Nucleic Acids Res. 2005, 33(14): 4527-4535) с использованием кПЦР и репортерных анализов показали, что комплементарность 7 нуклеотидов между миРНК и мишенью достаточна для того, чтобы вызвать деградацию мРНК-мишени. Оценка эффективности РНКи-агентов с несовпадениями в ингибировании экспрессии гена LRRK2 важна, особенно если известно, что конкретная область комплементарности в гене LRRK2 имеет полиморфную изменчивость последовательности в пределах популяции.

В рамках настоящего изобретения, термин «по существу все нуклеотиды являются модифицированными» означает, что в значительной степени, но не полностью, нуклеотиды

являются модифицированными, и могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированного нуклеотида.

Термин «смысловая цепь» или «цепь-пассажир», используемый здесь, относится к цепи РНК-агента, которая включает область, по существу комплементарную области антисмысловой цепи, как этот термин определен в настоящем документе.

В рамках настоящего изобретения, термин «область расщепления» относится к области, расположенной непосредственно рядом с сайтом расщепления. Сайт расщепления представляет собой участок в мишени, в котором происходит расщепление. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит три основания на конце и непосредственно рядом с сайтом расщепления. В некоторых вариантах осуществления область расщепления содержит два основания на конце и непосредственно рядом с сайтом расщепления. В некоторых вариантах осуществления сайт расщепления конкретно располагается на участке, связанном нуклеотидами 10 и 11 антисмысловой цепи, и область расщепления содержит нуклеотиды 11, 12 и 13.

В рамках настоящего изобретения, и если не указано иное, то термин «комплементарная», используемый для описания первой нуклеотидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида или полинуклеотида, включающего первую нуклеотидную последовательность, гибридизоваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом или полинуклеотидом, включающим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области техники. Такими условиями могут быть, например, «жесткие условия», включая, помимо прочего, 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM ЭДТА, 50°C или 70°C в течение 12-16 ч с последующим промыванием (см. например, монографию «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», Sambrook, et al. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press). В рамках настоящего изобретения, термины «жесткие условия» или «жесткие условия гибридизации» относятся к условиям, при которых антисмысловое соединение будет гибридизоваться со своей последовательностью-мишенью, но будет гибридизоваться с минимальным числом других последовательностей. Жесткие условия зависят от последовательности и будут разными в разных обстоятельствах, и «жесткие условия», при которых антисмысловые соединения гибридизуются с последовательностью-мишенью, определяются свойствами и составом антисмысловых соединений и анализами, в которых они исследуются. Могут применяться и другие условия, такие как физиологически значимые условия, с которыми можно столкнуться внутри организма. Специалист в данной области может определить набор условий, наиболее подходящих для тестирования комплементарности двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизованных нуклеотидов.

Комплементарные последовательности в РНК-агенте, например, в дцРНК, как здесь описано, включают спаривание оснований олигонуклеотида или полинуклеотида, содержащего первую нуклеотидную последовательность, с олигонуклеотидом или

полинуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных последовательностей. Такие последовательности могут называться здесь «полностью комплементарными» по отношению друг к другу. Однако если первая последовательность упоминается здесь как «по существу комплементарная» по отношению ко второй последовательности, то две последовательности могут быть полностью комплементарными или могут образовывать одну или более, но обычно не более 5, 4, 3 или 2 несовпадающих пар оснований при гибридизации для дуплекса, состоящего 30 пар оснований. В некоторых вариантах осуществления «по существу комплементарные» последовательности, раскрытые в настоящем документе, содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая комплементарна, по меньшей мере, примерно на 80% по всей своей длине эквивалентному участку последовательности-мишени LRRK2, например, примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98% или примерно на 99%. Однако если два олигонуклеотида предназначены для образования при гибридизации одного или более одноцепочечных выступов, то такие выступы не должны рассматриваться в качестве несовпадений при определении комплементарности. Например, дцРНК, содержащая один олигонуклеотид длиной 21 нуклеотид и другой олигонуклеотид длиной 23 нуклеотида, где более длинный олигонуклеотид содержит последовательность из 21 нуклеотида, которая полностью комплементарна более короткому олигонуклеотиду, все же может называться «полностью комплементарной» для целей, описанных здесь.

В рамках настоящего изобретения, «комплементарные» последовательности могут также включать или быть полностью образованными парами оснований, отличными от пар оснований Уотсона-Крика, или парами оснований, образованных из неприродных и модифицированных нуклеотидов, при условии, что выполняются вышеуказанные требования в отношении их способности гибридизоваться. Такие пары оснований, отличные от Уотсона-Крика, включают, не ограничиваясь этим, неоднозначную пару оснований G:U, или Хугстиновское спаривание оснований.

Термины «комплементарная», «полностью комплементарная» и «по существу комплементарная» в настоящем описании можно использовать в отношении совпадения пар оснований смысловой цепи и антисмысловой цепи дцРНК или антисмысловой цепи дцРНК и последовательности-мишени, как будет понятно из контекста, в котором их используют.

В рамках настоящего изобретения, полинуклеотид, который «по существу комплементарен, по меньшей мере, участку» матричной РНК (мРНК), относится к полинуклеотиду, который по существу комплементарен непрерывному участку представляющей интерес мРНК (например, мРНК, кодирующей LRRK2). Например, полинуклеотид комплементарен, по меньшей мере, участку мРНК LRRK2, если последовательность по существу комплементарна непрерывному участку мРНК, кодирующей LRRK2.

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые здесь, полностью комплементарны последовательности-мишени LRRK2. В других вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые здесь, по существу комплементарны последовательности-мишени LRRK2 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, или участку любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98% или примерно на 99%.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые здесь, по существу комплементарны участку последовательности-мишени LRRK2 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% комплементарна по всей своей длине участку последовательности SEQ ID NO: 1, выбранному из группы нуклеотидов 3383-3403, 2105-2125, 2356-2376, 5413-5433, 2603-2623, 3563-3583, 2192-2212, 3088-3108, 3105-3125, 2203-2223, 7348-7, 13968, 7098 6319-6339, 3886-3906, 5190-5210, 3964-3984, 5138-5158, 1254-1274, 7098-7118, 7048-7068, 7050-7070, 2764-2784, 3087-97-4, 4626, 7526 4869, 5272-5292, 468-488, 7520-7540, 3720-3740, 4016-4036, 7792-7812, 2515-2535, 2286-2306, 4014-4034, 3721-3741, 2284-28961, 16 3876-3896, 7788-7808, 4013-4033, 1275-1295, 7527-7547, 3606-3626, 7525-7545, 2356-2376, 3105-3125 и 5413-5433 из SEQ ID NO: 1, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98% или примерно на 99%. Диапазоны, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам, также рассматриваются как часть раскрытия.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые здесь, по существу комплементарны участку последовательности-мишени LRRK2 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, на 80% комплементарна по всей своей длине участку последовательности SEQ ID NO: 1, выбранному из группы нуклеотидов 468-488, 1254-1274, 2105-2125, 2192-2212, 2203-2223, 2603-2623, 2764-2784, 3087-3107, 3088-3108, 3383-3403, 3563-3583, 887, 3886-3906, 3964-3984, 4849-4869, 5138-5158, 5190-5210, 5272-5292, 6319-6339, 7097-7117, 7098-7118 и 7348-7368 из SEQ ID NO: 1, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98% или примерно на 99%. Диапазоны, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам, также рассматриваются как часть раскрытия.

В еще одних вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, описанные здесь, по существу комплементарны последовательности-мишени LRRK2 и содержат непрерывную нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, примерно на

80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи, представленных в любой из таблиц 3-4 и 6-7, или участку любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи, представленных в любой из таблиц 3-4 и 6-7, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или на 100%.

В одном варианте осуществления РНК-агент по настоящему изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, является таким же, как последовательность-мишень LRRK2, и где полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, примерно на 80% комплементарна по всей своей длине эквивалентному участку нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, 3, 5 и 7, или участку любой из SEQ ID NO:1, 3, 5 и 7, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или на 100%.

В некоторых вариантах осуществления РНК-агент по изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна антисмысловому полинуклеотиду, который, в свою очередь, комплементарен последовательности-мишени LRRK2, и где полинуклеотид смысловой цепи содержит непрерывную нуклеотидную последовательность, которая, по меньшей мере, примерно на 80% комплементарна по всей своей длине любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленной в любой из таблиц 3-4 и 6-7, или участку любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 3-4 и 6-7, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 91%, примерно на 92%, примерно на 93%, примерно на 94%, примерно на 95%, примерно на 96%, примерно на 97%, примерно на 98%, примерно на 99% или на 100%.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из дуплексов AD-601140.1, AD-599927.1, AD-612673.1, AD-615420.1, AD-600406.1, AD-601294.1, AD-600013.1, AD-600853.1, AD-613382.1, AD-600024.1, AD-604701.1, AD-604452.1, AD-603747.1, AD-601616.1, AD-602766.1, AD-601694.1, AD-602734.1, AD-599139.1, AD-604453.1, AD-616783.1, AD-616785.1, AD-600566.1, AD-600852.1, AD-617239.1, AD-602466.1, AD-602848.1, AD-598424.1, AD-617233.1, AD-613965.1, AD-614239.1, AD-617466.1, AD-612820.1, AD-612611.1, AD-614237.1, AD-613966.1, AD-612609.1, AD-612246.1, AD-601606.1, AD-617462.1, AD-614236.1, AD-611650.1, AD-617240.1, AD-613851.1, AD-617238.1, AD-1335323.1, AD-1335325.1 и AD-1335324.1.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного

из группы, состоящей из AD-1508169, AD-1508884, AD-1509672, АД-1509758, АД-1509769, АД-1510151, АД-1510311, АД-1510597, АД-1510598, АД-1510885, АД-1511039, АД-1511351, АД-1511361, АД-1511439, АД-1512211, АД- 1512479, AD-1512511, AD-1512593, AD-1513492, AD-1514197, AD-1514198 и AD-1514446.

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, частичное подавление экспрессии гена LRRK2 оценивают по уменьшению количества мРНК LRRK2, например, смысловой мРНК, антисмысловой мРНК, общей мРНК LRRK2, которая может быть выделена или обнаружена в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибируется ген LRRK2, и которые подверглись или были обработаны таким образом, что экспрессия гена LRRK2 ингибируется, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но которые подвергались или не подвергались такой обработке (контрольные клетки). Степень ингибирования (например, процент оставшейся экспрессированной мРНК) может быть выражена в следующих показателях:

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

В рамках настоящего изобретения, выражение «приведение в контакт клетки с агентом РНКи», таким как дцРНК, включает контактирование клетки любым возможным способом. Контактное взаимодействие клетки с РНКи-агентом включает контактирование клетки *in vitro* с РНКи-агентом или контактирование клетки *in vivo* с РНКи-агентом. Контактное взаимодействие может осуществляться прямо или опосредованно. Так, например, РНКи-агент может быть приведен в физический контакт с клеткой лицом, выполняющим метод, или, альтернативно, РНКи-агент может быть помещен в условия, которые позволяют или заставят его затем вступить в контакт с клеткой.

Контактирование с клеткой *in vitro* может быть осуществлено, например, инкубацией клетки с РНКи-агентом. Контактное взаимодействие с клеткой *in vivo* можно осуществить, например, инъекционным введением РНКи-агента в ткань или рядом с ней, где расположена клетка, или инъекционным введением РНКи-агента в другую область, например, в центральную нервную систему (ЦНС), необязательно интратекальной, интравитреальной, интрацистернальной или другой инъекцией, или в кровоток (т.е. внутривенно) или в подкожное пространство таким образом, что затем агент достигнет ткани, где расположена клетка, которую необходимо привести в контакт с ним. Например, РНКи-агент может содержать или быть связанным с лигандом, например, липофильной группой или группами, как описано ниже и дополнительно подробно описано, например, в РСТ/US2019/031170, которая включена здесь посредством ссылки, которая направляет или иным образом стабилизирует РНКи-агент в представляющем интерес месте, например, в ЦНС. Также возможны комбинации методов контактирования *in vitro* и *in vivo*. Например, также клетка может быть приведена в контакт *in vitro* с РНКи-агентом и затем трансплантирована субъекту.

В одном варианте осуществления контактирование клетки с РНКи-агентом включает «введение» или «доставку РНКи-агента в клетку» посредством обеспечения или осуществления захвата или поглощения клеткой. Поглощение или захват РНКи-агента может происходить за счет диффузионных или активных клеточных процессов или с использованием вспомогательных агентов или устройств. Введение РНКи-агента в клетку может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* РНКи-агент можно ввести инъекционно в участок ткани или ввести системно. Введение *in vitro* в клетку включает способы, известные в данной области техники, такие как электропорация и липофекция. Дополнительные подходы описаны ниже или известны в данной области техники.

Термин «липофильная» или «липофильная группа» в широком смысле относится к любому соединению или химической молекуле, обладающей сродством к липидам. Одним из способов характеристики липофильности липофильной группы является коэффициент распределения октанол-вода, $\log K_{ow}$, где K_{ow} представляет собой отношение концентрации химического соединения в октанольной фазе к его концентрации в водной фазе двухфазной системы в условиях равновесия. Коэффициент распределения октанол-вода представляет собой лабораторно измеряемый показатель соединения. Однако его также можно прогнозировать, используя коэффициенты, относящиеся к структурным компонентам химического вещества, которые рассчитываются с использованием неэмпирических или эмпирических методов (см., например, публикацию Tetko et al., J. Chem. Inf. Comput. Sci., 41:1407-21 (2001), которая в полном объеме включена здесь посредством ссылки). Он обеспечивает термодинамический показатель тенденции соединения в преференции неводной или масляной среды, а не воды (т. е. его гидрофильный/липофильный баланс). В принципе, химическое соединение является липофильным по своему характеру, если его значение $\log K_{ow}$ превышает 0. Как правило, липофильная группа имеет значение $\log K_{ow}$ выше 1, выше 1,5, выше 2, выше 3, выше 4, выше 5 или выше 10. Например, прогнозируется, что $\log K_{ow}$ для 6-аминогексанола составляет примерно 0,7. Используя аналогичный метод, прогнозируемое значение $\log K_{ow}$ холестерина N-(гексан-6-ол)карбамата равно 10,7.

Липофильность молекулы может меняться в зависимости от функциональной группы, которую она несет. Например, добавление гидроксильной группы или аминогруппы к концу липофильной молекулы может увеличить или уменьшить значение коэффициента распределения (например, $\log K_{ow}$) липофильной молекулы.

Альтернативно, гидрофобность двухцепочечного РНКи-агента, конъюгированного с одной или несколькими липофильными молекулами, можно измерить по характеристикам его связывания с белком. Например, в некоторых вариантах осуществления можно определить, что несвязанная фракция в анализе связывания с белками плазмы двухцепочечного РНКи-агента положительно коррелирует с относительной гидрофобностью двухцепочечного РНКи-агента, которая затем может положительно коррелировать с сайленсинговой активностью двухцепочечного РНКи-агента.

В одном варианте осуществления определенный анализ связывания с белками

плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности (EMSA) с использованием белка сывороточного альбумина человека. Типовой протокол этого анализа связывания подробно описан, например, в PCT/US2019/031170. Вкратце, дуплексы инкубировали с человеческим сывороточным альбумином и определяли несвязанную фракцию. Примерный протокол анализа включает дуплексы в исходной концентрации 10 мкМ, с последующим разбавлением до конечной концентрации 0,5 мкМ (общий объем 20 мкл), содержащие 0, 20 или 90% сыворотки в 1× PBS. Образцы можно смешать, центрифугировать в течение 30 с и затем инкубировать при комнатной температуре в течение 10 мин. После завершения стадии инкубации к каждому образцу добавляют 4 мкл 6× раствора для загрузки геля EMSA, центрифугируют в течение 30 с, и 12 мкл каждого образца загружают в 26-луночный 10% PAGE BioRad (электрофорез в полиакриламидном геле). Проводят электрофорез в геле в течение 1 ч при 100 В. После завершения цикла гель извлекают из корпуса и промывают в 50 мл 10% TBE (Трис-основание, борная кислота и ЭДТА). После завершения промывания к гелю добавляют 5 мкл SYBR Gold, затем инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин и снова промывают гель в 50 мл 10% TBE. В указанном примерном анализе система регистрации геля Gel Doc XR+ может использоваться для снятия показаний с геля с использованием следующих параметров: устройство для визуализации настроено на SYBR Gold, размер установлен на гель Bio-Rad, экспозиция установлена на автоматическую для интенсивных полос, насыщенная пиксельная подсветка может быть установлена на единицу, и цвет установлен на серый. Детектирование, анализ молекулярной массы и выходные данные можно блокировать. После получения чистого изображения геля Image Lab 5.2 можно использовать для обработки изображения. Дорожки и полосы можно настроить вручную для измерения интенсивности полосы. Интенсивность полос каждого образца может быть нормализована к PBS, чтобы получить фракцию несвязанной миРНК. По данным этого измерения можно определить относительную гидрофобность. Гидрофобность двухцепочечного РНКи-агента, измеренная по фракции несвязанной миРНК в анализе связывания, превышает 0,15, превышает 0,2, превышает 0,25, превышает 0,3, превышает 0,35, превышает 0,4, превышает 0,45 или превышает 0,5 для обеспечения усиленной *in vivo* доставки миРНК.

Следовательно, конъюгирование липофильных молекул с внутренним положением(ями) двухцепочечного РНКи-агента обеспечивает улучшенную гидрофобность для усиленной доставки миРНК *in vivo*.

Термин «липидная наночастица» или «LNP» представляет собой везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, РНКи-агент или плазмиду, из которой транскрибируется РНКи-агент. LNP описаны, например, в патентах США № 6858225, 6815432, 8158601 и 8058069, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В рамках настоящего изобретения, термин «субъект» представляет собой животное, такое как млекопитающее, включая примата (например, человека, примата, отличного от

человека, например, обезьяну и шимпанзе), или неprimата (например, крыса или мышь). В предпочтительном варианте осуществления субъект представляет собой человека, например, человека, которому проводится лечение или диагностика на наличие заболевания, расстройства или патологического состояния, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2; человека с риском развития заболевания, расстройства или патологического состояния, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2; человека, страдающего заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2; или человека, которого лечили от заболевания, расстройства или патологического состояния, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2, как здесь описано. В некоторых вариантах осуществления субъектом является женщина. В других вариантах осуществления субъектом является мужчина. В одном варианте осуществления субъект является взрослым субъектом. В одном варианте осуществления субъектом является ребенок. В другом варианте осуществления субъектом является несовершеннолетний субъект, т. е. субъект моложе 20 лет.

В рамках настоящего изобретения, термины «лечение» или «проведение лечения» относятся к полезному или желаемому результату, включая, помимо прочего, облегчение или ослабление одного или нескольких признаков или симптомов, связанных с экспрессией гена LRRK2 или продукцией белка LRRK2, например, при LRRK2-ассоциированных заболеваниях, таких как LRRK2-ассоциированное заболевание. «Лечение» также может означать увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствии лечения.

Термин «более низкий» в контексте уровня LRRK2 у субъекта или маркера или симптома заболевания относится к статистически значимому снижению такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, %, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления снижение составляет, по меньшей мере, 20%. В некоторых вариантах осуществления снижение маркера заболевания составляет, по меньшей мере, 50%, например, уровня смысловых или антисмысловых-содержащих фокусов и/или уровня белка с абберрантными дипептидными повторами, например, снижение на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления снижение маркера заболевания составляет, по меньшей мере, примерно 25%, например, уровень экспрессии белка LRRK2 и/или гена снижается, например, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90% или, по меньшей мере, примерно на 95%. «Более низкий» в контексте уровня LRRK2 у субъекта представляет собой предпочтительно ниже уровня, принятого в пределах нормы для субъекта без такого расстройства. В некоторых вариантах осуществления термин «более низкий» представляет собой уменьшение разницы между уровнем маркера или проявления симптома у субъекта, страдающего заболеванием, и уровнем, приемлемым в

диапазоне нормы для субъекта, например, уровнем снижения массы тела между субъектом с ожирением и субъектом, масса тела которого находится в пределах нормы.

В рамках настоящего изобретения, термин «профилактика» или «предупреждение», когда он используется в отношении заболевания, расстройства или патологического состояния, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2 или продукции белка LRRK2, относится к снижению вероятности того, что у субъекта будет развиваться симптом, ассоциированный с таким заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, например, симптом заболевания, ассоциированного с LRRK2. Отсутствие развития заболевания, расстройства или патологического состояния или уменьшение развития симптома, ассоциированного с таким заболеванием, расстройством или патологическим состоянием (например, по меньшей мере, примерно на 10% по принятой клинической шкале для этого заболевания или расстройства), или замедление проявления симптомов (например, на период, исчисляемый днями, неделями, месяцами или годами) является показателем эффективной профилактики.

В рамках настоящего изобретения, термин «заболевание, ассоциированное с LRRK2» или «расстройство, ассоциированное с LRRK2» включает любое заболевание или расстройство, для которого полезно снижение экспрессии и/или активности LRRK2. Типичные заболевания, ассоциированные с LRRK2, включают заболевания, при которых субъекты несут миссенс-мутации и/или делеции в гене LRRK2, например, нейродегенеративное заболевание, такое как болезнь Паркинсона (БП), болезнь Крона и болезнь глаз. Нейродегенеративные заболевания включают, не ограничиваясь этим, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, шизофрению, прогрессирующую миоклоническую эпилепсию (болезнь Унферрихта-Лундборга-Лафора), болезнь Галлервордена-Шпатца, пигментный ретинит, ксеродермию пигментную и заболевания, связанные с меланином. В рамках настоящего изобретения, «болезнь глаз» или «расстройство глазной системы» относится к любому нарушению системы глаза и его зрительной системы (например, роговицы, хрусталика и жидкостей). Неограничивающие примеры глазных болезней включают отек глаз, хрусталика и слуховых пузырьков.

Миссенс-мутация LRRK2, например, G2019S, A2016T, может быть обнаружена у субъектов с семейной или спорадической болезнью Паркинсона. Мутации могут приводить к двукратному или трехкратному повышению активности киназы, что, в свою очередь, может привести к активации сигнального пути гибели нейронов.

Субъекты, имеющие миссенс-мутации и/или делеции в гене LRRK2, могут иметь аутосомно-доминантное заболевание, и которое является наиболее распространенной формой семейной болезни Паркинсона, на которую приходится 1-2% всех случаев болезни Паркинсона. Общие патогенные мутации в LRRK2, связанные с PD, находятся в доменах ГТФазы и киназы с наиболее распространенной мутацией, мутацией G2019S, в домене киназы.

Выражение «терапевтически эффективное количество», используемое в данном

документе, включает количество агента РНК-интерференции, которое при введении субъекту, страдающему заболеванием, ассоциированным с LRRK2, является достаточным для эффективного лечения заболевания (например, за счет уменьшения, ослабления или контроля имеющегося заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от конкретного РНКи-агента, способа введения агента, заболевания и его тяжести, а также анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетического состава, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если таковые имеются, и другие индивидуальные особенности субъекта, подлежащего лечению.

«Профилактически эффективное количество», используемое в данном документе, включает количество РНКи-агента, которое при введении субъекту, страдающему расстройством, ассоциированным с LRRK2, является достаточным для предупреждения или облегчения заболевания или одного или нескольких симптомов заболевания. Облегчение заболевания включает замедление течения заболевания или уменьшение тяжести развивающегося позднее заболевания. «Профилактически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от конкретного РНКи-агента, способа введения агента, степени риска развития заболевания и анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетического состава, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если любых и других индивидуальных особенностей пациента, подлежащего лечению.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество РНКи-агента, которое оказывает некоторый желаемый локальный или системный эффект при приемлемом соотношении «польза/риск», применимом к любому лечению. РНКи-агент, используемый в способах по настоящему изобретению, можно вводить в количестве, достаточном для обеспечения приемлемого соотношения «польза/риск», применимого к такому лечению.

Выражение «фармацевтически приемлемый» используется здесь для обозначения тех соединений, материалов, композиций или лекарственных форм, которые, в рамках здравого медицинского суждения, подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без проявления чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соответствующих приемлемому соотношению польза/риск.

В рамках настоящего изобретения выражение «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, эксципиент, технологическую добавку (например, смазку, тальк, стеарат магния, кальция или цинка, или стерическую кислоту) или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами состава и не был токсичным для

субъекта, которого лечат. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) смазывающие агенты, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк; (8) эксципиенты, такие как масло какао и воск для суппозитория; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) pH-забуференные растворы; (21) сложные полиэфиры, поликарбонаты или полиангидриды; (22) наполнители, такие как полипептиды и аминокислоты; (23) компонент сыворотки, такой как сывороточный альбумин, HDL и LDL; и (22) другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических препаратах.

В рамках настоящего изобретения, термин «образец» включает ряд сходных жидкостей, клеток или тканей, выделенных у субъекта, а также жидкостей, клеток или тканей, имеющих место у субъекта. Примеры биологических жидкостей включают кровь, сыворотку и серозные жидкости, плазму, спинномозговую жидкость, глазные жидкости, лимфу, мочу, слюну и т.п. Образцы тканей могут включать образцы тканей, органов или локализованных областей. Например, образцы могут быть получены из определенных органов, частей органов или жидкостей или клеток внутри этих органов. В некоторых вариантах осуществления образцы могут быть получены из головного мозга (например, всего головного мозга или определенных сегментов головного мозга, например полосатого тела, или определенных типов клеток головного мозга, таких как, например, нейроны и глиальные клетки (астроциты, олигодендроциты, микроглиальные клетки)). В некоторых вариантах осуществления «образец, полученный от субъекта», относится к крови, отобранной у субъекта, или плазме или сыворотке, полученной из него. В дополнительных вариантах осуществления «образец, полученный от субъекта» относится к ткани головного мозга (или ее субкомпонентам) или ткани сетчатки (или ее субкомпонентам), полученной от субъекта.

Термин «замещенный» относится к замещению одного или более водородных радикалов в данной структуре радикалом определенного заместителя, включая, не ограничиваясь этим: алкил, алкенил, алкинил, арил, гетероцикл, галоген, тиол, алкилтио, арилтио, алкилтиоалкил, арилтиоалкил, алкилсульфонил, алкилсульфонилалкил, арилсульфонилалкил, алкокси, арилокси, аралкокси, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, ариламинокарбонил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил, галоалкил, амина, трифторметил, циано, нитро, алкиламино, ариламино, алкиламиноалкил, ариламиноалкил,

амино, алкилоксиалкокси, карбоксиалкил, алкоксикарбонилалкил, аминокарбонилалкил, ацил, аралкоксикарбонил, карбоновая кислота, сульфоновая кислота, сульфонил, фосфоновая кислота, арил, гетероарил, гетероциклический и алифатический. Понятно, что заместитель может быть дополнительно замещен.

Термин «алкил» относится к насыщенным и ненасыщенным неароматическим углеводородным цепям с линейной или разветвленной цепью, содержащим указанное число атомов углерода (включая, без ограничений, пропил, аллил или пропаргил), которые могут быть необязательно вставлены с N, O или S. Например, «(C1-C6) алкил» означает радикал, имеющий от 1 до 6 атомов углерода в линейной или разветвленной структуре. «(C1-C6)алкил» включает, например, метил, этил, пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, пентил и гексил. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа по настоящему изобретению может включать C6-C18 алкильную углеводородную цепь.

Термин «алкилен» относится к необязательно замещенному насыщенному алифатическому двухвалентному углеводородному радикалу с разветвленной или прямой цепью, имеющему указанное число атомов углерода. Например, «(C1-C6) алкилен» означает двухвалентный насыщенный алифатический радикал, имеющий от 1 до 6 атомов углерода в линейном расположении, например, $[(CH_2)_n]$, где n представляет собой целое число от 1 до 6. «(C1-C6) алкилен» включает метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен и гексилен. Альтернативно, «(C1-C6) алкилен» означает двухвалентный насыщенный радикал, имеющий от 1 до 6 атомов углерода в разветвленном расположении, например: $[(CH_2CH_2CH_2CH_2CH(CH_3))]$, $[(CH_2CH_2CH_2CH_2C(CH_3)_2)]$, $[(CH_2C(CH_3)_2CH(CH_3))]$ и т. п. Термин «алкилендиоксо» относится к двухвалентным соединениям со структурой -O-R-O-, в которой R представляет собой алкилен.

Термин «меркапто» относится к радикалу -SH. Термин «тиоалкокси» относится к -S-алкильному радикалу.

Термин «гало» относится к любому радикалу фтора, хлора, брома или йода. «Галоген» и «гало» используются здесь взаимозаменяемо.

В рамках настоящего изобретения, термин «циклоалкил» означает насыщенную или ненасыщенную неароматическую углеводородную кольцевую группу, содержащую от 3 до 14 атомов углерода, если не указано иное. Например, «(C3-C10)циклоалкил» означает углеводородный радикал (3-10)-членного насыщенного алифатического циклического углеводородного кольца. Примеры циклоалкильных групп включают, не ограничиваясь этим, циклопропил, метилциклопропил, 2,2-диметилциклобутил, 2-этилциклопентил, циклогексил и т. д. Циклоалкилы могут включать несколько спиро- или конденсированных колец. Циклоалкильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, насколько это позволяет нормальная валентность.

В рамках настоящего изобретения, термин «алкенил» относится к неароматическому углеводородному радикалу, прямому или разветвленному, содержащему, по меньшей мере, одну углерод-углеродную двойную связь и имеющему от 2 до 10 атомов углерода, если не указано иное. В таких группах может присутствовать до пяти углерод-углеродных двойных

связей. Например, «C2-C6» алкенил определяется как алкенильный радикал, содержащий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкенильных групп включают, не ограничиваясь этим, этенил, пропенил, бутенил и циклогексенил. Прямая, разветвленная или циклическая часть алкенильной группы может содержать двойные связи и необязательно может быть моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенной в любом положении, насколько это позволяет нормальная валентность. Термин «циклоалкенил» означает моноциклическую углеводородную группу, имеющую указанное число атомов углерода и, по меньшей мере, одну углерод-углеродную двойную связь.

В рамках настоящего изобретения, термин «алкинил» относится к углеводородному радикалу с прямой или разветвленной цепью, содержащему от 2 до 10 атомов углерода, если не указано иное, и содержащему, по меньшей мере, одну тройную углерод-углеродную связь. Может присутствовать до 5 тройных углерод-углеродных связей. Таким образом, «C2-C6 алкинил» означает алкинильный радикал, содержащий от 2 до 6 атомов углерода. Примеры алкинильных групп включают, не ограничиваясь этим, этинил, 2-пропинил и 2-бутинил. Прямая или разветвленная часть алкинильной группы может содержать тройные связи, насколько это позволяет нормальная валентность, и может быть необязательно моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенной в любом положении, насколько это позволяет нормальная валентность.

В рамках настоящего изобретения, термин «алкоксил» или «алкокси» относится к алкильной группе, имеющей значения, определенные выше, с указанным числом атомов углерода, соединенных через кислородный мостик. Например, «(C1-C3)алкокси» включает метокси, этокси и пропокси. Например, предусматривается, что «(C1-C6)алкокси» включает C1, C2, C3, C4, C5 и C6 алкоксигруппы. Например, предусматривается, что «(C1-C8)алкокси» включает C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 и C8 алкоксигруппы. Примеры алкокси включают, не ограничиваясь этим, метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, трет-бутокси, н-пентокси, втор-пентокси, н-гептокси и н-октокси. «Алкилтио» означает алкильный радикал, присоединенный через связывающий атом серы. Термины «алкиламино» или «аминоалкил» означают алкильный радикал, присоединенный через связь NH. «Диалкиламино» означает два алкильных радикала, соединенных через связывающий атом азота. Аминогруппы могут быть незамещенными, монозамещенными или двузамещенными. В некоторых вариантах осуществления два алкильных радикала являются одинаковыми (например, N,N-диметиламино). В некоторых вариантах осуществления два алкильных радикала являются разными (например, N-этил-N-метиламино).

В рамках настоящего изобретения, термин «арил» или «ароматический» означает любое стабильное моноциклическое или полициклическое углеродное кольцо, содержащее до 7 атомов углерода в каждом кольце, где, по меньшей мере, одно кольцо является ароматическим. Примеры арильных групп включают, не ограничиваясь этим, фенил, нафтил, антраценил, тетрагидронафтил, инданил и бифенил. В случаях, когда арильный заместитель является бициклическим, и одно кольцо неароматическим, то подразумевается,

что присоединение происходит через ароматическое кольцо. Арильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, насколько это позволяет нормальная валентность. Термин «арилалкил» или термин «аралкил» относится к алкилу, замещенному арилом. Термин «арилалкокси» относится к алкокси, замещенному арилом.

«Гетеро» относится к замещению, по меньшей мере, одного атома углерода в кольцевой системе, по меньшей мере, одним гетероатомом, выбранным из N, S и O. «Гетеро» также относится к замещению, по меньшей мере, одного атома углерода в ациклической системе. Гетерокольцевая система или гетероациклическая система может содержать, например, 1, 2 или 3 атома углерода, замещенных гетероатомом.

В рамках настоящего изобретения, термин «гетероарил» представляет собой стабильное моноциклическое или полициклическое кольцо, содержащее до 7 атомов в каждом кольце, где, по меньшей мере, одно кольцо является ароматическим и содержит от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S. Примеры гетероарильных групп включают, не ограничиваясь этим, акридинил, карбазолил, циннолинил, хиноксалинил, пиразолил, индолил, бензотриазолил, фуранил, тиенил, бензотиенил, бензофуранил, бензимидазолонил, бензоксазолонил, хинолинил, изохинолинил, дигидроизоиндолонил, имидазопиридинил, изоиндолинил, индазолил, оксазолил, оксадиазолил, изоксазолил, индолил, пиразинил, пиридазинил, пиридинил, пиримидинил, пирролил, тетрагидрохиолин. Также понимается, что «гетероарил» включает N-оксидное производное любого азотсодержащего гетероарила. В случаях, когда гетероарильный заместитель является бициклическим, и одно кольцо является неароматическим или не содержит гетероатомов, то подразумевается, что присоединение происходит через ароматическое кольцо или через кольцо, содержащее гетероатом. Гетероарильные группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, насколько это позволяет нормальная валентность.

В рамках настоящего изобретения термин «гетероцикл», «гетероциклический» или «гетероциклил» означает 3-14-членный ароматический или неароматический гетероцикл, содержащий от 1 до 4 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N и S, включая полициклические группы. В рамках настоящего изобретения, термин «гетероциклический» также является синонимом терминов «гетероцикл» и «гетероциклил» и также понимается как имеющий те же определения, какие приведены в настоящем документе. «Гетероциклил» включает вышеуказанные гетероарилы, а также их дигидро- и тетрагидроаналоги. Примеры гетероциклильных групп включают, не ограничиваясь этим, азетидинил, бензоимидазолил, бензофуранил, бензофуразанил, бензопиразолил, бензотриазолил, бензотиофенил, бензоксазолил, карбазолил, карболинил, циннолинил, фуранил, имидазолил, индолинил, индолил, индолазинил, индолазолил, изобензофуранил, изохинолил, изотиазолил, изоксазолил, нафтпиридинил, оксадиазолил, оксооксазолидинил, оксазолил, оксазолин, оксопиперазинил, оксопирролидинил, оксоморфолинил, изоксазолин, оксетанил, пиранил, пиразинил, пиразолил, пиридазинил, пиридопиридинил,

пиридазинил, пиридил, пиридинил, пиримидил, пиримидинонил, пирролил, хиназолинил, хинолил, хиноксалинил, тетрагидропиранил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиопиранил, тетрагидроизохинолинил, тетразолил, тетразолопиридил, тиадазолил, тиазолил, тиенил, триазолил, 1,4-диоксанил, гексагидроазепинил, пиперазинил, пиперидинил, пиридин-2-онил, пирролидинил, диазмидолиоморфолинил, морфолинил, тиоморфолинил, дигидробензоимидазолил, дигидробензофуранил, дигидробензотиофенил, дигидробензоксазолил, дигидрофуранил, дигидроимидазолил, дигидроиндолил, дигидроизооксазолил, дигидроизотиазолил, дигидрооксадиазолил, дигидрооксазолил, дигидропиразинил, дигидропиразолил, дигидропиридинил, дигидропиримидинил, дигидропирролил, дигидрохинолинил, дигидротетразолил, дигидротиадазолил, дигидротиазолил, дигидротиенил, дигидротриазолил, дигидроазетидинил, диоксидотиоморфолинил, метилendioксибензоил, тетрагидрофуранил и тетрагидротиенил, и их N-оксиды. Присоединение гетероциклического заместителя может иметь место через атом углерода или через гетероатом. Гетероциклические группы необязательно являются моно-, ди-, три-, тетра- или пентазамещенными в любом положении, насколько это позволяет нормальная валентность.

«Гетероциклоалкил» относится к циклоалкильному остатку, в котором от одного до четырех атомов углерода заменены гетероатомом, таким как кислород, азот или сера. Примеры гетероциклов, радикалы которых представляют собой гетероциклические группы, включают тетрагидропиран, морфолин, пирролидин, пиперидин, тиазолидин, оксазол, оксазолин, изоксазол, диоксан, тетрагидрофуран и т.п.

Термин «гетероарил» относится к ароматической 5-8-членной моноциклической, 8-12-членной бициклической или 11-14-членной трициклической кольцевой системе, имеющей 1-3 гетероатома, если она является моноциклической, 1-6 гетероатомов, если она является бициклической, или 1-9 гетероатомов, если она является трициклической, где указанные гетероатомы выбраны из O, N или S (например, атомы углерода и 1-3, 1-6 или 1-9 гетероатомов N, O или S, если они моноциклические, бициклические или трициклические, соответственно), где 0, 1, 2, 3 или 4 атома каждого кольца могут быть замещены заместителем. Примеры гетероарильных групп включают пиридил, фурил или фуранил, имидазолил, бензимидазолил, пиримидинил, тиофенил или тиенил, хинолинил, индолил, тиазолил и т.п. Термин «гетероарилалкил» или термин «гетероаралкил» относится к алкилу, замещенному гетероарилом. Термин «гетероарилалкокси» относится к алкокси, замещенному гетероарилом.

В рамках настоящего изобретения, термин «циклоалкил» включает насыщенные и частично ненасыщенные циклические углеводородные группы, содержащие от 3 до 12 атомов углерода, например, от 3 до 8 атомов углерода, и, например, от 3 до 6 атомов углерода, где циклоалкильная группа может быть дополнительно необязательно замещена. Циклоалкильные группы включают, без ограничения, циклопропил, циклобутил, цикlopентил, цикlopентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогептил и циклооктил.

Термин «ацил» относится к алкилкарбонильному, циклоалкилкарбонильному,

арилкарбонильному, гетероциклическому или гетероарилкарбонильному заместителю, любой из которых может быть дополнительно замещен заместителями.

В рамках настоящего изобретения, термин «кето» относится к любой алкильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, циклоалкенильной, гетероциклической, гетероарильной или арильной группе, имеющей значения определенные здесь, присоединенной через карбонильный мостик.

Примеры кетогрупп включают, не ограничиваясь этим, алканойл (например, ацетил, пропионил, бутанойл, пентанойл, гексанойл), алкеноил (например, акрилоил), алкиноил (например, этиноил, пропиноил, бутиноил, пентиноил, гексиноил), арилоил (например, бензоил), гетероарилоил (например, пирролоил, имидазолил, хинолиноил, пиридиноил).

В рамках настоящего изобретения, термин «алкоксикарбонил» относится к любой алкоксигруппе, имеющей значения, определенные выше, присоединенной через карбонильный мостик (т.е. $-C(O)O$ -алкил). Примеры алкоксикарбонильных групп включают, не ограничиваясь этим, метоксикарбонил, этоксикарбонил, изопропоксикарбонил, *n*-пропоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил, бензилоксикарбонил или *n*-пентоксикарбонил.

В рамках настоящего изобретения, термин «арилоксикарбонил» относится к любой арильной группе, имеющей значения, определенные здесь, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т.е. $-C(O)O$ -арил). Примеры арилоксикарбонильных групп включают, не ограничиваясь этим, феноксикарбонил и нафтилоксикарбонил.

В рамках настоящего изобретения, термин «гетероарилоксикарбонил» относится к любой гетероарильной группе, имеющей значения, определенные здесь, присоединенной через оксикарбонильный мостик (т.е. $-C(O)O$ -гетероарил). Примеры гетероарилоксикарбонильных групп включают, не ограничиваясь этим, 2-пиридилоксикарбонил, 2-оксазолилоксикарбонил, 4-тиазолилоксикарбонил или пиримидинилоксикарбонил.

Термин «оксо» относится к атому кислорода, который образует карбонил при присоединении к углероду, N-оксид при присоединении к азоту и сульфоксид или сульфон при присоединении к сере.

Специалистам в данной области хорошо известно, что соединения и композиции, раскрытые в настоящем документе, могут иметь определенные атомы (например, атомы N, O или S) в протонированном или депротонированном состоянии, в зависимости от среды, в которой находится соединение или помещена композиция. Следовательно, предусматривается, что в структурах, раскрытых здесь, определенные функциональные группы, например, такие как OH, SH или NH, могут быть протонированы или депротонированы. Настоящее раскрытие предназначено для охвата раскрытых соединений и композиций независимо от состояния их протонирования, основанного на pH окружающей среды, что хорошо известно специалистам в данной области техники.

II. РНК-агенты по изобретению

Настоящее изобретение относится к РНК-агентам, которые ингибируют

экспрессию гена LRRK2. В одном варианте осуществления РНК-агент включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена LRRK2 в клетке, такой как клетка субъекта, например млекопитающего, такого как человек, имеющего заболевание, ассоциированное с LRRK2. дцРНК включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна, по меньшей мере, участку мРНК, образованной при экспрессии гена LRRK2. Область комплементарности имеет длину примерно 15-30 нуклеотидов или менее. При контактировании с клеткой, экспрессирующей ген LRRK2, РНК-агент ингибирует экспрессию гена LRRK2 (например, гена человека, гена примата, гена животного, отличного от примата), по меньшей мере, на 25% или более, как здесь описано, по сравнению с аналогичной клеткой, не контактировавшей с РНК-агентом, или контактировавшей с РНК-агентом, не комплементарным гену LRRK2. Экспрессию гена LRRK2 можно анализировать, например, методом ПЦР или методом разветвленной ДНК (bDNA) или методом на основе белка, таким как иммунофлуоресцентный анализ, с использованием, например, вестерн-блоттинга или проточной цитометрии. В одном варианте осуществления уровень нокдауна определяют на линии человеческих опухолевых клеток A549 с использованием метода анализа, представленного в примере 1 ниже. В некоторых вариантах осуществления уровень нокдауна оценивают на первичных гепатоцитах мыши. В еще одном варианте осуществления уровень нокдауна оценивают на клетках Cos-7. В еще одном варианте осуществления уровень нокдауна оценивают на клетках BE(2)-C. В некоторых вариантах осуществления уровень нокдауна оценивают на клетках Neuro-2a.

дцРНК включает две цепи РНК, которые комплементарны и гибридизуются с образованием дуплексной структуры в условиях, в которых будет использоваться дцРНК. Одна цепь дцРНК (антисмысловая цепь) включает область комплементарности, которая по существу комплементарна или полностью комплементарна последовательности-мишени. Последовательность-мишень может быть получена из последовательности мРНК, образованной во время экспрессии гена LRRK2. Другая цепь (смысловая цепь) включает область, комплементарную антисмысловой цепи, так что две цепи гибридизуются и образуют дуплексную структуру при объединении в подходящих условиях. Как описано по тексту в других местах настоящего документа и, как известно в данной области техники, комплементарные последовательности дцРНК также могут находиться в виде самокомплементарных областей одной молекулы нуклеиновой кислоты, а не в виде отдельных олигонуклеотидов.

Как правило, дуплексная структура имеет длину от 15 до 30 пар оснований, например, 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 в длину. В некоторых вариантах осуществления дуплексная структура имеет от 18 до 25 пар оснований в длину, например, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22,

18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 или 24-25 пар оснований в длину, например, 19-21 пар оснований в длину. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть раскрытия.

Аналогично область комплементарности с последовательностью-мишенью имеет от 15 до 30 нуклеотидов в длину, например, 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 в длину, например 19-23 нуклеотида в длину или 21-23 нуклеотида в длину. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются как часть раскрытия.

В некоторых вариантах осуществления дуплексная структура имеет от 19 до 30 пар оснований в длину. Аналогично область комплементарности с последовательностью-мишенью имеет длину от 19 до 30 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет от 15 до 23 нуклеотидов в длину, от 19 до 23 нуклеотидов или от 25 до 30 нуклеотидов в длину. В общем, дцРНК является достаточно длинной, чтобы служить субстратом для фермента Dicer. Например, в данной области техники хорошо известно, что дцРНК длиной более 21-23 нуклеотидов могут служить субстратами для Dicer. Как также понятно специалисту в данной области, область РНК, предназначенная для расщепления, чаще всего является частью более крупной молекулы РНК, часто молекулы мРНК. В соответствующих случаях «часть» мРНК-мишени представляет собой непрерывную последовательность мРНК-мишени достаточной длины, чтобы она могла быть субстратом для РНКи-направленного расщепления (т. е. расщепления по пути RISC).

Специалистам в данной области также понятно, что дуплексная область представляет собой основной функциональный участок дцРНК, например, дуплексная область длиной примерно от 15 до 36 пар оснований, например, 15-36, 15-35, 15-34, 15-33, 15-32, 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 пары оснований, например, 19-21 пара оснований. Таким образом, в одном варианте осуществления, в той степени, в какой она процессируется в функциональный дуплекс, например, из 15-30 пар оснований, который нацелен на требуемую РНК для расщепления, молекула РНК или комплекс молекул РНК, содержащие дуплексную область из более 30 пар оснований представляет собой дцРНК. Таким образом, специалисту с обычной квалификацией в данной области будет понятно, что в одном варианте осуществления миРНК представляет собой дцРНК. В другом варианте

осуществления дцРНК не является встречающейся в природе миРНК. В еще одном варианте осуществления РНКи-агент, пригодный для нацеливания на экспрессию LRRK2, не образуется в клетке-мишени в результате расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, описанная здесь, может дополнительно включать один или несколько одноцепочечных выступающих нуклеотидов, например, 1, 2, 3 или 4 нуклеотида. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозид, включая дезоксинуклеотид/нуклеозид. Выступ(ы) может находиться на смысловой цепи, антисмысловой цепи или любой их комбинации. Кроме того, нуклеотид(ы) выступа могут находиться на 5'-конце, 3'-конце или на обоих концах либо антисмысловой, либо смысловой цепи дцРНК.

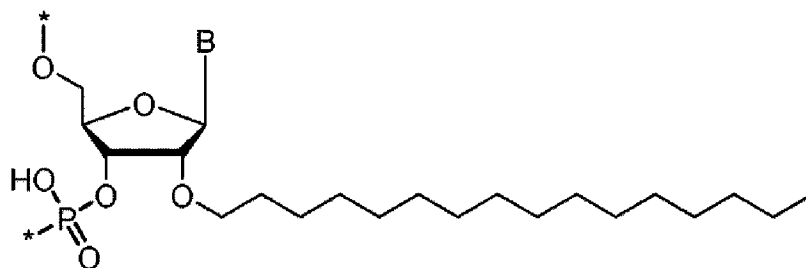
дцРНК можно синтезировать стандартными методами, известными в данной области. Соединения двухцепочечной РНКи по изобретению можно получить с использованием двустадийной процедуры. Во-первых, отдельные цепи двухцепочечной молекулы РНК получают отдельно. Затем составляющие цепи подвергают отжигу. Отдельные цепи соединения дцРНК могут быть получены с использованием синтеза в фазе раствора или твердофазного органического синтеза или того и другого. Преимущество органического синтеза заключается в том, что можно легко получить олигонуклеотидные цепи, содержащие неприродные или модифицированные нуклеотиды. Аналогичным образом, одноцепочечные олигонуклеотиды по изобретению можно получить с использованием синтеза в фазе раствора или твердофазного органического синтеза или того и другого.

В одном аспекте дцРНК по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Последовательность смысловой цепи для LRRK2 может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 3-4 и 6-7, и соответствующая нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи для смысловой цепи может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 3-4 и 6-7. В этом аспекте одна из двух последовательностей комплементарна другой из двух последовательностей, где одна из последовательностей по существу комплементарна последовательности мРНК, генерируемой при экспрессии гена LRRK2. Таким образом, в этом аспекте дцРНК будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая цепь («цепь-пассажир»), представленная в любой из таблиц 2-4, и второй олигонуклеотид описывается как соответствующая антисмысловая цепь (направляющая цепь) для смысловой цепи, представленной в любой из таблиц 3-4 и 6-7.

В одном варианте осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК находятся в отдельных олигонуклеотидах. В другом варианте осуществления по существу комплементарные последовательности дцРНК находятся в одном олигонуклеотиде.

Следует понимать, что хотя последовательности, представленные в таблицах 3-4 и

6-7, описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК в РНК-агенте по настоящему изобретению, например, дцРНК по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, представленных в любой из таблиц 3-4 и 6-7, которая является немодифицированной, неконъюгированной или модифицированной или конъюгированной иначе, чем представлено в таблицах. Например, хотя смысловые цепи агентов по изобретению могут быть конъюгированы с GalNAc-лигандом, эти агенты могут быть конъюгированы с молекулой, которая направляет доставку в ЦНС, например, с C16 лигандом, как здесь описано. В одном варианте липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C16-углеводородную цепь (например, линейный C16 алкил или алкенил). Липофильный лиганд может быть включен в любое из положений, предусмотренных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления липофильная группа конъюгирована с азотистым основанием, группой сахара или межнуклеозидной связью двухцепочечного иРНК-агента. Например, C16 лиганд может быть конъюгирован через 2'-кислород рибонуклеотида, как показано в следующей структуре:



где * обозначает связь с соседним нуклеотидом, и В представляет собой азотистое основание или аналог азотистого основания, где необязательно В представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил. Дизайн и синтез лигандов и мономеров, представленных здесь, описаны, например, в публикациях РСТ № WO2019/217459, WO2020/132227 и WO2020/257194, содержание которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный РНК-агент дополнительно содержит фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления аналог фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP). В некоторых вариантах осуществления 5'-конец антисмысловой цепи двухцепочечного средства иРНК не содержит 5'-винилфосфонат (VP).

Специалистам в данной области техники хорошо известно, что дцРНК, имеющие дуплексную структуру примерно из 20-23 пар оснований, например, из 21 пары оснований, были признаны особенно эффективными в индукции РНК-интерференции (Elbashir et al., (2001) EMBO J., 20:6877-6888). Однако другие исследователи установили, 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 вариантах осуществления, описанных выше, в силу природы олигонуклеотидных последовательностей, представленных здесь, дцРНК, описанные в настоящем документе,

могут включать, по меньшей мере, одну цепь длиной не менее 21 нуклеотида. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, за исключением нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть столь же эффективными по сравнению с вышеописанными дцРНК. Следовательно, дцРНК, имеющие последовательность, по меньшей мере, из 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более последовательных нуклеотидов, полученных из одной из последовательностей, представленных здесь, и различающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена LRRK2, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90% или, по меньшей мере, примерно на 95% по сравнению с контрольным уровнем от дцРНК, содержащей полную последовательность, по данным анализа *in vitro*, например, на опухолевых клетках A549 и в концентрации 10 нМ РНК-агента и анализа ПЦР, как здесь представлено в примерах, находится в пределах объема настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления ингибирование дцРНК, содержащей полную последовательность, измеряли с использованием анализа *in vitro* с первичными гепатоцитами мыши.

Кроме того, РНК-агенты, описанные здесь, идентифицируют сайт(ы) в транскрипте мРНК LRRK2, который чувствителен к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, в настоящем изобретении дополнительно представлены РНКи-агенты, нацеленные на этот(е) сайт(ы). Как используется в настоящем документе, РНКи-агент, как говорят, «нацелен на» конкретный сайт транскрипта мРНК, если РНКи-агент способствует расщеплению транскрипта мРНК в любом участке этого конкретного сайта. Такой РНКи-агент обычно включает, по меньшей мере, примерно 15 последовательных нуклеотидов, предпочтительно, по меньшей мере, 19 нуклеотидов из одной из последовательностей, обеспеченных здесь, соединенных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, происходящими из области, смежной с выбранной последовательностью в гене LRRK2.

III. Модифицированные РНКи-агенты по изобретению

В одном варианте осуществления РНК в РНКи-агенте по настоящему изобретению, например, дцРНК, является немодифицированной и не содержит модифицированных нуклеотидов, например, химических модификаций или конъюгаций, известных в данной области и описанных в настоящем документе. В предпочтительных вариантах осуществления РНК в РНКи-агенте по настоящему изобретению, например, дцРНК, химически модифицируют для повышения стабильности или других преимущественных характеристик. В некоторых вариантах осуществления изобретения по существу все нуклеотиды РНКи-агента по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения все нуклеотиды РНКи-агента по настоящему изобретению являются модифицированными. РНКи-агенты по настоящему изобретению, в которых «по существу все нуклеотиды являются модифицированными», в

значительной степени, но не полностью являются модифицированными, и могут включать не более 5, 4, 3, 2 немодифицированных нуклеотидов. В других вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-агенты по настоящему изобретению могут включать не более 5, 4, 3, 2 или 1 модифицированного нуклеотида.

Нуклеиновые кислоты, описанные в раскрытии, можно синтезировать и/или модифицировать способами, хорошо разработанными в данной области, такими как способы, описанные в публикации «Current protocols in nucleic acid chemistry», Beaucage, S.L. et al. (Edr.), John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, USA, которая включена здесь посредством ссылки. Модификации включают, например, концевые модификации, например, 5'-концевые модификации (фосфорилирование, конъюгация, связывание инвертированных повторов и т.д.), 3'-концевые модификации (конъюгация, ДНК-нуклеотиды, связывание инвертированных повторов и т.д.); модификации оснований, например, замену стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары оснований с более широким репертуаром партнеров, удаление оснований (абазические нуклеотиды) или конъюгированные основания; модификации сахаров (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замену сахара; модификации остова, включая модификацию или замену фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры РНК-агентов, пригодных для применения в настоящем изобретении, включают без ограничения РНК, содержащие модифицированные остовы или не содержащие природных межнуклеозидных связей. РНК, имеющие модифицированные остовы, включают среди прочего, остовы, которые не имеют атома фосфора в остова. В целях настоящего описания и как иногда указывается в данной области, модифицированные РНК, которые не имеют атома фосфора в своем межнуклеозидном остова, также рассматриваются в качестве олигонуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления модифицированный РНК-агент может иметь атом фосфора в своем межнуклеозидном остова.

Модифицированные остовы РНК включают, например, фосфоротиоаты, хиральные фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфотриэфиры, аминокилфосфотриэфиры, метил и другие алкилфосфонаты, включая 3'-алкиленфосфонаты и хиральные фосфонаты, фосфинаты, фосфорамидаты, включая 3'-аминофосфорамидат и аминокилфосфорамидаты, тионофосфорамидаты, тиоалкилфосфонаты, тиоалкилфосфотриэфиры и боронофосфаты, имеющие нормальные связи 3'-5', их аналоги с 2'-5'-связями, а также соединения с обратной полярностью, в которых соседние пары нуклеозидных звеньев связаны с 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' до 5'-2'. Также включаются различные соли, смешанные соли и формы свободных кислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения дцРНК-агенты по изобретению находятся в форме свободной кислоты. В других вариантах осуществления изобретения дцРНК-агенты по изобретению находятся в форме соли. В одном варианте осуществления дцРНК-агенты по изобретению находятся в форме натриевой соли. В некоторых вариантах осуществления, когда дцРНК-агенты по изобретению находятся в форме натриевой соли, то ионы натрия присутствуют в

агенте в качестве противоионов по существу для всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиоатных групп, присутствующих в агенте. Агенты, в которых практически все фосфодиэфирные и/или фосфоротиоатные связи имеют противоион натрия, включают не более 5, 4, 3, 2 или 1 фосфодиэфирной и/или фосфоротиоатной связи без противоиона натрия. В некоторых вариантах осуществления, когда дцРНК-агенты по изобретению находятся в форме натриевой соли, то ионы натрия присутствуют в агенте в качестве противоионов для всех фосфодиэфирных и/или фосфоротиоатных групп, присутствующих в агенте.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение вышеуказанных фосфорсодержащих соединений, включают, не ограничиваясь эти, 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 патент США RE39464, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

Модифицированные РНК-остовы, которые не содержат атома фосфора, имеют остовы, которые образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями, смешанными гетероатомами и алкильными или циклоалкильными межнуклеозидными связями или одной или несколькими короткоцепочечными гетероматомными или гетероциклическими межнуклеозидными связями. Такие остовы включают остовы, имеющие морфолиносвязи (образованные частично из группы сахара нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; содержащие алкен остовы; сульфаматные остовы; метиленимино- и метиленигидразино-остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, имеющие смешанные компоненты N, O, S и CH₂.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение вышеуказанных олигонуклеозидов, включают, не ограничиваясь этим, 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 каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

В других вариантах осуществления предусматриваются подходящие миметики РНК для применения в РНКи-агентах, в которых сахар и межнуклеозидные связи, т.е. остов из нуклеотидных единиц, заменяются новыми группами. Единицы, представленные основаниями, сохраняют для гибридизации с соответствующим соединением-мишенью в виде нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, которое,

как было показано, обладает превосходными свойствами в отношении гибридизации, называют пептидо-нуклеиновой кислотой (PNA). В PNA-соединениях сахарный остов РНК заменяется остовом, содержащим амиды, в частности, аминоктилглициновым остовом. Основания нуклеотидов сохраняют, и они связаны прямо или опосредованно с атомами азота аза-группы в амидной части остова. Соответствующие патенты США, в которых содержатся руководства по получению соединений PNA, включают без ограничения, патенты США № 5539082, 5714331 и 5719262, каждый из которых включен здесь посредством ссылки. Описание дополнительных соединений PNA, можно найти, например, в публикации Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

Некоторые варианты, описанные здесь, включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с остовами, содержащими гетероатомы, и в частности --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [известный как метилен(метиимино)- или MMI-остов], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- и --N(CH₃)--CH₂--CH₂--, описанные в вышеуказанном патенте США № 5489677, и амидные остовы, описанные в вышеуказанном патенте США № 5602240. В некоторых вариантах осуществления РНК, описанные здесь, имеют структуры морфолино-остова, описанные в вышеуказанном патенте США № 5034506. Нативный фосфодиэфирный остов может быть представлен как -O-P(O)(OH)-OCH₂-.

Модифицированные РНК также могут содержать одну или более замещенных групп сахара. РНКи-агенты, например, дцРНК, описанные здесь, могут содержать одну из следующих групп 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 представляют собой замещенный или незамещенный C₁-C₁₀ алкил или C₂-C₁₀ алкенил и C₂-C₁₀ алкинил. Примеры подходящих модификаций включают O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ и O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, где n и m равны от 1 до примерно 10. В других вариантах дцРНК содержат одну из следующих групп в 2'-положении: C₁-C₁₀ алкил, замещенный алкил, алкарил, аралкил, O-алкарил или O-аралкил, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, гетероциклоалкил, гетероциклоалкиларил, аминоктиламино, полиалкиламино, замещенный силил, РНК-расщепляющую группу, репортерную группу, интеркалятор, группу для улучшения фармакокинетических параметров РНКи-агента или группу для улучшения фармакодинамических свойств РНКи-агента и другие заместители, обладающие сходными свойствами. В некоторых вариантах модификация включает 2'-метоксиэтоксигруппу (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, также известную как 2'-O-(2-метоксиэтил) или 2'-МОЕ) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78: 486-504) т.е., алкокси-алкоксигруппу. Другим примером модификации является 2'-диметиламинооксиэтокси, т.е., группа O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах ниже, и 2'-диметиламиноэтоксизэтокси (также известная в данной области как 2'-диметиламиноэтоксизэтил или 2'-DMAEOE), т.е. 2'-O--CH₂-O--CH₂--N(CH₃)₂. Дополнительные иллюстративные модификации включают: 5'-Me-2'-F-нуклеотиды, 5'-

Me-2'-ОМе-нуклеотиды, 5'-Me-2'-дезоксинуклеотиды (оба R- и S-изомеры в этих трех семействах); 2'-алкоксиалкил; и 2'-NMA (N-метилацетамид).

Другие модификации включают 2'-метокси (2'-ОСН), 2'-аминопропокси (2'-ОСН₂СН₂СН₂НН₂), 2'-О-гексадецил и 2'-фтор (2'-F). Сходные модификации также могут быть получены в других положениях РНК в иРНК-агенте, в частности в 3'-положении сахара 3'-концевого нуклеотида или в 2'-5'-связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. РНКи-агенты также могут содержать миметики сахара, такие как циклобутильные группы, вместо сахара пентофуранозила. Репрезентативные патенты США, в которых описывается получение таких структур модифицированного сахара, включают, не ограничиваясь этим, патенты США № 4981957; 5118800; 5319080; 5359044; 5393878; 5446137; 5466786; 5514785; 5519134; 5567811; 5576427; 5591722; 5597909; 5610300; 5627053; 5639873; 5646265; 5658873; 5670633; и 5700920, авторы некоторых из которых также являются авторами настоящей заявки. Содержание каждого из указанных патентов в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

РНКи-агент по настоящему изобретению также может содержать модификации или замещения азотистых оснований (часто называемых в данной области просто «основаниями»). В рамках настоящего изобретения, «немодифицированные» или «природные» азотистые основания включают пуриновые основания аденин (A) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные азотистые основания включают другие синтетические и природные азотистые основания, такие как 5-метилцитозин (5-me-C), 5-гидроксиметилцитозин, ксантин, гипоксантин, 2-аминоаденин, 6-метил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-пропил- и другие алкильные производные аденина и гуанина, 2-тиоурацил, 2-тиотимин и 2-тиоцитозин, 5-галогенурацил и -цитозин, 5-пропинилурацил и -цитозин, 6-азоурацил, -цитозин и -тимин, 5-урацил (псевдоурацил), 4-тиоурацил, 8-галоген-, 8-амино-, 8-тиол-, 8-тиоалкил-, 8-гидроксил- и другие 8-замещенные аденины и гуанины, 5-галоген-, в частности 5-бром-, 5-трифторметил- и другие 5-замещенные урацилы и цитозины, 7-метилгуанин и 7-метиладенин, 8-азагуанин и 8-азааденин, 7-деазагуанин и 7-деазааденин и 3-деазагуанин и 3-деазааденин. Дополнительные азотистые основания включают основания, описанные в патенте США № 3687808, основания, раскрытые в публикации «Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine», Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; основания, раскрытые в публикации «The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering, pages 858-859, Kroschwitz J. L, ed. John Wiley and Sons, 1990, основания, раскрытые в публикации Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, и основания, раскрытые в публикации Sanghvi Y S., Chapter 15, dsRNA Research and Applications, pages 289-302, Crooke S. T. and Lebleu B., Ed., CRC Press, 1993. Некоторые из таких азотистых оснований особенно являются особенно пригодными для повышения аффинности связывания олигомерных соединений, описанных здесь. Такие основания включают 5-замещенные пиримидины, 6-азапиримидины и N-2-, N-6- и 0-6-замещенные пурины, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-

пропинилцитозин. Было показано, что замены 5-метилцитозином повышают стабильность дуплексов нуклеиновых кислот на 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 примером замен оснований, еще более предпочтительно в сочетании с 2'-О-метоксиэтил-модификациями сахара.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение некоторых из вышеуказанных модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований, включают, не ограничиваясь этим, упомянутые выше патенты США № 3687808, 4845205; 5130302; 5134066; 5175273; 5367066; 5432272; 5457187; 5459255; 5484908; 5502177; 5525711; 5552540; 5587469; 5594121, 5596091; 5614617; 5681941; 5750692; 6015886; 6147200; 6166197; 6222025; 6235887; 6380368; 6528640; 6639062; 6617438; 7045610; 7427672; и 7495088, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

РНКи-агент по настоящему изобретению также можно модифицировать, включив в него один или несколько групп бициклического сахара. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное мостиковым соединением из двух атомов. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, имеющий группу сахара, содержащую мостик, соединяющий два атома углерода сахарного кольца, тем самым образуя бициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления агент по настоящему изобретению может включать одну или более заблокированных нуклеиновых кислот (LNA). Заблокированная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеотид, имеющий модифицированную группу рибозы, в которой группа рибозы содержит дополнительный мостик, соединяющий 2'- и 4'-атомы углерода. Другими словами, LNA представляет собой нуклеотид, содержащий группу бициклического сахара, содержащий мостик 4'-CH₂-O-2'. Эта структура эффективно «запирает» рибозу в структурной 3'-эндо-конформации. Было показано, что добавление заблокированных нуклеиновых кислот к миРНК повышает стабильность миРНК в сыворотке и снижает побочные эффекты (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 по настоящему изобретению включают, без ограничения, нуклеозиды, содержащие мостик между 4'- и 2'-атомами рибозильного кольца. В некоторых вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотидные агенты по настоящему изобретению включают один или более бициклических нуклеозидов, содержащих 4' к 2' мостик. Примеры таких бициклических нуклеозидов, соединенных 4' по 2' мостиком, включают, не ограничиваясь этим, 4'-(CH₂)-O-2' (LNA); 4'-(CH₂)-S-2'; 4'-(CH₂)₂-O-2' (LNA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (также обозначенный как «ограниченный этилом» или «сEt») и 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (и их аналоги; см., например, патент США № 7399845); 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' (и его аналоги; см., например, патент США № 8278283); 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' (и его

аналоги; см., например, патент США № 8278425); 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (см., например, публикацию заявки на патент США № 2004/0171570); 4'-CH₂-N(R)-O-2', где R представляет собой H, C₁-C₁₂ алкил 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 вышеперечисленных документов включено здесь посредством ссылки.

Дополнительные репрезентативные патенты США и публикации патентов США, в которых описано получение заблокированных нуклеотидов нуклеиновых кислот, включают, не ограничиваясь этим, следующие: патенты США № 6268490; 6525191; 6670461; 6770748; 6794499; 6998484; 7053207; 7034133; 7084125; 7399845; 7427672; 7569686; 7741457; 8022193; 8030467; 8278425; 8278426; 8278283; заявки на патент США 2008/0039618 и 2009/0012281, полное содержание каждого из которых включено здесь посредством ссылки.

Любой из вышеуказанных бициклических нуклеозидов может быть получен с одной или более стереохимическими конфигурациями сахаров, включая, например, α-L-рибофуранозу и β-D-рибофуранозу (см. WO 99/14226).

РНКи-агент по настоящему изобретению также можно модифицировать для включения одного или более конформационно ограниченных этилом нуклеотидов. В рамках настоящего изобретения, термин «конформационно ограниченный этилом нуклеотид» или «сEt» представляет собой заблокированную нуклеиновую кислоту, содержащую группу бициклического сахара, включающую мостик 4'-CH(CH₃)-O-2'. В одном варианте осуществления конформационно ограниченный этилом нуклеотид находится в S-конформации, именуемой здесь «S-сEt».

РНКи-агент по настоящему изобретению может также включать один или более «конформационно ограниченных нуклеотидов» («CRN»). CRN представляют собой аналоги нуклеотидов с линкером, соединяющим C2' и C4' атомы углерода рибозы или C3 и C5' атомы углерода рибозы. CRN фиксирует кольцо рибозы в стабильной конформации и увеличивает сродство гибридизации с мРНК. Линкер имеет достаточную длину, чтобы поместить кислород в оптимальное положение для обеспечения стабильности и сродства, что приводит к меньшему искривлению рибозного кольца.

Репрезентативные публикации, в которых описано получение некоторых из вышеуказанных CRN, включают, не ограничиваясь этим, US 2013/0190383; и WO 2013/036868, полное содержание каждой из которых включено здесь посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит один или более мономеров, которые представляют собой нуклеотиды UNA (разблокированная нуклеиновая кислота). UNA представляет собой разблокированную ациклическую нуклеиновую кислоту, в которой любая из связей сахара удалена, образуя разблокированный «сахарный» остаток. В одном примере UNA также включает мономер с удаленными связями между C1'-C4' (т.е. ковалентная связь углерод-кислород-углерод

между атомами углерода C1' и C4'). В другом примере удалена связь C2'-C3' (т.е. ковалентная углерод-углеродная связь между атомами углерода C2' и C3') сахара (см. Nuc. Acids Symp. Series, 52, 133-134 (2008) и Fluiter et al., Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039, указанные документы включены здесь посредством ссылки).

Репрезентативные публикации США, в которых описано получение UNA, включают, помимо прочего, патент США № 8314227; и публикации патентов США 2013/0096289; 2013/0011922; и 2011/0313020, полное содержание каждого из которых настоящим включено сюда посредством ссылки.

РНКи-агент по настоящему изобретению может также включать одну или более «циклогексеновых нуклеиновых кислот» или («CeNA»). CeNA представляют собой аналоги нуклеотидов с заменой фуранозной группы ДНК циклогексеновым кольцом. Включение циклогексенилнуклеозидов в цепь ДНК увеличивает стабильность гибрида ДНК/РНК. CeNA устойчива к деградации в сыворотке, и гибрид CeNA/РНК способен активировать РНКазу *N. E. coli*, что приводит к расщеплению цепи РНК (см. публикацию Wang et al., Am. Chem. Soc., 2000, 122, 36, 8595-8602, которая включена здесь посредством ссылки).

Потенциально стабилизирующие модификации концов молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-NHAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-NHAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (эфир), N-(аминокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-амино), 2-докозаноилуридин-3"-фосфат, инвертированное основание dT(idT) и другие. Описание этой модификации можно найти в WO 2011/005861.

Другие модификации РНКи-агента по настоящему изобретению включают 5'-фосфат или 5'-миметик фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата в антисмысловой цепи РНКи-агента. Подходящие миметики фосфата описаны, например, в заявке на патент США 2012/0157511, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

А. Модифицированные РНКи-агенты, содержащие мотивы по изобретению

В некоторых аспектах изобретения двухцепочечные РНКи-агенты по изобретению включают агенты с химическими модификациями, как описано, например, в WO 2013/075035, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки. Как показано здесь и в WO 2013/075035, один или более мотивов трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах могут быть введены в смысловую цепь или антисмысловую цепь РНКи-агента, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь РНКи-агента могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает паттерн модификации, если он присутствует, смысловой или антисмысловой цепи. РНКи-агент можно необязательно конъюгировать с липофильным лигандом, например С16 лигандом, например, в смысловой цепи. РНКи-агент может быть необязательно модифицирован модификацией (S)-гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), например, в одном или более остатках антисмысловой цепи. Полученные РНКи-агенты могут обладать повышенной

активностью в сайленсинге генов.

Следовательно, настоящее изобретение относится к двухцепочечным РНКи-агентам, способным ингибировать экспрессию гена-мишени (т.е. гена LRRK2) *in vivo*. РНКи-агент включает смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь РНКи-агента может иметь 15-30 нуклеотидов в длину. Например, каждая цепь может иметь 16-30 нуклеотидов в длину, 17-30 нуклеотидов в длину, 25-30 нуклеотидов в длину, 27-30 нуклеотидов в длину, 17-23 нуклеотида в длину, 17-21 нуклеотида в длину, 17-19 нуклеотидов в длину, 19-25 нуклеотидов в длину, 19-23 нуклеотидов в длину, 19-21 нуклеотидов в длину, 21-25 нуклеотидов в длину или 21-23 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления каждая цепь имеет 19-23 нуклеотида в длину.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь обычно образуют дуплексную двухцепочечную РНК («дцРНК»), также называемую здесь «РНКи-агентом». Дуплексная область РНКи-агента может иметь длину 15-30 пар нуклеотидов. Например, дуплексная область может иметь 16-30 пар нуклеотидов в длину, 17-30 пар нуклеотидов в длину, 27-30 пар нуклеотидов в длину, 17-23 пар нуклеотидов в длину, 17-21 пару нуклеотидов в длину, 17-21 пару нуклеотидов в длину, 19 пар нуклеотидов в длину, 19-25 пар нуклеотидов в длину, 19-23 пары нуклеотидов в длину, 19-21 пару нуклеотидов в длину, 21-25 пар нуклеотидов в длину или 21-23 пары нуклеотидов в длину. В другом примере дуплексная область выбрана из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину. В предпочтительных вариантах осуществления дуплексная область имеет 19-21 пару нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления РНКи-агент может содержать один или несколько выступающих участков или кэпирующих групп на 3'-конце, 5'-конце или на обоих концах одной или обеих цепей. Выступ может иметь 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, 1-4 нуклеотида в длину, 3 нуклеотида в длину, 2-3 нуклеотида в длину или 1-2 нуклеотида в длину. В предпочтительных вариантах осуществления нуклеотидный выступ имеет 2 нуклеотида в длину. Выступы могут быть результатом того, что одна цепь длиннее другой, или результатом расположения двух цепей одинаковой длины в шахматном порядке. Выступ может образовывать несовпадение с мРНК-мишенью, или он может быть комплементарным последовательности гена-мишени, или может представлять собой другую последовательность. Первая и вторая цепи также могут быть соединены, например, дополнительными основаниями с образованием шпильки или другими линкерами, не содержащими оснований.

В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в выступающей области РНКи-агента может независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая, помимо прочего, 2'-модифицированный сахар, такой как 2-F, 2'-О-метил, тимидин (Т) и любые их комбинации.

Например, ТТ может представлять собой выступающую последовательность для любого конца любой цепи. Выступ может образовывать несовпадение с мРНК-мишенью,

или он может быть комплементарным последовательности гена-мишени, или может представлять собой другую последовательность.

5'- или 3'-выступы на смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепях РНК-агента могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающий(ие) участок(и) содержит два нуклеотида, содержащих фосфоротиоат между двумя нуклеотидами, где два нуклеотида могут быть одинаковыми или разными. В одном варианте выступ находится на 3'-конце смысловой цепи, антисмысловой цепи или обеих цепей. В одном варианте осуществления данный 3'-выступ находится в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления данный 3'-выступ находится в смысловой цепи.

РНК-агент может содержать только один выступ, что может усиливать интерференционную активность РНК, не оказывая влияния на ее общую стабильность. Например, одноцепочечный выступ может находиться на 3'-конце смысловой цепи или, альтернативно, на 3'-конце антисмысловой цепи. РНК также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (т. е. на 3'-конце смысловой цепи) или наоборот. Как правило, антисмысловая цепь РНК имеет нуклеотидный выступ на 3'-конце, и тупой 5'-конец. Не желая ограничиваться конкретной теорией, асимметричный тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи и выступ на 3'-конце антисмысловой цепи способствуют вовлечению направляющей цепи в процесс RISC.

В одном варианте осуществления РНК-агент имеет двойные тупые концы и имеет 19 нуклеотидов в длину, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 7, 8 и 9 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 от 5'-конца.

В еще одном варианте осуществления РНК-агент имеет двойные тупые концы и имеет 20 нуклеотидов в длину, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 8, 9 и 10 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 от 5'-конца.

В еще одном варианте осуществления РНК-агент имеет двойные тупые концы и имеет 21 нуклеотид в длину, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, один мотив из трех 2'-F-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10 и 11 от 5'-конца. Антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 от 5'-конца.

В одном варианте осуществления РНК-агент 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 в трех последовательных нуклеотидах в положениях 9, 10 и 11 от 5'-конца; антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 от 5'-конца, где один конец РНК-агента тупой, и другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов. Выступ из 2 нуклеотидов может находиться на 3'-конце

антисмысловой цепи. Когда выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи, между тремя концевыми 3'-нуклеотидами антисмысловой цепи, то могут быть две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, где два из трех нуклеотидов являются нуклеотидными выступами, и третий нуклеотид является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. В одном варианте осуществления РНКи-агент дополнительно имеет две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми 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 РНКи-агента, включая нуклеотиды, которые являются частью мотивов, представляют собой модифицированные нуклеотиды. В одном варианте осуществления каждый остаток независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором, например, в чередующемся мотиве. Необязательно РНКи-агент дополнительно содержит лиганд (например, липофильный лиганд, необязательно C16 лиганд).

В одном варианте осуществления РНКи-агент содержит смысловую и антисмысловую цепи, где смысловая цепь имеет 25-30 нуклеотидных остатков в длину, где, начиная от 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения 1-23 первой цепи содержат, по меньшей мере, 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь имеет 36-66 нуклеотидных остатков в длину и, начиная от 3'-концевого нуклеотида, содержит, по меньшей мере, 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где, по меньшей мере, 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6 последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя 3'-одноцепочечный выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит от 10 до 30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя 10-30 нуклеотидный одноцепочечный 5'-выступ; где, по меньшей мере, 5'-концевые и 3'-концевые нуклеотиды смысловой цепи спарены по основаниям с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выровнены для обеспечения максимальной комплементарности, тем самым образуя по существу дуплексную область между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является достаточно комплементарной РНК-мишени по меньшей мере вдоль 19 рибонуклеотидов длины антисмысловой цепи для снижения экспрессии гена-мишени 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 находится в сайте расщепления или рядом с ним. Антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один мотив из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в месте расщепления или рядом с ним.

В одном варианте осуществления РНКи-агент содержит смысловую и антисмысловую цепи, где РНКи-агент содержит первую цепь длиной не менее 25 и не более 29 нуклеотидов и вторую цепь длиной не более 30 нуклеотидов, по меньшей мере, с одним

мотивом из трех 2'-О-метил-модификаций в трех последовательных нуклеотидах в положениях 11, 12 и 13 от 5'-конца; где 3'-конец первой цепи и 5'-конец второй цепи образуют тупой конец, и вторая цепь на 3'-конце длиннее на 1-4 нуклеотида, чем первая цепь, где дуплексная область, которая составляет не менее 25 нуклеотидов в длину, и вторая цепь достаточно комплементарна мРНК-мишени вдоль, по меньшей мере, 19 нуклеотидов второй цепи для снижения экспрессии гена-мишени при введении РНКи-агента в клетку млекопитающего, и где происходит расщепление РНКи-агента предпочтительно приводит к образованию миРНК, содержащей 3'-конец второй цепи, тем самым снижая экспрессию гена-мишени у млекопитающего. Необязательно, РНКи-агент дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления смысловая цепь РНКи-агента содержит, по меньшей мере, один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления в смысловой цепи.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь РНКи-агента может также содержать, по меньшей мере, один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, где один из мотивов находится в сайте расщепления или рядом с ним в антисмысловой цепи.

Для РНКи-агента, имеющего дуплексную область 17-23 нуклеотида в длину, сайт расщепления антисмысловой цепи обычно находится в положениях 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы трех одинаковых модификаций могут находиться в положениях 9, 10 и 11; положениях 10, 11 и 12; положениях 11, 12 и 13; положениях 12, 13 и 14; или положениях 13, 14 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца антисмысловой цепи, или нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи. Сайт расщепления в антисмысловой цепи также может изменяться в зависимости от длины дуплексной области РНКи от 5'-конца.

Смысловая цепь РНКи-агента может содержать, по меньшей мере, один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в сайте расщепления цепи; и антисмысловая цепь может иметь, по меньшей мере, один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в месте расщепления цепи или рядом с ним. Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь образуют дуплекс дцРНК, то смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, что один мотив из трех нуклеотидов в смысловой цепи и один мотив из трех нуклеотидов в антисмысловой цепи имеют, по меньшей мере, один выступ, 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. Альтернативно, по меньшей мере, два нуклеотида могут перекрываться или все три нуклеотида могут перекрываться.

В одном варианте осуществления смысловая цепь РНКи-агента может содержать более одного мотива трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Первый мотив может находиться в месте расщепления цепи или рядом с ним, и другие

мотивы могут представлять собой крыльевую модификацию. В рамках настоящего изобретения, термин «крыльевая модификация» относится к мотиву, находящемуся в другом участке цепи, который отделен от мотива в месте расщепления той же цепи или рядом с ним. Крыльевая модификация либо прилегает к первому мотиву, либо отделена, по меньшей мере, одним или несколькими нуклеотидами. Когда мотивы непосредственно примыкают друг к другу, то тогда химический состав мотивов отличается друг от друга, и когда мотивы разделены одним или несколькими нуклеотидами, то химический состав может быть одинаковым или различным. Могут присутствовать две или более крыльевые модификации. Например, когда присутствуют две крыльевые модификации, то каждая крыльевая модификация может находиться на одном конце по отношению к первому мотиву, который находится в месте расщепления или рядом с ним, или с любой стороны от ведущего мотива.

Подобно смысловой цепи, антисмысловая цепь РНК-агента может содержать более одного мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидов, где, по меньшей мере, один из мотивов находится в сайте расщепления цепи или рядом с ним. Эта антисмысловая цепь может также содержать одну или более крыльевых модификаций в расположении, аналогичном крылевым модификациям, которые могут присутствовать в смысловой цепи.

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

В еще одном варианте крыльевая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи РНК-агента обычно не включает первые один или два спаренных нуклеотида в области дуплекса на 3'-конце, 5'-конце или обоих концах цепи.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь РНК-агента содержат, по меньшей мере, одну модификацию крыла, модификации крыла могут приходиться на один и тот же конец дуплексной области и иметь перекрывающиеся один, два или три нуклеотида.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь РНК-агента содержат, по меньшей мере, две модификации крыла, смысловая цепь и антисмысловая цепь могут быть выровнены таким образом, что каждая из двух модификаций одной цепи попадает на один конец дуплексной области, имея перекрывающиеся из одного, двух или трех нуклеотидов; две модификации каждой из одной цепи попадают на другой конец дуплексного участка, имеющего перекрытие в один, два или три нуклеотида; две модификации по одной цепи приходятся на каждую сторону ведущего мотива, имея перекрытие в один, два или три нуклеотида в дуплексной области.

В одном варианте осуществления РНК-агент содержит несовпадение(я) с мишенью в пределах дуплекса или их комбинации. Несовпадение может возникнуть в выступающей области или области дуплекса. Пара оснований может быть ранжирована на основе их склонности способствовать диссоциации или плавлению (например, по свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретной пары, самый простой подход состоит в том, чтобы

исследовать пары на основе индивидуальной пары, хотя следующий сосед или аналогичный анализ также может быть использован). С точки зрения стимуляции диссоциации: A:U предпочтительнее G:C; G:U предпочтительнее G:C; и I:C предпочтительнее G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические или отличные от канонических пары (как описано в другом месте в настоящем документе), предпочтительнее канонических (A:T, A:U, G:C) пар; и пары, которые включают универсальное основание, предпочтительнее канонических пар.

В одном варианте осуществления РНК-агент содержит, по меньшей мере, одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных областях от 5'-конца антисмысловой цепи, независимо выбранных из группы: A:U, G:U, I:C и несоответствующие пары, например, неканонические или отличные от канонических пары или пары, которые включают универсальное основание, чтобы способствовать диссоциации антисмысловой цепи на 5'-конце дуплекса.

В одном варианте осуществления нуклеотид в положении 1 в области дуплекса от 5'-конца антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. Альтернативно, по меньшей мере, одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в области дуплекса от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в области дуплекса от 5'-конца антисмысловой цепи представляет собой пару оснований AU.

В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокситимидин (dT). В другом варианте осуществления нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимидин (dT). В одном варианте осуществления имеется короткая последовательность дезокситиминовых нуклеотидов, например, два нуклеотида dT на 3'-конце смысловой или антисмысловой цепи.

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

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

где:

каждый из i и j независимо равен 0 или 1;

каждый из p и q независимо равен 0-6;

каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит по меньшей мере два по-разному модифицированных нуклеотида;

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

каждый n_p и n_q независимо представляет собой нуклеотидный выступ;

где N_b и Y не имеют одинаковых модификаций; и

XXX, YYY и ZZZ, каждый независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Предпочтительно все

YYY представляет собой 2'-F- модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления N_a или N_b содержат модификации в чередующемся порядке.

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или рядом с ним. Например, когда РНК-агент имеет дуплексную область длиной 17-23 нуклеотида, 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) смысловой цепи, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца; или, необязательно нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца.

В одном варианте осуществления i равен 1, и j равен 0, или i равно 0, и j равно 1, или оба i и j равны 1. Таким образом, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:

5' n_p - N_a -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Ib);

5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_a - n_q 3' (Ic); или

5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Id).

Когда смысловая цепь представлена формулой (Ib), то N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов.

Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловая цепь представлена формулой (Ic), то N_b представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a может независимо представлять собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда смысловая цепь представлена формулой (Id), то каждый 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 равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Каждый N_a может независимо 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 друг от друга.

В других вариантах осуществления i равен 0, и j равен 0, и смысловая цепь может быть представлена формулой:

5' n_p - N_a -YYY- N_a - n_q 3' (Ia).

Когда смысловая цепь представлена формулой (Ia), то каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

В одном варианте осуществления последовательность антисмысловой цепи РНК-агента может быть представлена формулой (II):



где:

k и l каждый независимо равен 0 или 1;

p' и q' каждый независимо равен 0-6;

каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит, по меньшей мере, два по-разному модифицированных нуклеотида;

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

каждый n_p' и n_q' независимо представляет собой нуклеотидный выступ;

где N_b' и Y' не имеют одинаковых модификаций;

и $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ и $Z'Z'Z'$, каждый независимо, представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах.

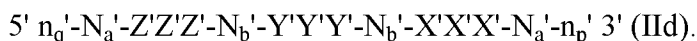
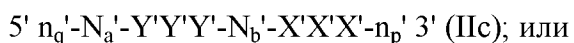
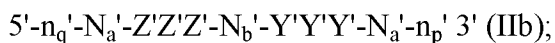
В одном варианте осуществления N_a' или N_b' содержат модификации в чередующемся порядке.

В одном варианте осуществления мотив $Y'Y'Y'$ находится в сайте расщепления антисмысловой цепи или рядом с ним. Например, когда РНК-агент имеет дуплексную область длиной 17-23 нуклеотида, 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, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца. Предпочтительно мотив $Y'Y'Y'$ находится в положениях 11, 12, 13.

В одном варианте осуществления мотив $Y'Y'Y'$ представляет собой все 2'-ОМe-модифицированные нуклеотиды.

В одном варианте осуществления k равен 1, и l равен 0, или k равен 0, и l равен 1, или оба k и l равны 1.

Таким образом, антисмысловую цепь можно представить следующими формулами:



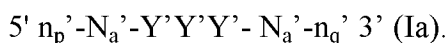
Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIb), то N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIc), то N_b' представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10

модифицированных нуклеотидов.

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (II_d), то каждый N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированные нуклеотиды. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Предпочтительно N_b равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В еще одних вариантах осуществления k равен 0, и l равен 0, и антисмысловая цепь может быть представлена формулой:



Когда антисмысловая цепь представлена формулой (II_a), то каждый N_a' 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 друг от друга.

Каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи может быть независимо модифицирован LNA, UNA, 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. В частности, каждый X, Y, Z, X', Y' и Z' может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В одном варианте осуществления смысловая цепь РНК-агента может содержать мотив YYY, находящийся в положениях 9, 10 и 11 цепи, когда дуплексная область составляет 21 нуклеотид, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области от 5'-конца; и Y представляет собой 2'-F-модификацию. Смысловая цепь может дополнительно содержать мотив XXX или мотивы ZZZ в качестве крыльевых модификаций на противоположном конце дуплексной области; и XXX и ZZZ, каждый 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, где нумерация начинается от 1-го нуклеотида от 5'-конца; или необязательно нумерация начинается от 1-го спаренного нуклеотида в дуплексной области 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 крыльевых модификаций на противоположном конце дуплексной области; и X'X'X' и Z'Z'Z', каждый 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 (II_d) соответственно.

Соответственно, РНК-агенты для применения в способах по настоящему изобретению могут содержать смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых

содержит от 14 до 30 нуклеотидов, где дуплекс РНКи представлен формулой (III):

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

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

где:

каждый i, j, k и l независимо равен 0 или 1;

каждый p, p', q и q' независимо равен 0-6;

каждый N_a и N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-25 модифицированных нуклеотидов, где каждая последовательность содержит, по меньшей мере, два по-разному модифицированных нуклеотида;

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

где:

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

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

В одном варианте осуществления i равен 0, и j равен 0; или i равен 1 и j равен 0; или i равен 0, и j равен 1; или оба i и j равны 0; или оба i и j равны 1. В другом варианте осуществления k равен 0, и l равен 0; или k равен 1, и l равен 0; k равен 0, и l равен 1; или оба k и l равны 0; или оба k и l равны 1.

Примеры комбинаций смысловой цепи и антисмысловой цепи, образующих дуплекс РНКи, включают следующие формулы:

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

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

$5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

$3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIb)

$5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

$3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIc)

$5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

$3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIId)

Когда РНКи-агент представлен формулой (IIIa), то каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНКи-агент представлен формулой (IIIb), то каждый N_b независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 1-10, 1-7, 1-5 или 1-4 модифицированных нуклеотида. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНКи-агент представлен формулой (IIIc), то каждый N_b, N_b' независимо

представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов.

Когда РНК-агент представлен формулой (III_d), то каждый N_b , N_b' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 или 0 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a , N_a' , N_b и N_b' независимо содержит модификации в чередующемся порядке.

В одном варианте осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (III_d), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию. В еще одном варианте осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (III_d), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, и $n_p' > 0$, и, по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь. В еще одном варианте осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (III_d), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, $n_p' > 0$, и, по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одной или более C16 группами (или родственными), присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер (описанный ниже). В еще одном варианте осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (III_d), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, $n_p' > 0$, и, по меньшей мере, один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одной или более липофильными, например, C16 (или родственными) молекулами, необязательно присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления, когда РНК-агент представлен формулой (III_a), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, $n_p' > 0$, и, по меньшей мере один n_p' связан с соседним нуклеотидом через фосфоротиоатную связь, смысловая цепь содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную связь, и смысловая цепь конъюгирована с одной или более липофильными, например, C16 (или родственными) молекулами, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления РНК-агент представляет собой мультимер, содержащий, по меньшей мере, два дуплекса, представленных формулами (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 разных гена; или каждый из

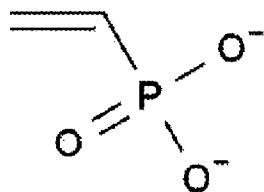
дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В одном варианте осуществления РНК-агент представляет собой мультимер, содержащий три, четыре, пять, шесть или более дуплексов, представленных формулами (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), 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 разных гена; или каждый из дуплексов может быть нацелен на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

В одном варианте осуществления два РНК-агента, представленные формулами (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), связаны друг с другом на 5'-конце, и один или оба на 3'-конце и необязательно конъюгированы с лигандом. Каждый из агентов может быть нацелен на один и тот же ген или на два разных гена; или каждый из агентов может быть нацелен на один и тот же ген в двух разных сайтах-мишенях.

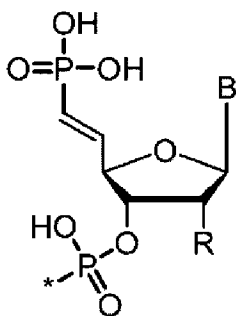
В различных патентных публикациях описываются мультимерные РНК-агенты, которые можно использовать в способах по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520; и патент США № 7858769, полное содержание каждого из которых включено здесь в качестве ссылки.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению включают модификацию РНК-агента винилфосфонатом (VP), как здесь описано. В типичных вариантах осуществления винилфосфонат по настоящему изобретению имеет следующую структуру:



Винилфосфонат по настоящему изобретению может быть присоединен либо к антисмысловой, либо к смысловой цепи дцРНК по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления винилфосфонат по настоящему описанию присоединен к антисмысловой цепи дцРНК, необязательно на 5'-конце антисмысловой цепи дцРНК. дцРНК-агент может содержать фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой или антисмысловой цепи. 5'-концевая фосфорсодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфоротиоат (5'-PS), 5'-концевой фосфородитиоат (5'-PS2), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат (MePhos) или 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил. Когда 5'-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), то 5'-VP может представлять собой изомер 5'-E-VP (т.е. транс-винилфосфат, изомер (т.е. цис-винилфосфат) или их смеси.

Например, когда миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP), то 5'-концевой нуклеотид может иметь следующую структуру:

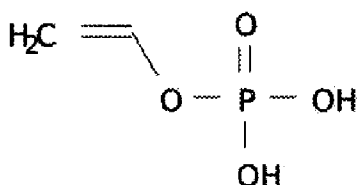


где * указывает расположение связи в 5'-положении соседнего нуклеотида;

R представляет собой атом водорода, гидроксид, метокси или фтор (например, гидроксид); и

B представляет собой азотистое основание или модифицированное азотистое основание, где необязательно B представляет собой аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил.

Модификации винилфосфатом также предусмотрены для композиций и способов по настоящему описанию. Иллюстративная структура винилфосфата:



i. Термически дестабилизирующие модификации

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК может быть оптимизирована для обеспечения РНК-интерференции путем включения термически дестабилизирующих модификаций в затравочную область антисмысловой цепи. В рамках настоящего изобретения, термин «затравочная область» означает положения 2-9 от 5'-конца указанной цепи. Например, термически дестабилизирующие модификации могут быть включены в затравочную область антисмысловой цепи, чтобы уменьшить или ингибировать сайленсинг нецелевого гена.

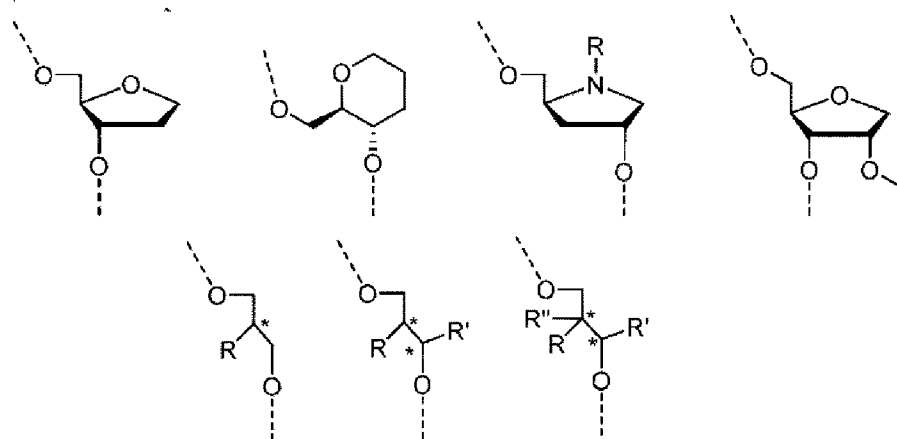
Термин «термически дестабилизирующая(ие) модификация(и)» включает модификацию(и), которая приводит к получению дцРНК с более низкой общей температурой плавления (T_m), чем T_m дцРНК без такой(их) модификации(й). Например, термически дестабилизирующая(ие) модификация(и) может снизить T_m дцРНК на 1-4°C, например, на один, два, три или четыре градуса Цельсия. И термин «термически дестабилизирующий нуклеотид» относится к нуклеотиду, содержащему одну или более термически дестабилизирующих модификаций.

Было обнаружено, что дцРНК с антисмысловой цепью, содержащей, по меньшей мере, одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в первых 9 нуклеотидных положениях, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи, обладают сниженной активностью в сайленсинге нецелевого гена. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере,

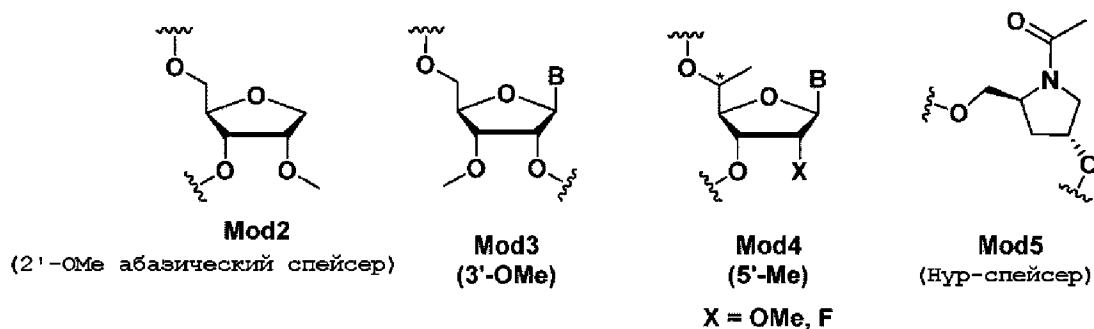
одну (например, одну, две, три, четыре, пять или более) термически дестабилизирующую модификацию дуплекса в первых 9 нуклеотидных положениях от 5'-области антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления одна или более термически дестабилизирующих модификаций дуплекса расположены в положениях 2-9, таких как положения 4-8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая(ие) модификация(и) дуплекса расположена(ы) в положении 6, 7 или 8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В еще некоторых дополнительных вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 7 от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса расположена в положении 2, 3, 4, 5 или 9 от 5'-конца антисмысловой цепи.

Термически дестабилизирующие модификации могут включать, не ограничиваясь этим, удаление азотистого основания; несовпадение с противоположным нуклеотидом в противоположной цепи; и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксид-модификация или ациклический нуклеотид, например, разблокированные нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA).

Примеры модификаций азотистого основания включают, не ограничиваясь следующим:

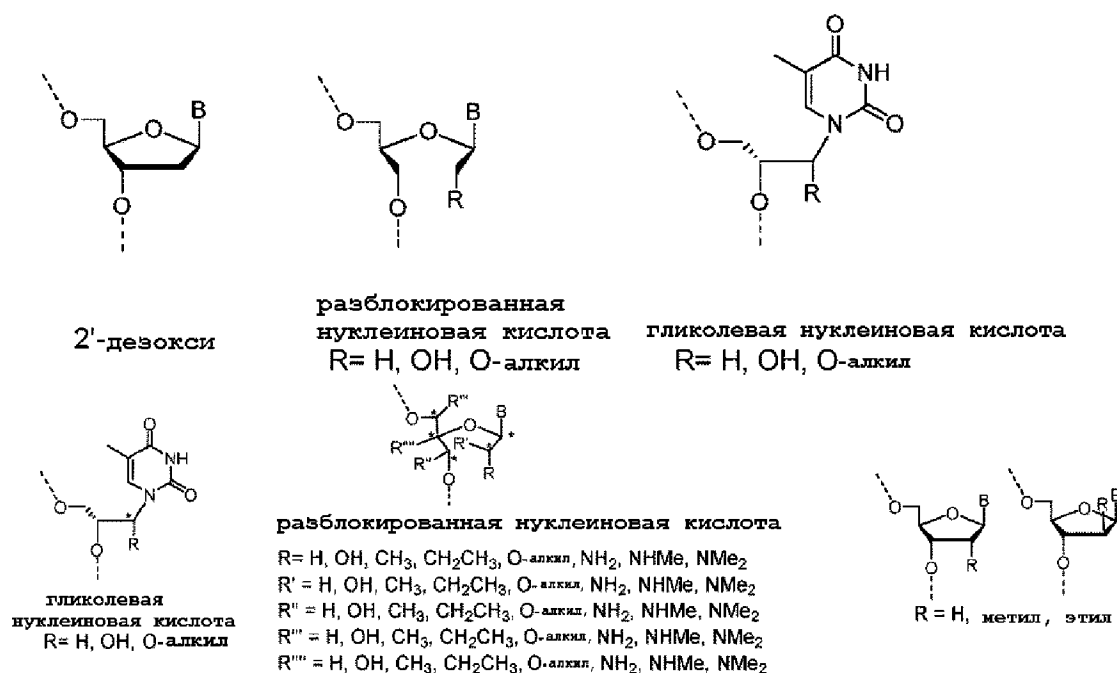


где R=H, Me, Et или OMe; R'=H, Me, Et или OMe; R''=H, Me, Et или OMe



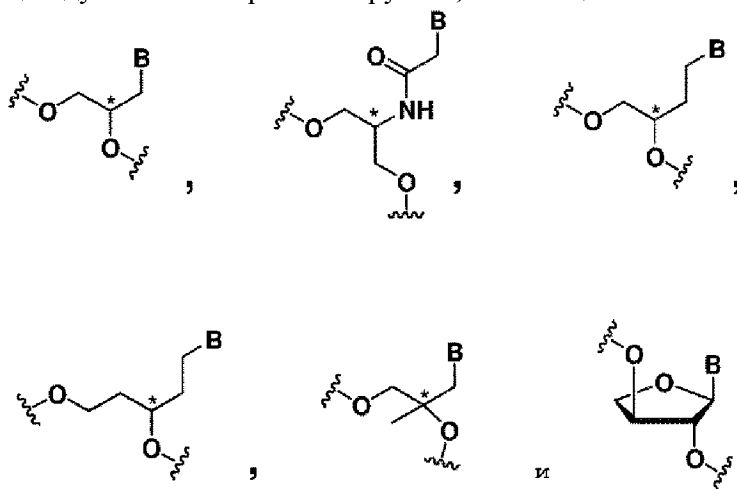
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

Примеры модификаций сахара включают, не ограничиваясь следующим:



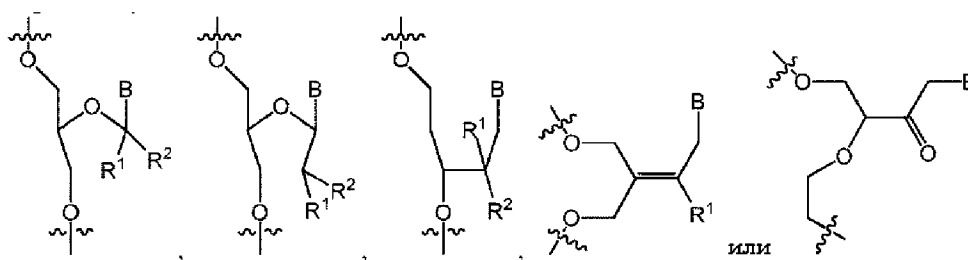
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса выбрана из группы, состоящей из:



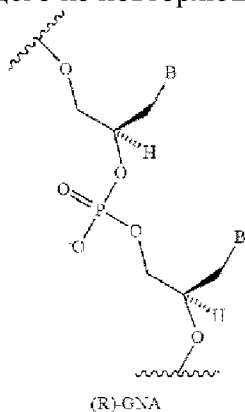
где В представляет собой модифицированное или немодифицированное азотистое основание, и звездочка в каждой структуре представляет собой либо R-изомер, S-изомер, либо рацемическое соединение.

Термин «ациклический нуклеотид» относится к любому нуклеотиду, содержащему ациклический сахар рибозу, например, где любая из связей между атомами углерода рибозы (например, C1'-C2', C2'-C3', C3'-C4', C4'-O4' или C1'-O4') отсутствует или, по меньшей мере, один из атомов углерода рибозы или кислорода (например, C1', C2', C3', C4' или O4') независимо или в комбинации отсутствует в нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления ациклический нуклеотид представляет собой:



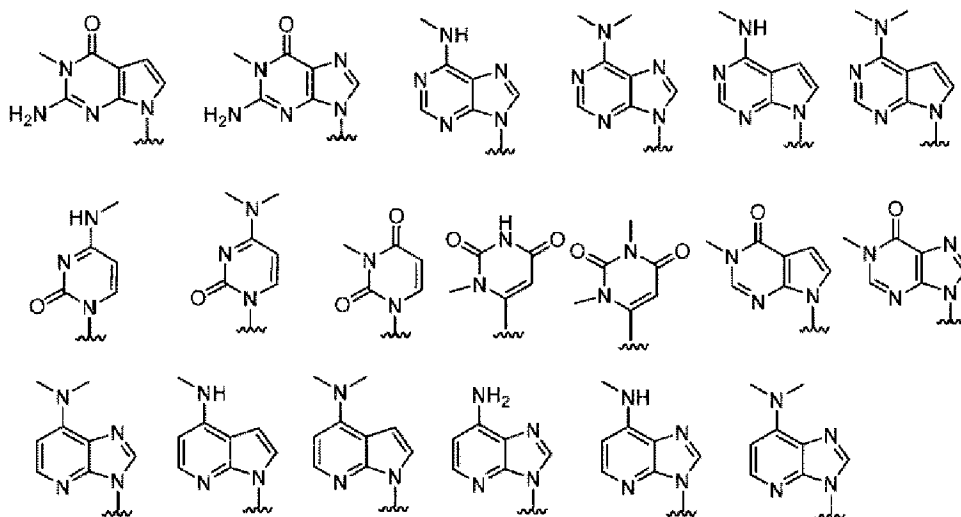
модифицированное или немодифицированное азотистое основание, R^1 и R^2 независимо представляют собой H, атом галогена, OR_3 или алкил; и R_3 представляет собой H, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар). Ациклическое производное обеспечивает большую гибкость остова, не влияя на спаривание оснований Уотсона-Крика. Ациклический нуклеотид может быть связан через 2'-5' или 3'-5' связь.

Термин «GNA» относится к гликолевой нуклеиновой кислоте, которая представляет собой полимер, подобный ДНК или РНК, но отличающийся составом своего «остова», состоящего из повторяющихся звеньев глицерина, связанных фосфодиэфирными связями:



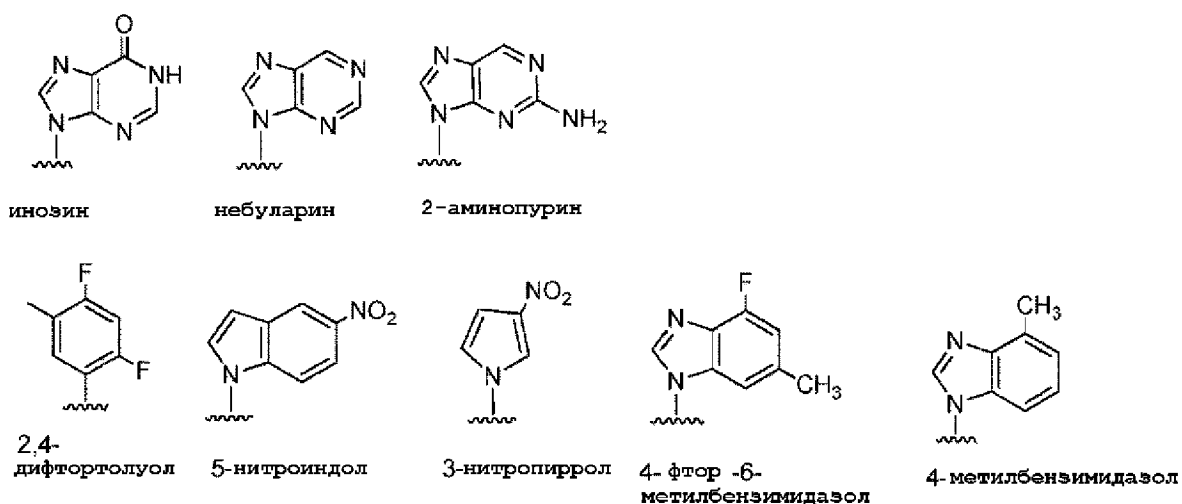
Термически дестабилизирующей модификацией дуплекса могут быть несовпадения (т. е. некомплементарные пары оснований) между термически дестабилизирующим нуклеотидом и противоположным нуклеотидом в противоположной цепи внутри дуплекса дцРНК. Примеры несовпадающих пар оснований включают G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T или их комбинация. Другие несовпадающие пары оснований, известные в данной области, также входят в объем настоящего изобретения. Несовпадение может возникать между нуклеотидами, которые являются либо природными нуклеотидами, либо модифицированными нуклеотидами, т. е. несовпадение спаривания оснований может иметь место между азотистыми основаниями соответствующих нуклеотидов независимо от модификаций сахаров рибоз в нуклеотидах. В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит, по меньшей мере, одно азотистое основание в несовпадающей паре, которое представляет собой 2'-дезоксисовпадение; например, 2'-дезоксисовпадение находится в смысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой цепи включает нуклеотиды с нарушенными водородными связями Уотсона-Крика с комплементарным основанием в мРНК-мишени, такие как:

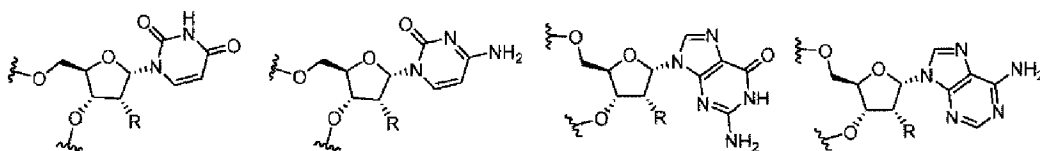


Другие примеры модификаций абазических нуклеотидов, ациклических нуклеотидов (включая UNA и GNA) и модификаций несовпадений подробно описаны в WO 2011/133876, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки. К термически дестабилизирующим модификациям могут относиться также универсальные основания с пониженной или отсутствующей способностью образовывать водородные связи с противоположными основаниями и фосфатные модификации.

В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса включает нуклеотиды с неканоническими основаниями, такие как, помимо прочего, модификации азотистых оснований с нарушенной или полностью отсутствующей способностью образовывать водородные связи с основаниями в противоположной цепи. Эти модификации азотистых оснований оценивали на предмет дестабилизации центральной области дуплекса дцРНК, как описано в WO 2010/0011895, которая в полном объеме включена в настоящий документ посредством ссылки. Примеры модификаций азотистых оснований:

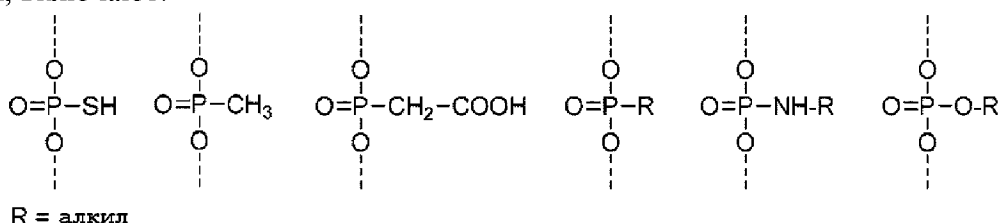


В некоторых вариантах осуществления термически дестабилизирующая модификация дуплекса в затравочной области антисмысловой цепи включает один или более α -нуклеотидов, комплементарных основанию в мРНК-мишени, например:



где R представляет собой H, OH, OCH₃, F, NH₂, NHMe, NMe₂ или O-алкил.

Примеры фосфатных модификаций, которые, как известно, снижают термостабильность дуплексов дцРНК по сравнению с природными фосфодиэфирными связями, включают:



Алкил для R-группы может представлять собой C₁-C₆алкил. Конкретные алкилы для группы R включают, не ограничиваясь этим, метил, этил, пропил, изопропил, бутил, пентил и гексил.

Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, с учетом функциональной роли азотистых оснований, определяющей специфичность РНКи-агента по настоящему изобретению, модификации азотистых оснований могут быть выполнены различными способами, описанными здесь, например, для введения дестабилизирующих модификаций в РНКи-агент по изобретению, например, с целью усиления действия на мишень по сравнению с нецелевым действием, диапазон доступных модификаций и, как правило, присутствующих в РНКи-агентах по изобретению имеет тенденцию быть намного больше для модификаций, не связанных с азотистыми основаниями, например, модификации сахарных групп или фосфатных остовов полирибонуклеотидов. Такие модификации более подробно описаны в других разделах настоящего описания и явно предусмотрены для РНКи-агентов по настоящему изобретению, содержащих либо природные азотистые основания, либо модифицированные азотистые основания, как описано выше или по тексту в других местах в данном документе.

В дополнение к антисмысловой цепи, содержащей термически дестабилизирующую модификацию, дцРНК также может содержать одну или более стабилизирующих модификаций. Например, дцРНК может содержать, по меньшей мере, две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующих модификаций. Без ограничений, все стабилизирующие модификации могут находиться в одной цепи. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепи содержат, по меньшей мере, две стабилизирующие модификации. Стабилизирующая модификация может находиться в любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи. Например, стабилизирующая модификация может находиться в каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая стабилизирующая модификация может находиться в чередующемся порядке в смысловой цепи или антисмысловой цепи; или

смысловая цепь или антисмысловая цепь содержат обе стабилизирующие модификации в чередующемся порядке. Чередующийся порядок стабилизирующих модификаций в смысловой цепи может быть таким же или отличным от чередующегося порядка в антисмысловой цепи, и чередующийся порядок стабилизирующих модификаций в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося порядка стабилизирующих модификаций в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, стабилизирующая модификация в антисмысловой цепи может находиться в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5'-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 2, 14 и 16 от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну стабилизирующую модификацию, расположенную рядом с дестабилизирующей модификацией. Например, стабилизирующей модификацией может быть нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т.е. в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит стабилизирующую модификацию на каждом из 5'-конца и 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, две стабилизирующие модификации на 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т. е. в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) стабилизирующие модификации. Без ограничений, стабилизирующая модификация смысловой цепи может находиться в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит стабилизирующие модификации в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит блок из двух, трех или

четырёх стабилизирующих модификаций.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь не содержит стабилизирующей модификации в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

Примеры термически стабилизирующих модификаций включают, не ограничиваясь этим, 2'-фтор-модификации. Другие термически стабилизирующие модификации включают, не ограничиваясь этим, LNA.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК по настоящему изобретению содержит, по меньшей мере, четыре (например, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничения, все 2'-фторнуклеотиды могут находиться в одной цепи. В некоторых вариантах осуществления как смысловая, так и антисмысловая цепи содержат, по меньшей мере, два 2'-фторнуклеотида. 2'-фтор-модификация может находиться в любом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи. Например, 2'-фтор-модификация может находиться в каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая 2'-фтор-модификация может находиться в чередующемся порядке в смысловой или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержит обе 2'-фтор-модификации в чередующемся порядке. Чередующийся порядок 2'-фтор-модификаций в смысловой цепи может быть таким же или отличным от чередующегося порядка 2'-фтор-модификаций в смысловой цепи, и чередующийся порядок 2'-фтор-модификаций в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося порядка 2'-фтор-модификаций в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотидов. Без ограничения, 2'-фтор-модификация в антисмысловой цепи может находиться в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 6, 14 и 16 от 5'-конца. В еще некоторых других вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 2, 14 и 16 от 5'-конца.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один 2'-фторнуклеотид, смежный с дестабилизирующей модификацией. Например, 2'-фторнуклеотид может представлять собой нуклеотид на 5'-конце или 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т.е. в положении -1 или +1 от положения дестабилизирующей модификации. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотид на каждом из 5'-конца и 3'-конца от дестабилизирующей модификации, т.е. в положениях -1 и +1 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, два 2'-фторнуклеотида на 3'-конце от дестабилизирующей модификации, т.е. в положениях +1 и +2 от положения дестабилизирующей модификации.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере,

два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более) 2'-фторнуклеотида. Без ограничения, 2'-фтор-модификация в смысловой цепи может находиться в любых положениях. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях 7, 9, 10 и 11 от 5'-конца. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых других вариантах осуществления смысловая цепь содержит 2'-фторнуклеотиды в положениях, противоположных или комплементарных положениям 11, 12, 13 и 15 антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит блок из двух, трех или четырех 2'-фторнуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь не содержит 2'-фторнуклеотида в положении, противоположном или комплементарном термически дестабилизирующей модификации дуплекса в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению содержит смысловую цепь из 21 нуклеотида (nt) и антисмысловую цепь из 23 нуклеотидов (nt), где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один термически дестабилизирующий нуклеотид, где, по меньшей мере, один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положениях 2-9 от 5'-конца антисмысловой цепи), где один конец дцРНК является тупым, и другой конец содержит выступ из 2 нуклеотидов, и где дцРНК необязательно дополнительно имеет, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит, по меньшей мере, четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК содержит тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи. Предпочтительно выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, где: смысловая цепь имеет длину 25-30 нуклеотидных остатков, где начиная с 5'-концевого нуклеотида (положение 1), положения с 1 по 23 указанной смысловой цепи содержат, по меньшей мере, 8 рибонуклеотидов; антисмысловая цепь имеет длину 36-66 нуклеотидных остатков и, начиная с 3'-концевого нуклеотида, не менее 8 рибонуклеотидов в положениях, спаренных с положениями 1-23 смысловой цепи с образованием дуплекса; где, по меньшей мере, 3'-концевой нуклеотид антисмысловой цепи не спарен со смысловой цепью, и до 6

последовательных 3'-концевых нуклеотидов не спарены со смысловой цепью, тем самым образуя 3'-одноцепочечный выступ из 1-6 нуклеотидов; где 5'-конец антисмысловой цепи содержит от 10 до 30 последовательных нуклеотидов, которые не спарены 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 спарены по основаниям с нуклеотидами антисмысловой цепи, когда смысловая и антисмысловая цепи выровнены для обеспечения максимальной комплементарности, тем самым образуя по существу дуплексную область между смысловой и антисмысловой цепями; и антисмысловая цепь является достаточно комплементарной РНК-мишени, по меньшей мере, вдоль 19 рибонуклеотидов длины антисмысловой цепи, для снижения экспрессии гена-мишени при введении указанной двухцепочечной нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего; и где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один термически дестабилизирующий нуклеотид, где, по меньшей мере, один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (т.е. в положениях 2-9 от 5'-конца антисмысловой цепи). Например, термически дестабилизирующий нуклеотид находится между положениями, противоположными или комплементарными положениям 14-17 от 5'-конца смысловой цепи, и где дцРНК необязательно дополнительно имеет, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнауклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнауклеотидных связей; и (vi) дцРНК содержит, по меньшей мере, четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК содержит дуплексную область длиной 12-30 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению содержит смысловую и антисмысловую цепи, где указанная молекула дцРНК содержит смысловую цепь длиной не менее 25 и не более 29 нуклеотидов, и антисмысловую цепь длиной не более 30 нуклеотидов со смысловой цепью, содержащей модифицированный нуклеотид, который подвержен ферментативному расщеплению в положении 11 от 5'-конца, где 3'-конец указанной смысловой цепи и 5'-конец указанной антисмысловой цепи образуют тупой конец, и указанная антисмысловая цепь на 1-4 нуклеотида длиннее на своем 3'-конце, чем смысловая цепь, где дуплексная область имеет длину не менее 25 нуклеотидов, и указанная антисмысловая цепь является достаточно комплементарной мРНК-мишени, по меньшей мере, вдоль 19 нуклеотидов указанной длины антисмысловой цепи для снижения экспрессии гена-мишени, когда указанную молекулу дцРНК вводят в клетку млекопитающего, и где расщепление *dicer* указанной дцРНК предпочтительно приводит к образованию миРНК, содержащей указанный 3'-конец указанной антисмысловой цепи, тем самым снижая экспрессию гена-мишени у млекопитающего, где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, один термически

дестабилизирующий нуклеотид, где, по меньшей мере, один термически дестабилизирующий нуклеотид находится в затравочной области антисмысловой цепи (т.е. в положении 2-9 от 5'-конца антисмысловой цепи), и где дцРНК необязательно дополнительно имеет, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; и (vi) дцРНК содержит, по меньшей мере, четыре 2'-фтор-модификации; и (vii) дцРНК имеет дуплексную область длиной 12-29 пар нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой и антисмысловой цепях молекулы дцРНК может быть модифицирован. Каждый нуклеотид может быть модифицирован одной и той же или другой модификацией, которая может включать одно или более изменений одного или обоих несвязывающих атомов кислорода фосфата или одного или нескольких связывающих атомов кислорода фосфата; изменение компонента сахара рибозы, например, 2'-гидроксила сахара рибозы; полную замену фосфатной группы линкерами «дефосфо»; модификацию или замену природного основания; и замену или модификацию рибозо-фосфатного остова.

Поскольку нуклеиновые кислоты представляют собой полимеры из субъединиц, то многие из модификаций имеют место в положении, которое повторяется внутри нуклеиновой кислоты, например, модификация основания или фосфатной группы или несвязывающего О фосфатной группы. В некоторых случаях модификация будет находиться во всех положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях это отсутствует. Например, модификация может иметь место только в 3'- или 5'-концевом положении, может иметь место только в концевой области, например, в положении на концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5 или 10 нуклеотидов цепи. Модификация может находиться в двухцепочечной области, одноцепочечной области или в обеих. Модификация может находиться только в двухцепочечной области РНК или может иметь место только в одноцепочечной области РНК. Например, фосфоротиоатная модификация в несвязывающем положении О находится только на одном или обоих концах, может находиться только в концевой области, например, в положении в концевом нуклеотиде или в последних 2, 3, 4, 5, или 10 нуклеотидах в цепи, или могут встречаться в двухцепочечных и одноцепочечных областях, особенно на концах. 5'-конец или концы могут быть фосфорилированы.

Возможно, например, повысить стабильность, включив определенные основания в выступы или включив модифицированные нуклеотиды или заменители нуклеотидов в одноцепочечные выступы, например, в 5'- или 3'-выступ, или в оба. Например, может быть желательным включить пуриновые нуклеотиды в выступы. В некоторых вариантах осуществления все или некоторые основания 3'- или 5'-выступа могут быть

модифицированы, например, модификацией, описанной в настоящем документе. Модификации могут включать, например, использование модификаций во 2'-положении сахара рибозы с модификациями, известными в данной области, например, с использованием дезоксирибонуклеотидов, 2'-дезоксид-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метил-модифицированный вместо рибосахара азотистого основания, и модификации в фосфатной группе, например, фосфоротиоатные модификации. Выступы не обязательно должны быть гомологичны с последовательностью-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован заблокированной нуклеиновой кислотой (LNA), разблокированной нуклеиновой кислотой (UNA), циклогексеновой нуклеиновой кислотой (CeNA), 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксид или 2'-фтором. Цепи могут содержать более одной модификации. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. Следует понимать, что эти модификации являются дополнением, по меньшей мере, к одной термически дестабилизирующей модификации дуплекса, находящегося в антисмысловой цепи.

Как правило, в смысловой и антисмысловой цепи находится, по меньшей мере, две различные модификации. Этими двумя модификациями могут быть 2'-дезоксид-модификация, 2'-О-метил-модификация или 2'-фтор-модификация, ациклические нуклеотиды или другие. В некоторых вариантах осуществления каждая смысловая и антисмысловая цепь содержит два по-разному модифицированных нуклеотида, выбранных из 2'-О-метила или 2'-дезоксид. В некоторых вариантах осуществления каждый остаток смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилнуклеотидом, 2'-дезоксинуклеотидом, 2'-дезоксид-2'-фторнуклеотидом, 2'-О-N-метилацетамидо (2'-О-NMA) нуклеотидом, 2'-О-диметиламиноэтоксиэтил (2'-О-DMAEOE) нуклеотидом, 2'-О-аминопропил (2'-О-AP) нуклеотидом или 2'-ара-Ф-нуклеотидом. Вновь, следует понимать, что эти модификации являются дополнением, по меньшей мере, к одной термически дестабилизирующей модификации дуплекса, присутствующего в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах цепи молекула дцРНК по настоящему изобретению содержит модификации в чередующемся порядке, в частности, в областях В1, В2, В3, В1', В2', В3', В4'. В рамках настоящего изобретения, термин «чередующийся мотив» или «чередующийся порядок» относится к мотиву, имеющему одну или несколько модификаций, где каждая модификация находится в чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному на каждый второй нуклеотид или одному на каждые три нуклеотида или аналогичный паттерн. Например, если каждый из А, В и С представляет один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может представлять собой «АВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВВВВВВВВВ...», «АААВВВВВВВВВ...» или «АВСВСВСВСВСВ...» и т. д.

Тип модификаций, содержащихся в чередующемся мотиве, может быть одинаковым или различным. Например, если каждый из А, В, С, D представляет собой один тип модификации нуклеотида, то чередующийся порядок, т. е. модификации в каждом последующем нуклеотиде, может быть одинаковым, но каждый для смысловой цепи или антисмысловой цепи можно выбрать из нескольких возможных модификаций в чередующемся мотиве, таком как «АВАВАВ...», «АСАСАС...», «ВДВДВД...» или «СДСДСД...» и т. д.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению содержит паттерн модификации для чередующегося мотива в смысловой цепи, который сдвинут относительно паттерна модификации чередующегося мотива в антисмысловой цепи. Сдвиг может представлять собой такой, что модифицированная группа нуклеотидов смысловой цепи соответствует различно модифицированной группе нуклеотидов антисмысловой цепи и наоборот. Например, смысловая цепь, когда является спаренной с антисмысловой цепью в дуплекс дцРНК, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «АВАВАВ» от 5'-3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВАВАВА» от 5'-3' цепи в дуплексной области. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ААВВААВВ» от 5'-3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВВААВВАА» от 5'-3' цепи в дуплексной области, таким образом, что существует полный или частичный сдвиг паттерном модификации между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

Молекула дцРНК по настоящему изобретению может дополнительно содержать, по меньшей мере, одну фосфоротиаонатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиаонатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи может находиться в любом нуклеотиде смысловой цепи или антисмысловой цепи или обеих в любом положении цепи. Например, модификация межнуклеотидной связи может иметь место в каждом нуклеотиде смысловой или антисмысловой цепи; каждая модификация межнуклеотидной связи может иметь место в чередующемся порядке в смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержит обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся порядке. Чередующийся порядок модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может быть таким же или отличным от такового в антисмысловой цепи, и чередующийся паттерн модификации межнуклеотидной связи в смысловой цепи может иметь сдвиг относительно чередующегося порядка модификации межнуклеотидной связи в антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит модификацию фосфоротиаонатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающей области. Например, выступающая область содержит два нуклеотида, имеющих фосфоротиаонатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь между двумя нуклеотидами. Модификации межнуклеотидной связи также могут быть сделаны для связывания выступающих нуклеотидов с концевыми спаренными нуклеотидами в области дуплекса. Например, по меньшей мере, 2, 3, 4 или все нуклеотидные выступы могут быть

связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и необязательно могут быть дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие нуклеотидный выступ со спаренным нуклеотидом, который находится рядом с выступающим нуклеотидом. Например, может быть по меньшей мере, две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между тремя концевыми нуклеотидами, где два из трех нуклеотидов являются нуклеотидными выступами, и третий является спаренным нуклеотидом рядом с выступающим нуклеотидом. Предпочтительно эти три концевых нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь молекулы дцРНК содержит 1-10 блоков из двух-десяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении олигонуклеотидной последовательности, и указанная смысловая цепь спарена с антисмысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидной связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из двух фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидной связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из трех фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатной, метилфосфонатной и фосфатной межнуклеотидной связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из четырех фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении

олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из пяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную или фосфатную связи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из шести фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из семи фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК содержит два блока из восьми фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь молекулы дцРНК

содержит два блока из девяти фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей, разделенных 1, 2, 3 или 4 фосфатными межнуклеотидными связями, где одна из фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей расположена в любом положении в олигонуклеотидной последовательности, и указанная антисмысловая цепь спарена со смысловой цепью, содержащей любую комбинацию фосфоротиоатных, метилфосфонатных и фосфатных межнуклеотидных связей, или антисмысловой цепью, содержащей либо фосфоротиоатную, либо метилфосфонатную, либо фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в 1-10 концевых положениях смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи на одном или обоих концах смысловой или антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит одну или более модификаций фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в 1-10 нуклеотидах внутренней области дуплекса каждой смысловой или антисмысловой цепи. Например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов могут быть связаны через фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь в положениях 8-16 дуплексной области, где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи; молекула дцРНК может необязательно дополнительно содержать одну или более модификаций фосфоротиоатных или метилфосфонатных межнуклеотидных связей в 1-10 нуклеотидах от концевого положения(й).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит от одной до пяти модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 и от одной до пяти модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и от одной до пяти модификаций фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и от одной до пяти в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 и одну модификацию фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 или 2 и две модификации фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфоротиоатной

межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 21 и 22 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 22 и 23 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению дополнительно содержит одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 1 и одну модификацию фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положении 21 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца), и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и две модификации фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 23 и 23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит структуру хиральных центров остова. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 5 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 6 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 7 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 8 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает по меньшей мере 9 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 10 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления

[illegible]

межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает не более 3 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает не более 2 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает не более 1 межнуклеотидной связи, которая не является хиральной. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 10 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 8 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 11 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 7 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 12 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 13 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 6 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 14 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 5 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления общая структура хиральных центров остова включает, по меньшей мере, 15 межнуклеотидных связей в Sp-конфигурации и не более 4 межнуклеотидных связей, которые не являются хиральными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Sp-конфигурации необязательно являются смежными или несмежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи в Sp-конфигурации необязательно являются смежными или несмежными. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидные связи, которые не являются хиральными, необязательно являются смежными или несмежными.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит блок, представляющий собой стереохимический блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Rp-блок в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Rp. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Rp-блок. В некоторых вариантах осуществления блок представляет собой Sp-блок в том смысле, что каждая межнуклеотидная связь блока представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению содержат как Rp-блоки, так и Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению содержат один или более Rp-

блоков, но не содержат Sp-блоки. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению содержат один или более Sp-блоков, но не содержат Rp-блоки. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по изобретению содержат один или более PO-блоков, в которых каждая межнуклеотидная связь представляет собой природную фосфатную связь.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит 5'-блок, представляющий собой Sp-блок, где каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок представляет собой Sp-блок, в котором каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 5'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой модифицированную межнуклеотидную связь, и каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок представляет собой Sp-блок, где каждая межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь, и каждая группа сахара содержит 2'-F-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 4 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 5 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 6 или более нуклеозидных звеньев. В некоторых вариантах осуществления 3'-блок содержит 7 или более нуклеозидных звеньев.

В некоторых вариантах осуществления соединение по настоящему изобретению содержит тип нуклеозида в области или олигонуклеотиде, за которым следует определенный тип межнуклеотидной связи, например, природная фосфатная связь, модифицированная межнуклеотидная связь, Rp-хиральная межнуклеотидная связь, Sp-хиральная межнуклеотидная связь и т. д. В некоторых вариантах осуществления за A следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за A следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за A следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за U следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за U следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за U следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за C следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за C следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за C следует природная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за G следует Sp.

В некоторых вариантах осуществления за G следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за G следует естественная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за C и U следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за C и U следует Rp. В некоторых вариантах осуществления за C и U следует естественная фосфатная связь (PO). В некоторых вариантах осуществления за A и G следует Sp. В некоторых вариантах осуществления за A и G следует Rp.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23, где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положениях 2-9 от 5'-конца антисмысловой цепи), и где дцРНК необязательно дополнительно имеет, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит, по меньшей мере, четыре 2'-фтор-модификации; (vii) дцРНК содержит дуплексную область длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23, где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенного в затравочной области антисмысловой цепи (т.е. в положениях 2-9 5'-конца антисмысловой цепи), и где дцРНК необязательно дополнительно имеет, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (v) дцРНК содержит не менее четырех 2'-фтор-модификаций; (vi) дцРНК содержит дуплексную область длиной 12-40 пар нуклеотидов; (vii) дцРНК содержит дуплексную область длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2 и между нуклеотидами в положениях 2 и 3, где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т. е. в положениях 2-9 от 5'-конца антисмысловой цепи), и где дцРНК

необязательно дополнительно имеет, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или все восемь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) антисмысловая цепь содержит 1, 2, 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (iii) смысловая цепь конъюгирована с лигандом; (iv) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (v) смысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (vi) дцРНК содержит, по меньшей мере, четыре 2'-фтор-модификации; (vii) дцРНК содержит дуплексную область длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (viii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2 и между нуклеотидами в положениях 2 и 3, антисмысловая цепь содержит фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидами в положениях 1 и 2, между нуклеотидами в положениях 2 и 3, между нуклеотидами в положениях 21 и 22 и между нуклеотидами в положениях 22 и 23, где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, одну термически дестабилизирующую модификацию дуплекса, расположенную в затравочной области антисмысловой цепи (т.е. в положениях 2-9 от 5'-конца антисмысловой цепи), и где дцРНК необязательно дополнительно имеет, по меньшей мере, одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть или все семь) из следующих характеристик: (i) антисмысловая цепь содержит 2, 3, 4, 5 или 6 2'-фтор-модификаций; (ii) смысловая нить конъюгирована с лигандом; (iii) смысловая цепь содержит 2, 3, 4 или 5 2'-фтор-модификаций; (iv) смысловая цепь содержит 3, 4 или 5 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей; (v) дцРНК содержит, по меньшей мере, четыре 2'-фтор-модификации; (vi) дцРНК содержит дуплексную область длиной 12-40 пар нуклеотидов; и (vii) дцРНК имеет тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит несовпадение(я) с мишенью в дуплексе или их комбинации. Несовпадение может находиться в области выступов или дуплексной области. Пару оснований можно классифицировать на основе ее способности способствовать диссоциации или плавлению (например, на основе свободной энергии ассоциации или диссоциации конкретного спаривания, то наиболее простой подход представляет собой такой, как исследовать пары на основе индивидуальных пар независимо от соседа, или также можно использовать аналогичный анализ). В отношении возможности способствовать диссоциации: A:U является предпочтительнее чем G:C; G:U является предпочтительнее чем G:C; и I:C является предпочтительнее чем G:C (I=инозин). Несовпадения, например, неканонические или отличные от канонического спаривания (как описано по тексту в других местах описания) являются предпочтительными по сравнению с каноническими спариваниями (A:T, A:U, G:C); и спаривания, которые содержат универсальное основание, являются предпочтительными по сравнению с каноническим спариванием.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК содержит, по меньшей

мере, одну из первых 1, 2, 3, 4 или 5 пар оснований в дуплексных областях от 5'-конца антисмысловой цепи, которые можно независимо выбрать из группы: A:U, G:U, I:C и несовпадающих пар, например, неканонических или отличных от канонических спариваний или спариваний, которые содержат универсальное основание, для обеспечения диссоциации антисмысловой цепи в 5'-конце дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении 1 в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой цепи выбран из группы, состоящей из A, dA, dU, U и dT. Альтернативно, по меньшей мере, одна из первых 1, 2 или 3 пар оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой нити представляет собой пару оснований AU. Например, первая пара оснований в дуплексной области от 5'-конца антисмысловой нити представляет собой пару оснований AU.

Было обнаружено, что введение 4'-модифицированного или 5'-модифицированного нуклеотида на 3'-конце фосфодиэфирной (PO), фосфоротиоатной (PS) или фосфородитиоатной (PS2) связи динуклеотида в любом положении одноцепочечного или двухцепочечного олигонуклеотида может оказывать стерическое воздействие на межнуклеотидную связь и, следовательно, защищать или стабилизировать ее от действия нуклеаз. В некоторых вариантах осуществления введение 4'-модифицированного или 5'-модифицированного нуклеотида на 3'-конце связи PO, PS или PS2 динуклеотида изменяет второй нуклеотид в паре динуклеотидов. В других вариантах осуществления введение 4'-модифицированного или 5'-модифицированного нуклеотида на 3'-конце связи PO, PS или PS2 динуклеотида изменяет нуклеотид на 3'-конце пары динуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления 5'-модифицированный нуклеотид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Например, 5'-алкилированный нуклеотид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Алкильная группа в 5'-положении сахара рибозы может быть рацемическим или хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 5'-алкилированным нуклеотидом является 5'-метилнуклеотид. 5'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления 4'-модифицированный нуклеотид вводят на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Например, 4'-алкилированный нуклеотид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. Алкильная группа в 4'-положении сахара рибозы может представлять собой рацемический или хирально чистый R- или S-изомер. Типичным 4'-алкилированным нуклеотидом является 4'-метилнуклеотид. 4'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером. Альтернативно, 4'-О-алкилированный нуклеотид может быть введен на 3'-конце динуклеотида в любом положении одноцепочечной или двухцепочечной миРНК. 4'-О-алкил сахара рибозы может быть рацемическим или хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 4'-О-алкилированным нуклеотидом является 4'-О-метилнуклеотид. 4'-О-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления 5'-алкилированный нуклеотид вводят в любое положение смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или повышает эффективность дцРНК. 5'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 5'-алкилированным нуклеотидом является 5'-метилнуклеотид. 5'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления 4'-алкилированный нуклеотид вводят в любое положение смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или повышает эффективность дцРНК. 4'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 4'-алкилированным нуклеотидом является 4'-метилнуклеотид. 4'-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления 4'-О-алкилированный нуклеотид вводят в любое положение смысловой или антисмысловой цепи дцРНК, и такая модификация сохраняет или повышает эффективность дцРНК. 5'-алкил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером. Типичным 4'-О-алкилированным нуклеотидом является 4'-О-метилнуклеотид. 4'-О-метил может быть либо рацемическим, либо хирально чистым R- или S-изомером.

В некоторых вариантах осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению может содержать связи 2'-5' (с 2'-H, 2'-ОН и 2'-ОМе и с P=O или P=S). Например, модификации 2'-5'-связей можно использовать для повышения устойчивости к нуклеазам или для ингибирования связывания смысловой цепи с антисмысловой цепью, или их можно использовать на 5'-конце смысловой цепи, чтобы избежать активации смысловой цепи под действием RISC.

В еще одном варианте осуществления молекула дцРНК по настоящему изобретению может содержать L-сахара (например, L-рибозу, L-арабинозу с 2'-H, 2'-ОН и 2'-ОМе). Например, эти модификации L-сахаров можно использовать для повышения устойчивости к нуклеазам или для ингибирования связывания смысловой цепи с антисмысловой цепью, или их можно использовать на 5'-конце смысловой цепи, чтобы избежать активации смысловой цепи под действием RISC.

В различных патентных публикациях описываются мультимерные миРНК, которые также можно использовать с дцРНК по настоящему изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, US 7858769, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, которые в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

Как более подробно описано ниже, РНКи-агент, который содержит конъюгации одной или более углеводных групп с РНКи-агентом, может улучшить одно или несколько свойств РНКи-агента. Во многих случаях углеводная группа будет присоединена к модифицированной субъединице РНКи-агента. Например, сахар рибозу одной или более рибонуклеотидных субъединиц дцРНК-агента можно заместить другими группами,

например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому прикреплен углеводный лиганд. Рибонуклеотидная субъединица, в которой сахар рибоза субъединицы замещен таким образом, относится в настоящем описании к субъединице модификации замены рибозы (RRMS). Циклический носитель может представлять собой карбоциклическую систему, т.е. все атомы кольца представляют собой атомы углерода, или гетероциклическую систему, т.е. один или более атомов кольца могут представлять собой гетероатом, например, азот, кислород, серу. Циклический носитель может представлять собой моноциклическую систему или может содержать два или более колец, например, конденсированных колец. Циклический носитель может представлять собой полностью насыщенную циклическую систему, или он может содержать одну или более двойных связей.

Лиганд может быть связан с полинуклеотидом через носитель. Носители содержат (i) по меньшей мере, одну «точку присоединения в остове», например, две «точки присоединения в остове» и (ii) по меньшей мере, одну «связывающую точку присоединения». В рамках настоящего изобретения, «точка присоединения в остове» относится к функциональной группе, например, гидроксильной группе, или, как правило, доступной связи, и которая является подходящей для введения носителя в остов, например, фосфат или модифицированный фосфат, например, серусодержащий остов рибонуклеиновой кислоты. «Связывающая точка присоединения» (ТАР) в некоторых вариантах осуществления относится к входящему в состав кольца атому циклического носителя, например, атому углерода или гетероатому (отличному от атома, который представляет собой точку присоединения в остове), которая соединяет выбранную группу. Группа может представлять собой, например, углевод, например, моносахарид, дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид и полисахарид. Необязательно выбранная группа соединена посредством промежуточной связи с циклическим носителем. Таким образом, циклический носитель часто содержит функциональную группу, например, аминогруппу или, как правило, обеспечивает связь, которая является подходящей для введения или связывания другой химической структуры, например, лиганда с компонентом кольца.

РНКи-агенты можно конъюгировать с лигандом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу. Циклическая группа может быть выбрана из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксолана, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинил, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофурила и декалина. Ациклическая группа может быть выбрана из остова серинола или остова диэтаноламина.

В некоторых конкретных вариантах осуществления РНКи-агент для применения в способах по настоящему изобретению представляет собой агент, выбранный из группы агентов, приведенных в любой из таблиц 3-9. Эти агенты могут дополнительно содержать лиганд.

IV. иРНК, конъюгированные с лигандами

Другая модификация РНК в иРНК по изобретению включает химическое связывание иРНК с одним или более лигандами, группами или конъюгатами, которые усиливают активность, клеточное распределение или захват иРНК, например, клеткой. Такие группы включают, без ограничения, липидные группы, такие как группа холестерина (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, дигексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651-3654; Shea с соавторами, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777-3783), полиамин или цепь полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides and Nucleotides*, 1995, 14: 969-973) или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651-3654), группу пальмитила (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229-237) или группу октадециламина или группу гексиламинокарбонилноксихолестерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277: 923-937).

В некоторых вариантах осуществления лиганд изменяет распределение, нацеливание или период полураспада иРНК-агента, в который он включен. В некоторых вариантах лиганд обеспечивает повышенную аффинность по отношению к выбранной мишени, например, молекуле, клетке или типу клеток, компартменту, например, клеточному или органному компартменту, ткани, органу или области тела, например, по сравнению с видами, в которых такой лиганд отсутствует. Типичные лиганды не будут принимать участия в спаривании дуплекса в образующей дуплекс нуклеиновой кислоте.

Лиганды могут включать встречающиеся в природе вещество, такое как белок (например, сывороточный альбумин человека (HSA), липопротеид низкой плотности (LDL) или глобулин); углевод (например, декстран, пуллулан, хитин, хитозан, инулин, циклодекстрин или гиалуроновая кислота); или липид. Лиганд также может представлять собой рекомбинантную или синтетическую молекулу, такую как синтетический полимер, например, синтетическая полиаминокислота. Примеры полиаминокислот включают полиаминокислоту полилизин (PLL), поли-L-аспарагиновую кислоту, поли-L-глутаминовую кислоту, сополимер стирола-ангидрида малеиновой кислоты, сополимер поли(L-лактид-глицерид), сополимер дивиниловый эфир-малеиновый ангидрид, сополимер N-(2- гидроксипропил)метакриламид (НМРА), полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт (PVA), полиуретан, поли(2-этилакриловую кислоту), полимеры N-изопропилакриламида или полифосфазин. Примеры полиаминов включают: полиэтиленимин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, полиаминовый псевдопептид, полиаминовый пептидомиметик, дендримерный полиамин, аргинин,

амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирин, четвертичную соль полиамина или α -спиральный пептид.

Лиганды также могут включать нацеливающие группы, например агент, направленный на клетку или ткань, например, лектин, гликопротеин, липид или белок, например, антитело, которое связывается с определенным типом клеток, таким как клетка почки. Нацеливающая группа может представлять собой тиротропин, меланотропин, лектин, гликопротеин, поверхностно-активный белок А, углевод муцин, поливалентную лактозу, поливалентную галактозу, N-ацетилгалактозамин, поливалентную N-ацетилглюкозамин маннозу, поливалентную фукозу, гликозилированные полиаминокислоты, поливалентную галактозу, трансферрин, бисфосфонат, полиглутамат, полиаспартат, липид, холестерин, стероид, желчную кислоту, фолат, витамин B12, биотин или пептид RGD или миметик пептида RGD. В некоторых вариантах осуществления лиганд представляет собой поливалентную галактозу, например, N-ацетилгалактозамин.

Другие примеры лигандов включают красители, интеркаляторы (например акридины), поперечные линкеры (например, псорален, митомицин С), порфирины (TPPC4, тексафирин, сапфирин), полициклические ароматические углеводороды (например, феназин, дигидрофеназин), искусственные эндонуклеазы (например EDTA), липофильные молекулы, например, холестерин, холевую кислоту, адамантануксусную кислоту, 1-пиренмасляную кислоту, дигидротестостерон, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерин, жеранилосигексильную группу, гексадецилглицерин, борнеол, ментол, 1,3-пропандиол, гептадецильную группу, пальмитиновую кислоту, миристиновую кислоту, О3-(олеоил)литохолевую кислоту, О3-(олеоил)холеновую кислоту, диметокситритил или феноксазин) и конъюгаты пептидов (например, пептида antennapedia, пептида Tat), алкилирующие агенты, фосфат, амино-, меркапто-, ПЭГ (например, ПЭГ-40К), MPEG, [MPEG]2, полиамино-, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, облегчающие транспорт/всасывание (например, аспирин, витамин Е, фолиевую кислоту), синтетические рибонуклеазы (например, имидазол, бисимидазол, гистамин, кластеры имидазола, конъюгаты акридина-имидазола, комплексы Eu(3+) тетраазамакроциклов), динитрофенил, HRP или AP.

Лиганды могут представлять собой белки, например, гликопротеиды, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфичной аффинностью по отношению к колиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с конкретным типом клеток, таким как раковая клетка, эндотелиальная клетка или костная клетка. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Лиганды также могут включать непептидные формы, такие как липиды, лектины, углеводы, витамины, кофакторы, поливалентная лактоза, поливалентная галактоза, N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, поливалентная манноза или поливалентная фукоза. Лигандом может быть, например, липополисахарид, активатор MAP-киназы p38 или активатор NF- κ B.

Лигандом может быть вещество, например, лекарственное средство, которое может увеличивать захват иРНК-агента в клетку, например, за счет разрушения клеточного

цитоскелета, например, за счет разрушения клеточных микротрубочек, микрофиламентов и/или промежуточных филаментов. Лекарственным средством может быть, например, таксол, винкристин, винбластин, цитохалазин, нокодазол, джаплакинолид, латрункулин А, фаллоидин, свинхолид А, инданоцин или миосервин.

В некоторых вариантах лиганд, связанный с иРНК, которая здесь описана, функционирует в качестве фармакокинетического модулятора (РК-модулятора). РК-модуляторы включают липофильные вещества, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие агенты, ПЭГ, витамины и т.д. Примеры РК-модуляторов включают, без ограничения, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохолевую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин Е, биотин и т.д.. Также известно, что олигонуклеотиды, которые содержат множество фосфоротиоатных связей, связываются с сывороточным белком, таким образом, короткие олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды длиной примерно 5 оснований, 10 оснований, 15 оснований или 20 оснований, содержащие множество фосфоротиоатных связей в остове, также приемлемы для настоящего изобретения в качестве лигандов (например, в качестве ФК-модулирующих лигандов). Кроме того, аптамеры, которые связывают компоненты сыворотки (например, сывороточные белки) также подходят для применения в качестве РК-модулирующих лигандов в вариантах осуществления, описанных здесь.

Конъюгированные с лигандом иРНК по изобретению можно синтезировать с использованием олигонуклеотида, который несет боковую реакционноспособную функциональную группу, такую как функциональная группа, полученная в результате связывания линкерной молекулы с олигонуклеотидом (описанным ниже). Такой реакционноспособный олигонуклеотид может непосредственно взаимодействовать с коммерчески доступными лигандами, лигандами, которые синтезируют, несущими любую из множества защитных групп, или лигандами, которые имеют связанный с ними линкерную группу.

Олигонуклеотиды, используемые в конъюгатах по настоящему изобретению, могут быть получены удобным и обычным образом с применением хорошо известных способов твердофазного синтеза. Оборудование для такого синтеза продается несколькими поставщиками, включая, например, Applied Biosystems® (Foster City, Calif.). Дополнительно или альтернативно можно применять любые другие способы такого синтеза, известные в данной области. Также известно применение сходных способов для получения других олигонуклеотидов, таких как фосфоротиоаты и алкилированные производные.

В случае конъюгированных с лигандами олигонуклеотидов и несущих молекулу лиганда связанных в специфичную последовательность нуклеозидов согласно настоящему изобретению, олигонуклеотиды и олигонуклеозиды могут быть собраны на подходящем ДНК-синтезаторе с использованием стандартных предшественников нуклеотидов или нуклеозидов или предшественников конъюгатов нуклеотидов или нуклеозидов, которые уже несут связывающий остаток, предшественников лиганд-нуклеотидов или

нуклеозидных конъюгатов, которые уже несут молекулу лиганда, или строительных блоков, несущих ненуклеозидные лиганды.

В случае использования предшественников нуклеотидных конъюгатов, которые уже несут линкерную группу, обычно проводят синтез связанных в специфичную последовательность нуклеозидов и затем молекулу лиганда подвергают взаимодействию с линкерной группой с образованием конъюгированного с лигандом олигонуклеотида. В некоторых вариантах олигонуклеотиды или связанные нуклеозиды по настоящему изобретению синтезируют с помощью автоматического синтезатора, используя фосфорамидиты, полученные из конъюгатов лиганд-нуклеозид, в дополнение к стандартным фосфорамидитам и нестандартным фосфорамидитам, которые коммерчески доступны и которые обычно используют для синтеза олигонуклеотидов.

А. Конъюгаты с липидами

В некоторых вариантах осуществления лиганд является липидом или основанной на липиде молекулой. Такой липид или основанная на липиде молекула обычно может связываться с сывороточным белком, таким как сывороточный альбумин человека (HSA). Лиганд, связывающий HSA, обеспечивает возможность распределения конъюгата в ткани-мишене, например, непочечной ткани-мишене в организме. Например, тканью-мишенью может быть печень, включая паренхиматозные клетки печени. В качестве лигандов также можно использовать другие молекулы, которые могут связываться с HSA. Например, можно использовать непростин или аспирин. Липид или лиганд на основе липида могут (а) повысить устойчивость конъюгата к разложению, (b) улучшить направление к мишени или транспорт в клетку-мишень или клеточную мембрану, и/или (с) можно использовать для регуляции связывания с белком сыворотки, например, HSA.

Лиганд на основе липидов можно использовать для того, чтобы модулировать, например, контролировать (например, ингибировать) связывание конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или лиганд на основе липидов, который связывает с HSA более прочно, будет с меньшей вероятностью целенаправленно поступать в почки и, следовательно, с меньшей вероятностью будет выводиться из организма. Липид или лиганд на основе липидов, который связывается с HSA менее прочно, можно использовать для того, чтобы целенаправленно направить конъюгат в почки.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, основанный на липиде, связывается с HSA. Например, лиганд может связывать HSA с аффинностью, достаточной для того, чтобы усилить распределение конъюгата в непочечную ткань. Однако обычно аффинность не настолько высокая, чтобы связывание HSA с лигандом не могло быть обратимым.

В некоторых вариантах осуществления лиганд, основанный на липиде, связывает HSA слабо или совсем не связывает, так что распределение конъюгата в почки усиливается. Другие остатки, которые нацеливают в почечные клетки, также можно использовать вместо или дополнительно к лиганду, основанному на липиде.

В еще одном аспекте лиганд представляет собой молекулу, например, витамин, которая захватывается клеткой-мишенью, например, пролиферирующей клеткой. Такие

лиганды особенно применимы для лечения расстройств, характеризующихся нежелательной клеточной пролиферацией, например, злокачественного или доброкачественного типа, например раковых клеток. Примеры витаминов включают витамин А, Е и К. Другие примеры витаминов включают витамин В, например фолиевую кислоту, В12, рибофлавин, биотин, пиридоксаль или другие витамины или питательные вещества, которые захватываются раковыми клетками. Также включаются HSA и липопротеид низкой плотности (LDL).

В. Агенты для проникновения в клетки

В другом аспекте лиганд представляет собой агент для проникновения в клетку, предпочтительно спиральный агент для проникновения в клетку. В одном варианте агент является амфипатическим. Примером агента является пептид, такой как tat или antennapedia. Если средство представляет собой пептид, то оно может быть модифицировано, включая пептидилмиметики, инвертомеры, непептидные или псевдопептидные связи и применение D-аминокислот. Спиральный агент предпочтительно представляет собой средство в форме α -спирали и оно может иметь липофильную и липофобную фазу.

Лигандом может быть пептид или пептидомиметик. Пептидомиметик (также называемый в настоящем описании олигопептидомиметиком) представляет собой молекулу, способную укладываться в определенную трехмерную структуру, сходную со структурой природного пептида. Связывание пептида пептидомиметиков с иРНК-агентами может оказывать влияние на фармакокинетическое распределение иРНК, например, за счет усиления клеточного распознавания и всасывания. Остаток пептида или пептидомиметика может иметь длину примерно 5-50 аминокислот, например, длиной примерно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 аминокислот.

Пептидом или пептидомиметиком может быть, например, пептид для проникновения в клетку, катионный пептид, амфипатический пептид или гидрофобный пептид (например, состоящий, главным образом, из Tyr, Trp или Phe). Пептидная группа может представлять собой дендримерный пептид, конформационно ограниченный пептид или поперечно сшитый пептид. В другом альтернативном варианте пептидная группа может содержать гидрофобную последовательность транслокации через мембрану (MTS). Примером пептида, содержащего гидрофобную MTS, является RFGF, имеющий аминокислотную последовательность AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 9). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 10)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающей группой к мишени. Пептидная группа может представлять собой пептид «для доставки», который может нести крупные полярные молекулы, включая пептиды, олигонуклеотиды и белок, через клеточные мембраны. Например, было обнаружено, что последовательности из белка Tat ВИЧ (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 353)) и белка Drosophila antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 354)) способны функционировать в качестве пептидов для доставки. Пептид или пептидомиметик могут кодироваться произвольной

последовательностью ДНК, например, как пептид, идентифицированный из библиотеки в фаговом дисплее или комбинаторной библиотеки «один шарик-одно соединение» (ОВОС) (Lam et al., *Nature*, 354: 82-84, 1991). Обычно пептид или пептидомиметик, связанный с ДНК-агентом через включенную мономерную единицу, является направляющим в клетку-мишень пептидом, таким как пептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (RGD) или миметик RGD. Пептидная группа может иметь длину в диапазоне примерно от 5 аминокислот до примерно 40 аминокислот. Пептидные остатки могут иметь структурную модификацию, в частности для повышения стабильности или прямых конформационных свойств. Можно использовать любую из структурных модификаций, описанных ниже.

Пептид RGD для применения в композициях и способах по изобретению может быть линейным или циклическим и может быть модифицированным, например, гликозилированным или метилированным, чтобы облегчить нацеливание на конкретную ткань (ткани). RGD-содержащие пептиды и пептидомиметики могут содержать D-аминокислоты, а также синтетические миметики RGD. В дополнении к RGD можно использовать другие остатки, мишенью которых является лиганд интегрин. Предпочтительные конъюгаты такого лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

Пептидную группу RGD можно использовать для целенаправленного действия на конкретный тип клеток, например, опухолевую клетку, такую как эндотелиальная опухолевая клетка или клетка злокачественной опухоли молочной железы (Zitzmann et al., *Cancer Res.*, 62: 5139-43, 2002). Пептид RGD может способствовать целенаправленному действию ДНК-агента на опухоли множества других тканей, включая легкие, почки, селезенку или печень (Aoki et al., *Cancer Gene Therapy* 8: 783-787, 2001). Обычно пептид RGD может способствовать целенаправленному действию ДНК-агента на почки. Пептид RGD может быть линейным или циклическим, и может быть модифицирован, например, гликозилирован или метилирован для облегчения целенаправленного действия на конкретные ткани. Например, гликозилированный пептид RGD может доставлять ДНК-агент к опухолевой клетке, экспрессирующей $\alpha\beta 3$ (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42: 326-336, 2001).

«Пептид для проникновения в клетку» способен обеспечивать проницаемость клетки, например, клетки микроорганизма, такой как бактериальная клетка или клетка гриба, или клетки млекопитающего, такой как клетка человека. Пептид для проникновения в клетки микроорганизмов может представлять собой, например, α -спиральный линейный пептид (например, LL-37 или церопорин PI), пептид, содержащий дисульфидную связь (например, α -дефензин, β -дефензин или бактенецин), или пептид, содержащий только одну или две преобладающие аминокислоты (например, PR-39 или индолицидин). Пептид для проникновения в клетку также может содержать сигнал ядерной локализации (NLS). Например, пептид для проникновения в клетку может представлять собой амфипатический пептид, состоящий из двух частей, такой как MPG, который получен из слитого пептидного домена gp41 ВИЧ-1 и NLS большого Т-антигена SV40 (Simeoni et al., *Nucl. Acids Res.* 31: 2717-2724, 2003).

С. Конъюгаты с углеводами

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов согласно изобретению олигонуклеотид иРНК дополнительно содержит углеводов. Конъюгированные с углеводами иРНК являются предпочтительными для доставки *in vivo* нуклеиновых кислот, а также композиций, подходящих для терапевтического применения *in vivo*, которые описаны здесь. В рамках настоящего изобретения, «углевод» относится к соединению, которое является либо углеводом как таковым, состоящим из одной или нескольких моносахаридных единиц, имеющих, по меньшей мере, 6 атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим), при этом с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы; либо соединением, имеющим в качестве его части остаток углевода, состоящий из одной или нескольких моносахаридных единиц, каждая из которых имеет, по меньшей мере, шесть атомов углерода (который может быть линейным, разветвленным или циклическим), при этом с каждым атомом углерода связан атом кислорода, азота или серы. Соответствующие углеводы включают сахара (моно-, ди-, три- и олигосахариды, содержащие примерно 4, 5, 6, 7, 8 или 9 моносахаридных единиц), и полисахариды, такие как крахмалы, гликоген, целлюлоза и полисахаридные камеди. Конкретные моносахариды включают C5-сахара и выше (например, C5, C6, C7 или C8); ди- и трисахариды включают сахара, имеющие две или три моносахаридных единицы (например, C5, C6, C7 или C8).

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат содержит моносахарид. В одном варианте моносахаридом является N-ацетилгалактозамин (GalNAc). GalNAc-конъюгаты описаны, например, в патенте США № 8106022, полное содержание которого включено здесь посредством ссылки. В некоторых вариантах GalNAc-конъюгат служит в качестве лиганда, который направляет иРНК к конкретным клеткам. В некоторых вариантах GalNAc-конъюгат направляет иРНК в клетки печени, например, за счет того, что он служит в качестве лиганда рецептора асиалогликопротеида клеток печени (например, гепатоцитов).

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат содержит одно или более производных GalNAc. Производные GalNAc могут быть присоединены через линкер, например, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc-конъюгат конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления GalNAc-конъюгат конъюгирован с иРНК-агентом (например, с 3'-концом смысловой цепи) через линкер, например, линкер, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления GalNAc-конъюгат конъюгирован с 5'-концом смысловой цепи. В некоторых вариантах осуществления GalNAc-конъюгат конъюгирован с иРНК-агентом (например, с 5'-концом смысловой цепи) через линкер, например, линкер, как здесь описано.

В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к РНКи-агенту по изобретению через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к

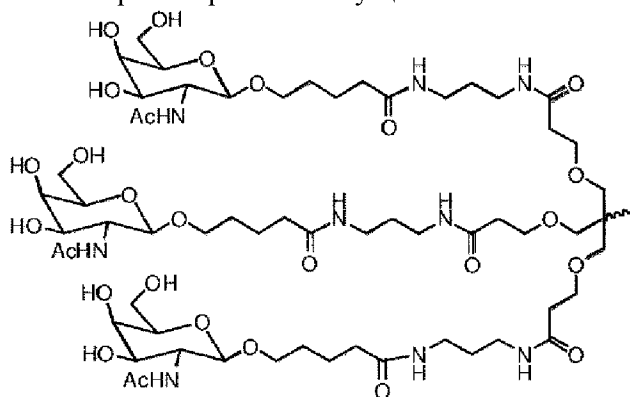
иРНК-агенту по изобретению через двухвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к РНК-агенту по изобретению через трехвалентный линкер. В еще одних вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК-агенту по изобретению через четырехвалентный линкер.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечной РНК-агент по изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенное к РНК-агенту. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные РНК-агенты по изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного РНК-агента через множество моновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи иРНК-агента по изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих петлю-шпильку, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, где каждый неспаренный нуклеотид в петле-шпильке может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное через моновалентный линкер. Петля-шпилька также может быть образована удлинением выступом в одной цепи дуплекса.

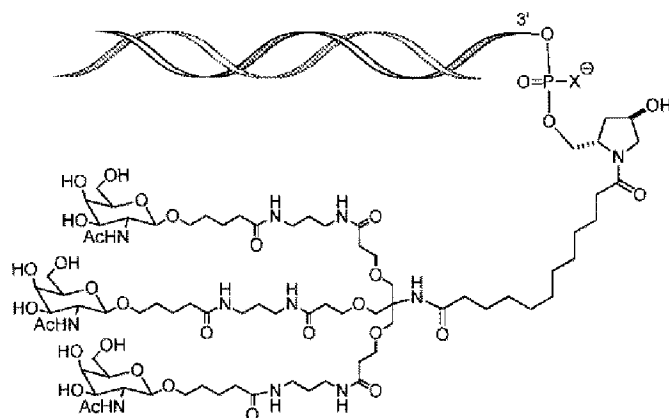
В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи РНК-агента по изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих петлю-шпильку, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, где каждый неспаренный нуклеотид в петле-шпильке может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное через моновалентный линкер. Петля-шпилька также может быть образована удлинением выступом в одной цепи дуплекса.

В некоторых вариантах осуществления GalNAc-конъюгат представляет собой:

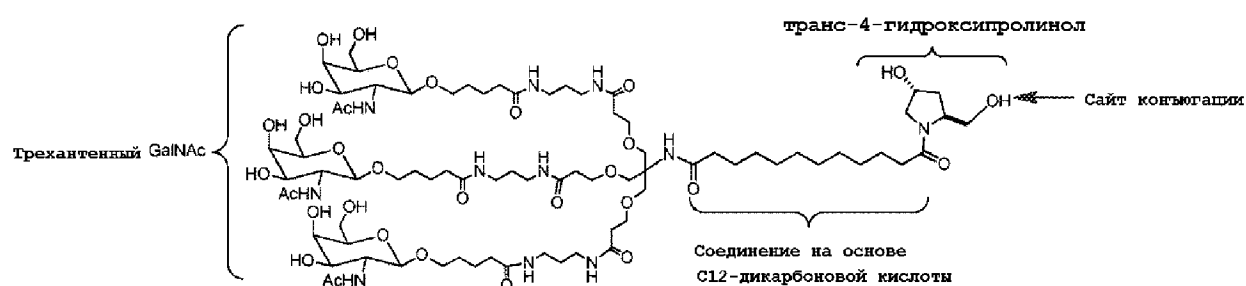


II.

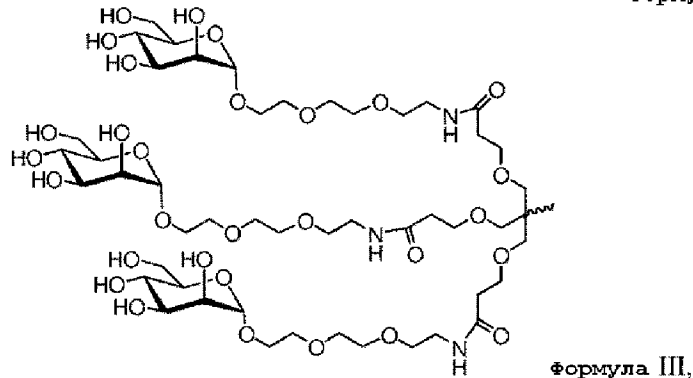
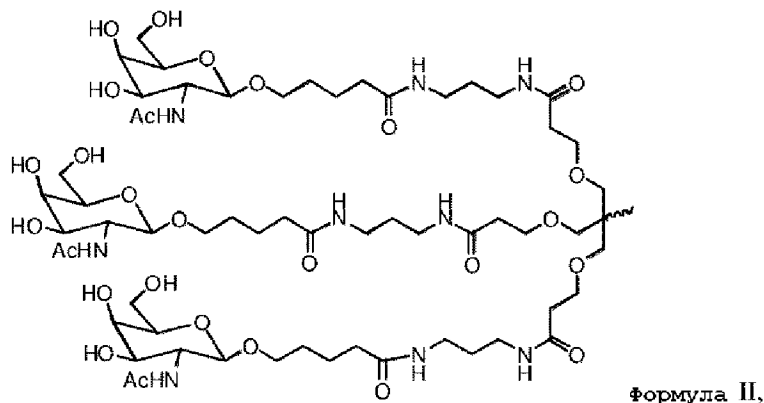
В некоторых вариантах осуществления РНК-агент присоединен к углеводному конъюгату через линкер, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S.

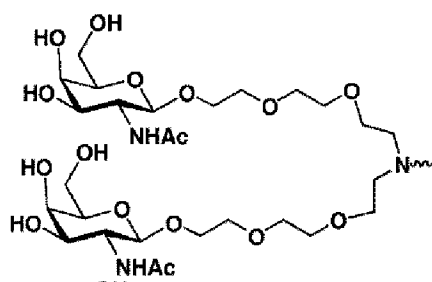


В некоторых вариантах осуществления РНК-агент конъюгирован с L96, как определено в таблице 2 и показано ниже:

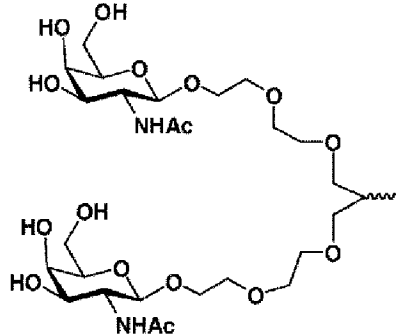


В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по изобретению выбран из группы, состоящей из:

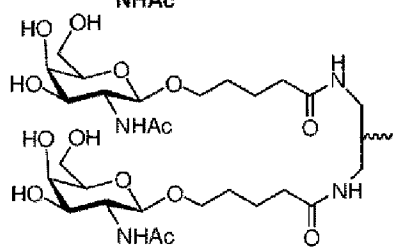




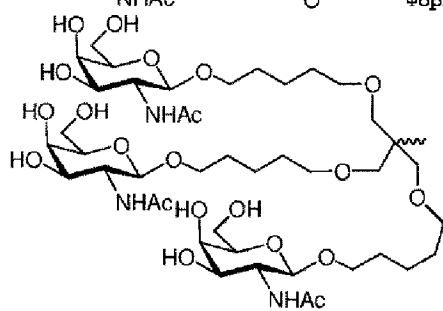
Формула IV,



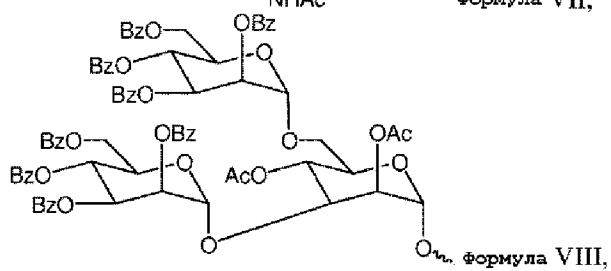
Формула V,



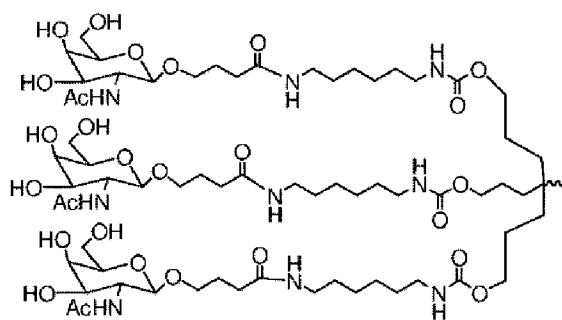
Формула VI,



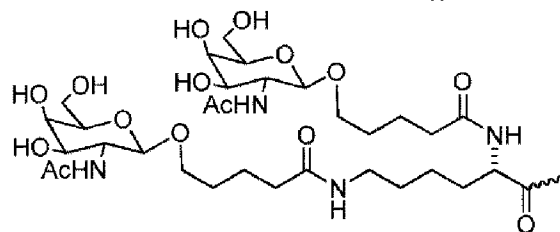
Формула VII,



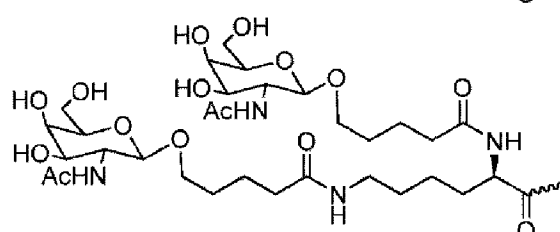
Формула VIII,



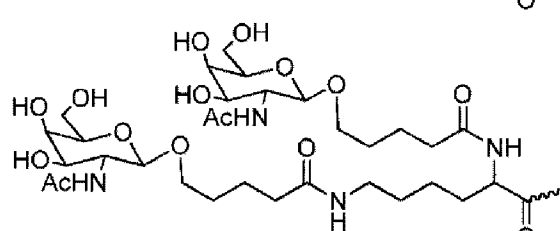
формула XIII,



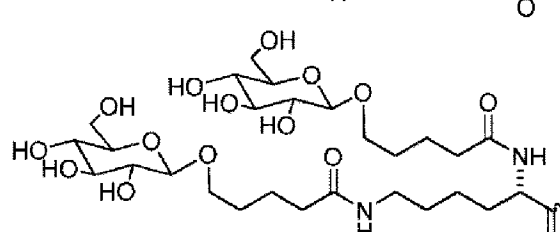
формула XIV,



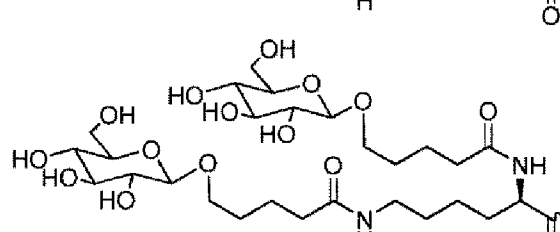
формула XV,



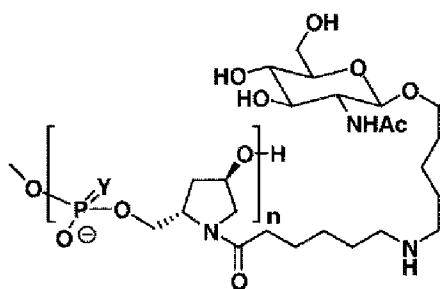
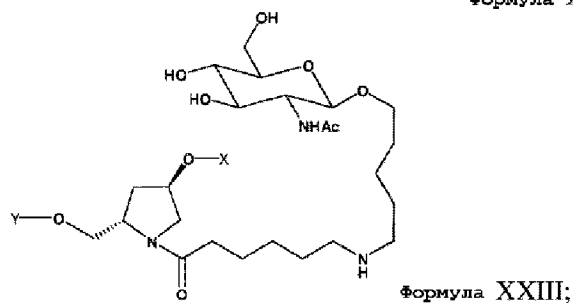
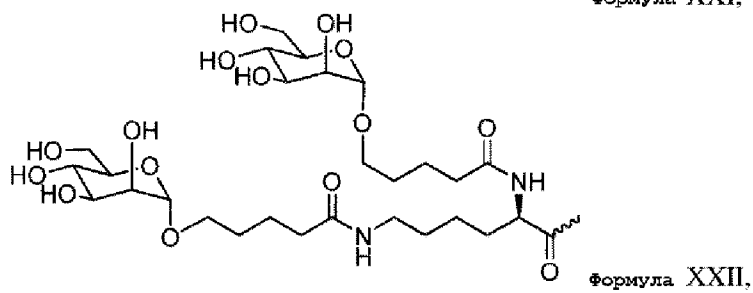
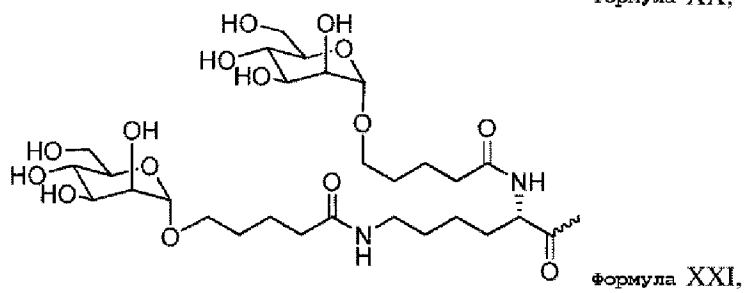
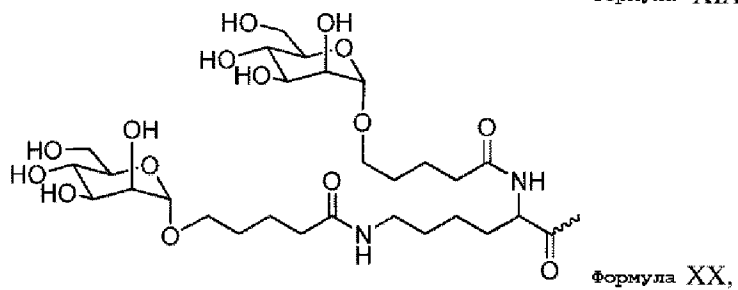
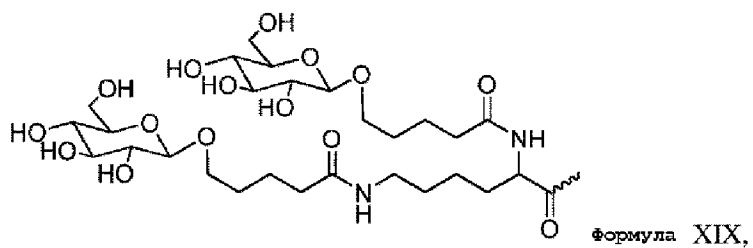
формула XVI,



формула XVII,

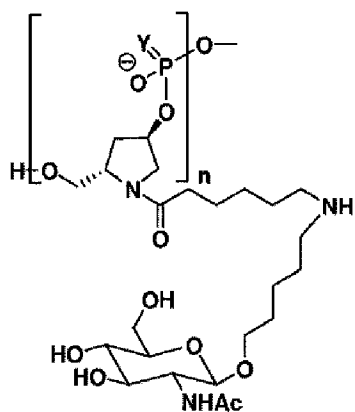


формула XVIII,

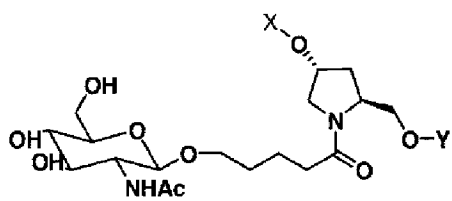


где Y представляет собой O или S, и n равен 3-6

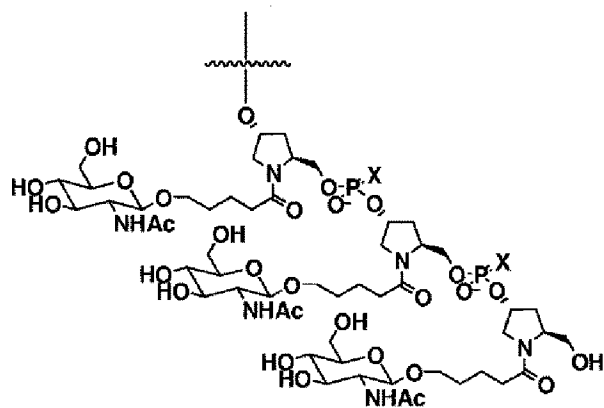
(формула XXIV);



где Y представляет собой O или S, и n равен 3-6 (формула XXV);

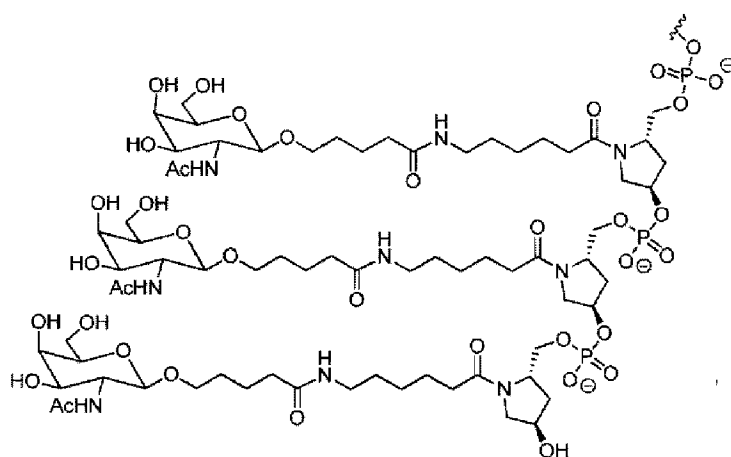


формула XXVI;

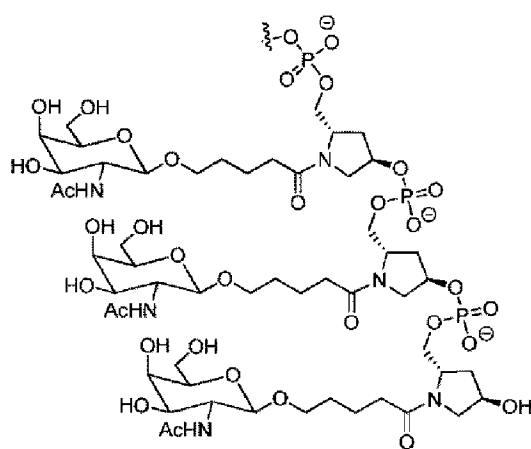


, где X представляет собой O или S (формула XXVII);

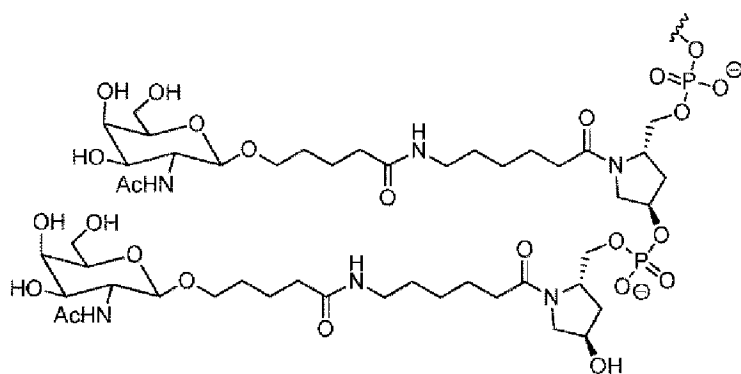
формула XXVII; формула XXIX;



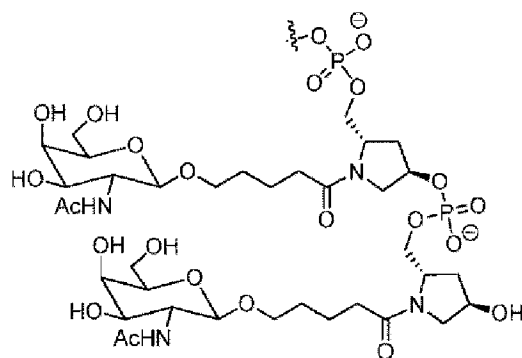
Формула XXVII;



Формула XXIX;

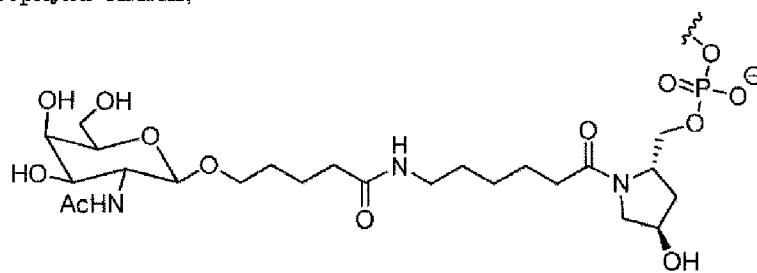


Формула XXX;

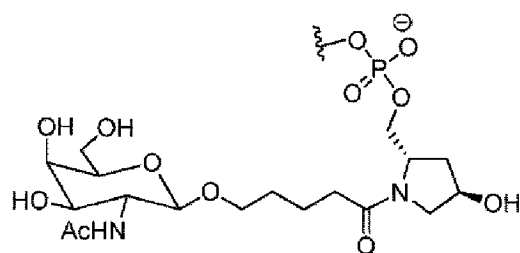


Формула XXXI;

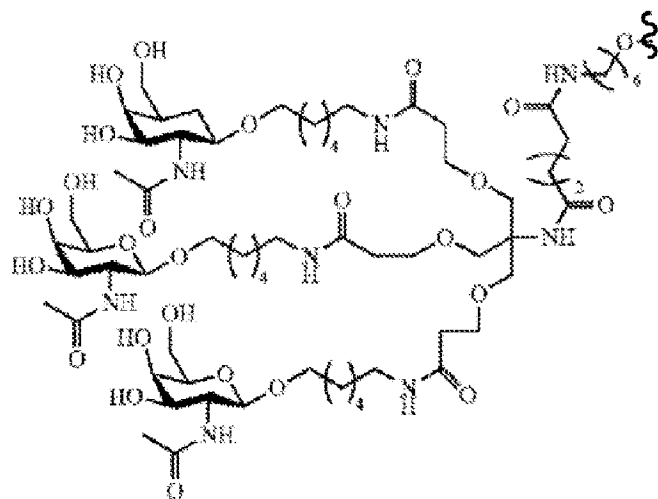
Формула XXXII;



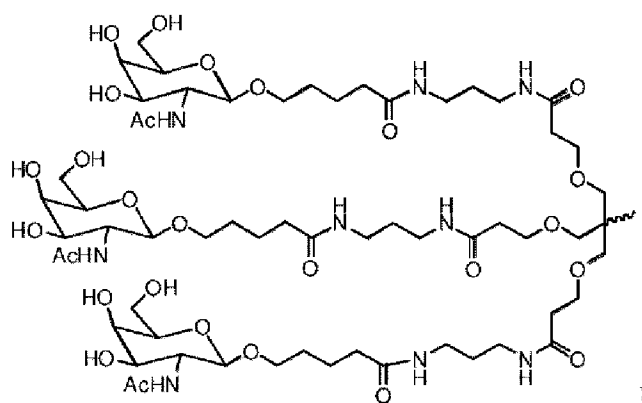
и



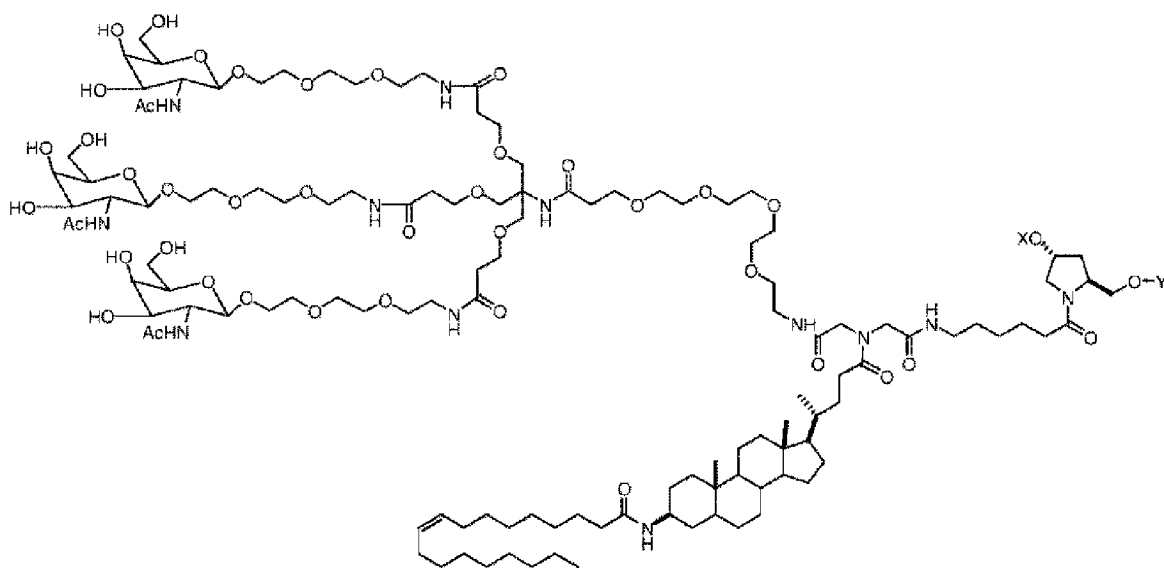
Формула XXXIII.



В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат для применения в композициях и способах по изобретению представляет собой моносахарид. В некоторых вариантах осуществления моносахарид представляет собой N-ацетилгалактозамин, такой как:



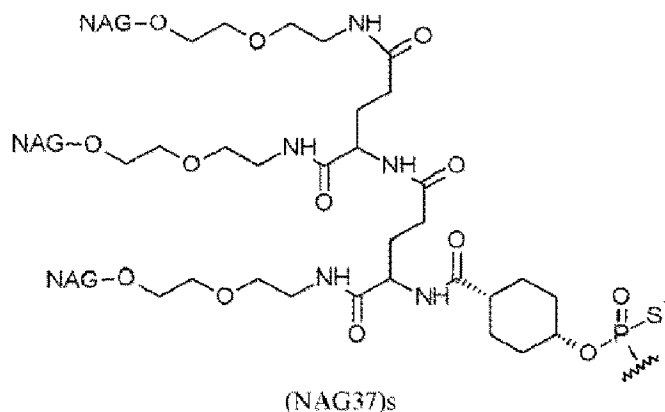
Другой репрезентативный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных здесь, включает, не ограничиваясь этим,



(Формула XXXVI),

когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой атом водорода.

В некоторых вариантах осуществления подходящий лиганд представляет собой лиганд, раскрытый в WO 2019/055633, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки. В одном варианте осуществления лиганд имеет следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления РНК-агенты по настоящему изобретению могут включать лиганды GalNAc, даже если такие лиганды GalNAc, как предполагается, в настоящее время имеют ограниченное значение для предпочтительного пути (путей) интратекальной/ЦНС доставки по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к РНК-агенту по изобретению через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к РНК-агенту по изобретению через двухвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к РНК-агенту по изобретению через трехвалентный линкер.

В одном варианте осуществления двухцепочечные РНК-агенты по изобретению содержат один или более GalNAc или производных GalNAc, присоединенных к РНК-агенту. GalNAc может быть присоединен к любому нуклеотиду через линкер на смысловой цепи или антисмысловой цепи. GalNAc может быть присоединен к 5'-концу смысловой цепи, 3'-концу смысловой цепи, 5'-концу антисмысловой цепи или 3'-концу антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления GalNAc присоединен к 3'-концу смысловой цепи, например, через трехвалентный линкер.

В других вариантах осуществления двухцепочечные РНК-агенты по изобретению содержат множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов двухцепочечного РНК-агента через множество линкеров, например, моновалентных линкеров.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи РНК-агента по изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой

цепи, образующих петлю-шпильку, содержащую множество неспаренных нуклеотидов, где каждый неспаренный нуклеотид в петле-шпильке может независимо содержать GalNAc или производное GalNAc, присоединенное через моновалентный линкер.

В некоторых вариантах осуществления углеводный конъюгат дополнительно содержит один или более дополнительных лигандов, как описано выше, таких как, не ограничиваясь этим, модулятор РК или проникающий в клетку пептид.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают описанные в WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

D. Линкеры

В некоторых вариантах осуществления конъюгат или лиганд, описанные здесь, может быть присоединен к олигонуклеотиду иРНК с использованием различных линкеров, которые могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми.

Термин «линкер» или «линкерная группа» означает органическую группу, которая соединяет две части соединения, например, ковалентно связывает 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 цепь из атомов, такую как без ограничения замещенный или незамещенный алкил, замещенный или незамещенный алкенил, замещенный или незамещенный алкинил, арилалкил, арилалкенил, арилалкинил, гетероарилалкил, гетероарилалкенил, гетероарилалкинил, гетероциклилалкил, гетероциклилалкенил, гетероциклилалкинил, арил, гетероарил, гетероциклил, циклоалкил, циклоалкенил, алкиларилалкил, алкиларилалкенил, алкиларилалкинил, алкениларилалкил, алкениларилалкенил, алкениларилалкинил, алкиниларилалкил, алкиниларилалкенил, алкиниларилалкинил, алкилгетероарилалкил, алкилгетероарилалкенил, алкилгетероарилалкинил, алкенилгетероарилалкил, алкенилгетероарилалкенил, алкенилгетероарилалкинил, алкинилгетероарилалкил, алкинилгетероарилалкенил, алкинилгетероарилалкинил, алкилгетероциклилалкил, алкилгетероциклилалкенил, алкилгетероциклилалкинил, алкенилгетероциклилалкил, алкенилгетероциклилалкенил, алкенилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где один или несколько метиленов могут прерываться или иметь на конце 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 атом водорода, ацил, алифатическую или замещенную алифатическую группу. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит примерно 1-24 атома, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 атомов, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 или 8-16 атомов.

Расщепляемая линкерная группа представляет собой группу, которая является достаточно стабильной вне клетки, но которая при попадании в клетку-мишень

расщепляется с высвобождением двух фрагментов, удерживаемых вместе линкером. В предпочтительном варианте осуществления расщепляемая линкерная группа расщепляется, по меньшей мере, примерно 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 примерно в 100 раз быстрее в клетке-мишени или при первом контрольном условии (которое например, может быть выбрано для имитации или представления внутриклеточных условий), чем в крови субъекта, или при втором контрольном условии (которое, например, может быть выбрано для имитации или представления условий, обнаруженных в крови или сыворотке).

Расщепляемые линкерные группы чувствительны к расщепляющим агентам, например, рН, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию вызывающих деградацию молекул. Обычно расщепляющие агенты преобладают или встречаются на более высоких уровнях или с более высокими активностями внутри клеток, чем в сыворотке или крови. Примеры таких агентов, вызывающих деградацию, включают: окислительно-восстановительные агенты, которые выбраны для конкретных субстратов или которые не обладают субстратной специфичностью, включая, например, окислительные или восстановительные ферменты или такие восстановители, как меркаптаны, которые присутствуют в клетках, которые могут вызывать деградацию расщепляемых в реакции окисления-восстановления линкерных групп в результате восстановления; эстеразы; эндосомы или средства, которые могут создавать кислую среду, например, средства, которые приводят к значению рН пять или ниже; ферменты, которые могут гидролизовать или приводить к деградации расщепляемой кислотами линкерной группы, действуя в качестве обычной кислоты, пептидазы (которые могут обладать субстратной специфичностью) и фосфатазы.

Расщепляемая линкерная группа, такая как дисульфидная связь, может быть чувствительной к рН. Значение рН сыворотки человека равно 7,4, тогда как среднее значение внутриклеточного рН немного ниже в диапазоне примерно от 7,1 до 7,3. Эндосомы имеют более кислое значение рН, в диапазоне 5,5-6,0, и лизосомы имеют еще более кислый рН около 5,0. Некоторые линкеры будут иметь расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется при предпочтительном значении рН, высвобождая при этом катионный липид из лиганда в клетку или в требуемый компартмент клетки.

Линкер может содержать расщепляемую линкерную группу, которая расщепляется конкретным ферментом. Тип расщепляемой линкерной группы, включенной в линкер, может зависеть от клетки, которая является мишенью. Например, направляющий в печень лиганд может быть связан с катионным липидом через линкер, который содержит сложноэфирную группу. Клетки печени богаты эстеразами, и поэтому линкер будет расщепляться более эффективно в клетках печени, чем в типах клеток, которые не богаты эстеразами. Другие типы клеток, богатых эстеразами, включают клетки легкого, коркового вещества почки и семенников.

Линкеры, которые содержат пептидные связи, можно использовать в том случае, когда типы клеток-мишеней богаты пептидазами, такие как клетки печени и синовиоциты.

В общем, чувствительность расщепляемых линкерных групп-кандидатов можно оценить, тестируя способность вызывающего деградацию агента (или условия) расщеплять выбранную для исследования линкерную группу. Также может требоваться тестирование выбранной для исследования линкерной группы в отношении способности быть резистентной к расщеплению в крови или в случае контакта с другой тканью, не являющейся тканью-мишенью. Таким образом, можно определить относительную чувствительность к расщеплению в случае первого и второго условия, где первое выбирают таким образом, чтобы оно указывало на расщепление в клетке-мишени, и второе выбирают так, чтобы оно указывало на расщепление в других тканях или биологических жидкостях, например, в крови или сыворотке. Тестирование можно провести в бесклеточных системах, в клетках, в культуре клеток, в культуре органа или ткани или в целом организме животного. Могут быть полезными начальные оценки в бесклеточных условиях или в условиях культуры и для подтверждения дальнейшей оценки в целом организме животного. В предпочтительных вариантах осуществления пригодные выбранные для исследования соединения расщепляются, по меньшей мере, примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных с целью имитации внутриклеточных условий) по сравнению с кровью или сывороткой (или в условиях *in vitro*, выбранных с целью имитации внеклеточных условий).

г. Расщепляемые при окислении-восстановлении линкерные группы

В некоторых вариантах осуществления расщепляемая линкерная группа представляет собой расщепляемую при окислении-восстановлении линкерную группу, которая расщепляется при восстановлении или окислении. Примером расщепляемой при восстановлении линкерной группы является дисульфидная линкерная группа (-S-S-). Для определения того, является расщепляемая линкерная группа-кандидат подходящей «расщепляемой при восстановлении линкерной группой» или, например, подходящей для применения с конкретной группой иРНК и конкретным направляющим к мишени агентом, то можно использовать способы, описанные здесь. Например, кандидата можно оценить посредством инкубации с дитиотреитолом (DTT) или другим восстановителем, используя реагенты, известные в данной области, которые имитируют скорость расщепления, которую можно наблюдать в клетке, например, в клетке-мишени. Кандидаты также можно оценить в условиях, которые выбирают таким образом, чтобы имитировать условия в крови или сыворотке. В одном варианте соединения-кандидаты расщепляются не больше чем примерно на 10% в крови. В других вариантах пригодные соединения-кандидаты деградируют, по меньшей мере, примерно в 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или примерно в 100 раз быстрее в клетке (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточные условия) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных так, чтобы они имитировали внутриклеточные условия). Скорость расщепления соединений-кандидатов также можно определить, используя стандартные ферментативные кинетические анализы в условиях, выбранных таким образом, чтобы они имитировали внутриклеточную среду, и сравнивая с условиями, выбранными так, чтобы они

имитировали внеклеточную среду.

ii. Основанные на фосфате расщепляемые линкерные группы

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит основанную на фосфате расщепляемую линкерную группу. Основанная на фосфате расщепляемая линкерная группа расщепляется агентами, которые или вызывают деградацию или гидролизуют фосфатную группу. Примерами агента, который расщепляет фосфатные группы в клетках, являются ферменты, такие как фосфатаза в клетках. Примерами основанных на фосфате линкерных групп являются $-O-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(SR_k)-O-$, $-S-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(OR_k)-S-$, $-S-P(O)(OR_k)-S-$, $-O-P(S)(OR_k)-S-$, $-S-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(R_k)-O-$, $-O-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-O-$, $-S-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-S-$, $-O-P(S)(R_k)-S-$. Примерными вариантами являются $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$, где R_k в каждом случае представляет собой C1-C20 алкил, C1-C20 галогеналкил, C6-C10 арил или C7-C12 аралкил. В некоторых вариантах осуществления основанная на фосфате расщепляемая линкерная группа представляет собой $-O-P(O)(OH)-O-$. Указанные кандидаты можно оценить, используя способы, аналогичные вышеописанным способам.

iii. Расщепляемая кислотой линкерная группа

В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит расщепляемую кислотой линкерную группу. Расщепляемая кислотой линкерная группа представляет собой группу, которая расщепляется в кислых условиях. В предпочтительных вариантах расщепляемые кислотой линкерные группы расщепляются в кислой среде с pH примерно 6,5 или ниже (например, примерно 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 или ниже) или такими агентами, как ферменты, которые могут функционировать в качестве обычной кислоты. В клетке специфические органеллы с низким pH, такие как эндосомы и лизосомы, могут обеспечивать среду для расщепления расщепляемых кислотой линкерных групп. Примеры расщепляемых кислотой линкерных групп включают, без ограничения, гидразоны, сложные эфиры и сложные эфиры аминокислот. Расщепляемые кислотой группы могут иметь общую формулу $-C=NN-$, $C(O)O$ или $-OC(O)$. Примерным вариантом в том случае, когда атом углерода связан с атомом кислорода сложного эфира (алкоксигруппа), является арильная группа, замещенная алкильная группа или третичная алкильная группа, такая как диметилпентил или трет-бутил. Такие кандидаты можно оценить, используя способы, аналогичные вышеописанным способам.

iv. Основанные на сложных эфирах расщепляемые линкерные группы

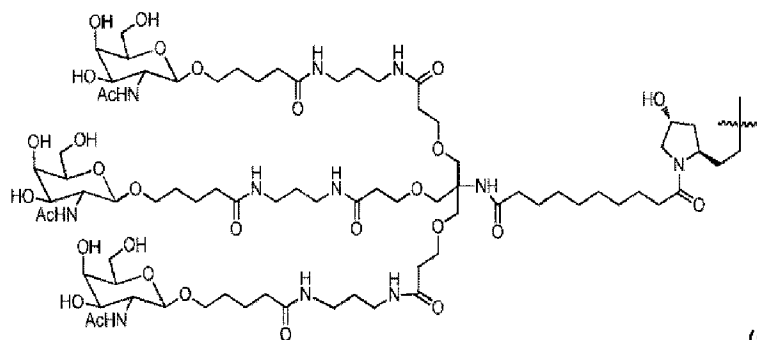
В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит основанную на сложном эфире расщепляемую линкерную группу. Основанная на сложном эфире расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетке такими ферментами как эстеразы и амидазы. Примеры основанных на сложных эфирах расщепляемых линкерных групп включают без ограничения сложные эфиры групп алкилена, алкенилена и

алкинилена. Сложноэфирные расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу -C(O)O- или -OC(O)-. Такие кандидаты можно оценить, используя способы, аналогичные вышеописанным способам.

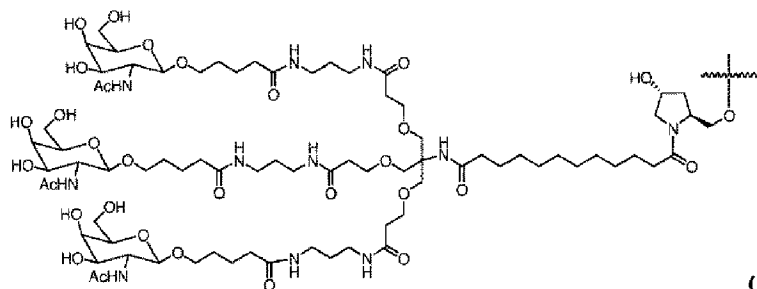
v. Основанные на пептидах расщепляемые линкерные группы

В еще одном варианте расщепляемый линкер содержит основанную на пептиде расщепляемую линкерную группу. Основанная на пептиде расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетке такими ферментами, как пептидазы и протеазы. Основанные на пептидах расщепляемые линкерные группы представляют собой пептидные связи, образованные между аминокислотами, которые приводят к образованию олигопептидов (например, дипептидов, трипептидов и т.д.) и полипептидов. Основанные на пептидах расщепляемые группы не включают амидную группу (-C(O)NH-). Амидная группа может быть образована между любыми алкиленами, алкениленами или алкиниленами. Пептидная связь представляет собой особый тип амидной связи, образованной между аминокислотами и приводящей к образованию пептидов и белков. Основанная на пептиде расщепляемая группа обычно ограничивается пептидной связью (т.е. амидной связью), образованной между аминокислотами с получением пептидов и белков и не включает полную амидную функциональную группу. Основанные на пептидах расщепляемые линкерные группы имеют общую формулу -NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)- где R^A и R^B представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Такие кандидаты можно оценить с использованием способов, аналогичных вышеописанным способам.

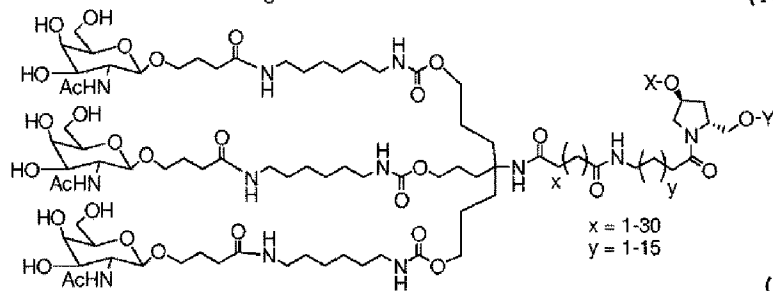
В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов иРНК с линкерами в композициях и способах по изобретению включают, не ограничиваясь этим:



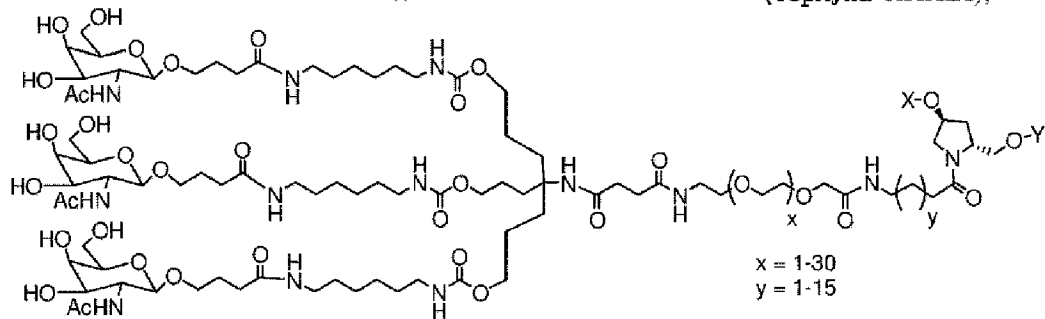
(Формула XXXVII),



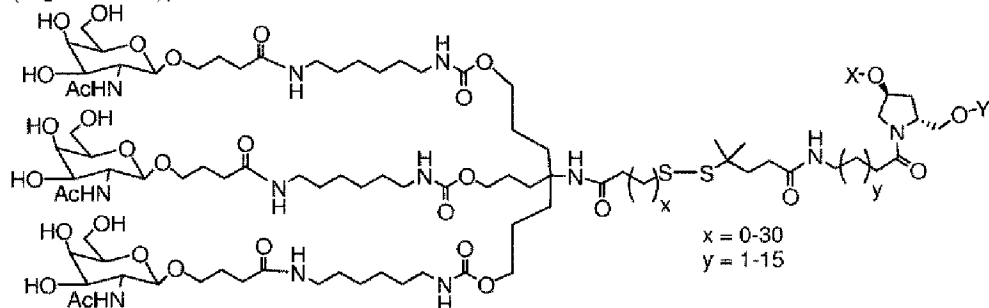
(Формула XXXVIII),



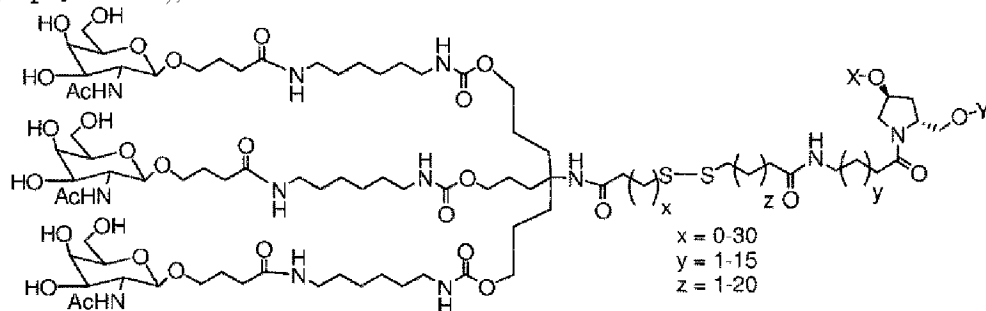
(Формула XXXIX),



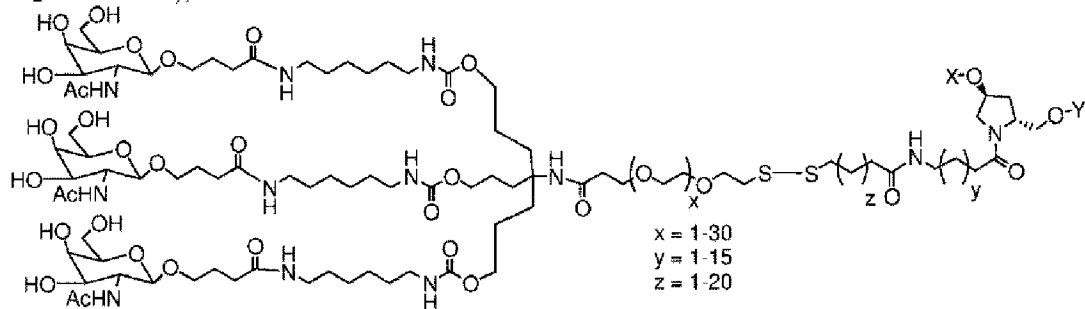
(Формула XL),



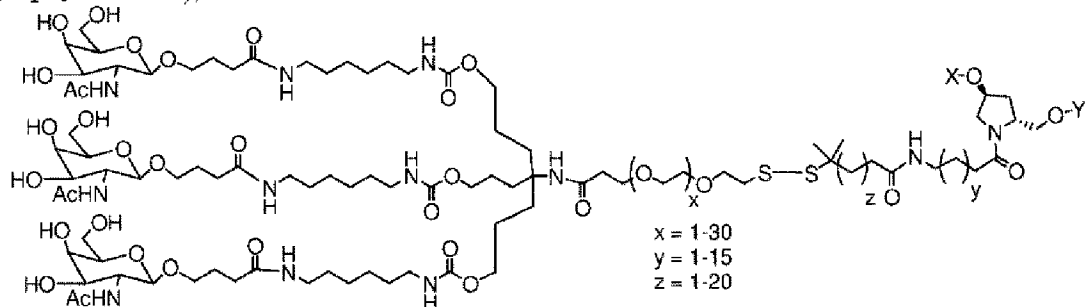
(Формула XLI),



(Формула XLII),



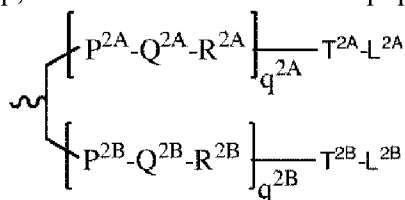
(Формула XLIII), и



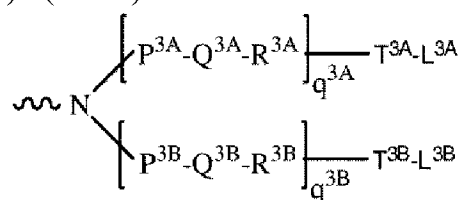
(Формула XLIV), когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой атом водорода.

В некоторых вариантах осуществления композиций и способов по изобретению лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc (N-ацетилгалактозамина), присоединенных через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

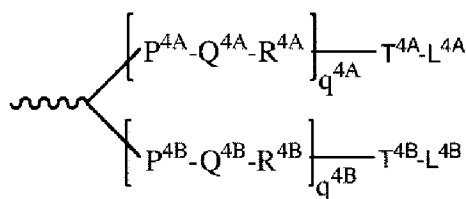
В некоторых вариантах осуществления дцРНК по изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XLV) - (XLVI):



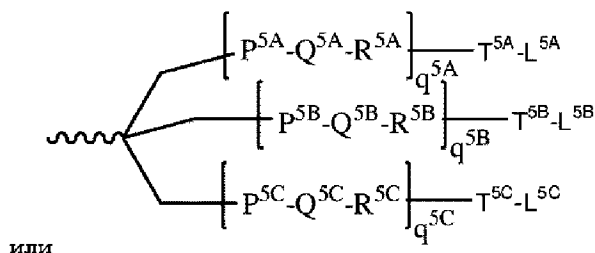
Формула XLV



Формула XLVI



Формула XLVII



Формула XLVIII

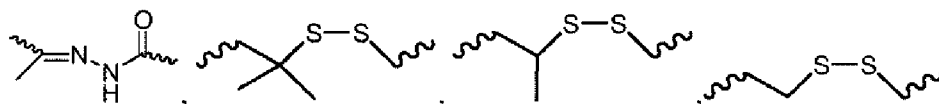
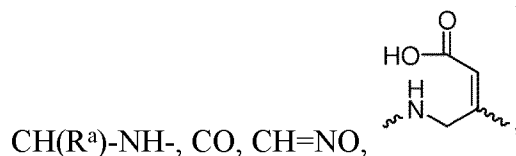
где:

q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} и q^{5C} независимо для каждого случая равны 0-20, и где повторяющаяся единица может быть одинаковой или разной;

P^{2A} , P^{2B} , P^{3A} , P^{3B} , P^{4A} , P^{4B} , P^{5A} , P^{5B} , P^{5C} , T^{2A} , T^{2B} , T^{3A} , T^{3B} , T^{4A} , T^{4B} , T^{5A} , T^{5B} , T^{5C} каждый независимо для каждого случая отсутствует или представляет собой CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH или CH₂O;

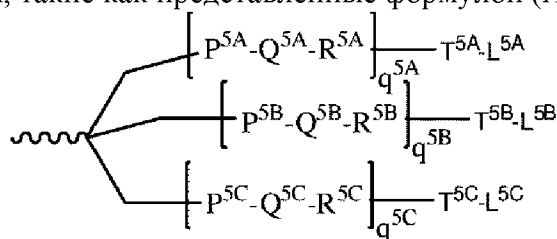
Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} независимо для каждого случая отсутствуют или представляют собой алкилен, замещенный алкилен, в котором один или более метиленов могут быть прерваны или оканчиваются одним или более из O, S, S(O), SO₂, N(RN), C(R')=C(R''), C≡C или C(O);

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



или гетероцикл;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} и L^{5C} представляют собой лиганд; т. е. каждый независимо для каждого случая моносахарид (такой как GalNAc), дисахарид, трисахарид, тетрасахарид, олигосахарид или полисахарид; и R^a представляет собой H или боковую цепь аминокислоты. Трехвалентные конъюгированные производные GalNAc особенно пригодны для использования с агентами-РНКи для ингибирования экспрессии гена-мишени, такие как представленные формулой (XLIX):



(Формула XLIX),

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

Примеры подходящих двухвалентных и трехвалентных разветвленных линкерных групп, конъюгирующих с производными GalNAc, включают, не ограничиваясь этим, структуры, приведенные выше в виде формул II, VII, XI, X и XIII.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение конъюгатов РНК, включают, не ограничиваясь этим, 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; 5585481; 5587371; 5595726; 5597696; 5599923; 5599928; 5688941; 6294664; 6320017; 6576752; 6783931; 6900297; 7037646; и 8106022, каждый из которых в полном объеме включен здесь посредством ссылки.

Необязательно, чтобы данное соединение было единообразно модифицировано во всех положениях, и фактически в одно соединение или даже в один нуклеозид в иРНК может быть включено более одной из вышеуказанных модификаций. Настоящее изобретение также относится к соединениям РНКи, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» соединения РНКи или «химеры» по настоящему изобретению представляют собой соединения РНКи, например, дцРНК, которые содержат две или более химически различающихся областей, каждая из которых состоит, по меньшей мере, из одной мономерной единицы, т.е. нуклеотида в случае соединения дцРНК. Такие РНКи обычно содержат, по меньшей мере, одну область, в которой РНК модифицирована таким образом, чтобы придать РНКи повышенную устойчивость к расщеплению нуклеазами, увеличенный захват клетками и/или повышенную аффинность связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью. Дополнительная область РНКи может служить в качестве субстрата для ферментов, способных расщеплять гибриды РНК:ДНК или РНК:РНК. В качестве примера РНКазы Н является клеточной эндонуклеазой, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. Следовательно, активация РНКазы Н приводит к расщеплению РНК-мишени, тем самым значительно повышая эффективность ингибирования экспрессии генов под действием РНКи. Следовательно, при использовании химерных дцРНК часто можно получить сравнимые результаты в случае более коротких РНКи по сравнению с фосфоротиоатными дезокси-дцРНК, гибридизующимися с той же областью-мишенью. Расщепление РНК-мишени можно выявить обычным образом, используя гель-электрофорез, и при необходимости ассоциированные способы гибридизации нуклеиновых кислот, известные в данной области.

В некоторых случаях РНК в РНКи может быть модифицирована нелигандной группой. Ряд нелигандных молекул был конъюгирован с РНКи для повышения активности,

распределения в клетках или захвата РНК клетками, и процедуры получения таких конъюгатов доступны в научной литературе. Такие нелигандные группы включали липидные группы, 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), холевую кислоту (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4: 1053), тиоэфир, например, гексил-S-тритилтиол (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, группы 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, дигексадецил-рац-глицерин или 1,2-ди-О-гексадецил-рац-глицеро-3-Н-фосфонат триэтиламмония (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18: 3777), полиамин или цепь полиэтиленгликоля (Manoharan et al., *Nucleosides and Nucleotides*, 1995, 14: 969), или адамантануксусную кислоту (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36: 3651), группа пальмитоила (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229), или группа октадециламина или гексиламинокарбонилхлестерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277: 923). Соответствующие патенты США, в которых описано получение таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих аминоклипер в одном или нескольких положениях последовательности. Затем аминоклипер подвергают взаимодействию с конъюгируемой молекулой, используя соответствующие реагенты для связывания или активации. Реакцию конъюгации можно провести либо с РНК, все еще связанной с твердой подложкой, либо после отщепления РНК в фазе раствора. Очистка РНК-конъюгата с использованием ВЭЖХ обычно дает чистый конъюгат.

V. Доставка РНК-агента по изобретению

Доставка РНК-агента по настоящему изобретению в клетку, например, в клетку субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект, имеющий расстройство, ассоциированное с LRRK2, например, заболевание, ассоциированное с LRRK2, может быть достигнуто рядом различных путей. Например, доставку можно осуществить приведением в контакт клетки с РНК-агентом по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставка *in vivo* также может быть осуществлена непосредственно введением композиции, содержащей РНК-агент, например, дцРНК, субъекту. Альтернативно, доставка *in vivo* может осуществляться опосредованно введением одного или нескольких векторов, которые кодируют и направляют экспрессию РНК-агента. Эти альтернативы дополнительно обсуждаются ниже.

В общем, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с РНК-агентом по настоящему изобретению (см., например, Akhtar S. and Julian R.L., (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 и WO 94/02595, которые в полном объеме включены здесь посредством ссылки). Для

доставки *in vivo* факторы, которые необходимо учитывать для доставки РНКи-агента, включают, например, биологическую стабильность доставляемого агента, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемого агента в ткани-мишени. Неспецифические эффекты РНКи-агента можно свести к минимуму путем местного введения, например, прямой инъекцией или имплантацией в ткань или местным введением препарата. Местное введение в область лечения максимизирует местную концентрацию средства, ограничивает воздействие агента на ткани всего организма, которые могут в ином случае пострадать под действием агента или которые могут вызвать деградацию агента, и позволяет вводить более низкую общую дозу молекулы иРНК. Результаты нескольких исследований показали эффективный нокдаун генных продуктов при локальном введении иРНК-агента. Например, было показано, что внутриглазная доставка дцРНК VEGF посредством инъекции в стекловидное тело макакам-крабоедам (Tolentino M.L. et al. (2004) *Retina*, 24: 132-138) и субретинальные инъекции мышам (Reich S.L. et al. (2003) *Mol. Vis.*, 9: 210-216) предотвращают неоваскуляризацию на экспериментальной модели возрастной макулярной дегенерации. Кроме того, прямая интратуморальная инъекция дцРНК мышам уменьшает объем опухоли (Pille L. et al. (2005) *Mol. Ther.*, 11: 267-274) и может увеличивать продолжительность жизни мышей, несущих опухоли (Kim W.L. et al. (2006) *Mol. Ther.*, 14: 343-350; Li S. et al. (2007) *Mol. Ther.*, 15: 515-523). Также была показана успешная РНКинтерференция при локальной доставке в ЦНС посредством 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 в легкие посредством 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). В случае системного введения РНКи для лечения заболевания РНК может быть модифицирована или альтернативно доставлена с использованием системы доставки лекарственного средства, где оба способа действуют, предотвращая быстрый распад дцРНК под действием эндо- и экзонуклеаз *in vivo*. Модификация РНК или фармацевтический носитель также позволяют направить композицию РНКи в ткань-мишень и избежать нежелательных нецелевых эффектов (например, не желая ограничиваться конкретной теорией, было установлено, что использование GNA, как здесь описано, дестабилизирует затравочную область дцРНК, что приводит к повышенному предпочтению таких дцРНК в отношении эффективности воздействия на мишень по сравнению с нецелевыми эффектами, когда такие нецелевые эффекты значительно ослабляются такой дестабилизацией затравочной области). Молекулы РНКи можно модифицировать химической конъюгацией с липофильными группами, такими как холестерин, для усиления захвата клетками и предотвращения деградации. Например, РНКи, направленную против AroB, конъюгированной с липофильной группой холестерина, инъектировали системно мышам, что приводило к нокдауну мРНК aroB как в печени, так и в тонком кишечнике (Soutschek J. et al. (2004)

Nature, 432: 173-178). Было показано, что конъюгация РНК-агента с аптамером ингибирует рост опухолей и опосредует регрессию опухоли на мышинной модели рака предстательной железы (McNamara J.O. et al. (2006) *Nat. Biotechnol.*, 24: 1005-1015). В альтернативном варианте осуществления РНК-агент может быть доставлен с использованием систем доставки, используемых для лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионные системы доставки. Положительно заряженные катионные системы доставки способствуют связыванию молекулы РНК-агента (отрицательно заряженной), а также усиливают взаимодействия в отрицательно заряженной клеточной мембране, обеспечивая возможность эффективного захвата РНК-агента клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут либо быть связаны с РНК-агентом, либо индуцированы с целью образования везикулы или мицеллы (см., например, Kim S.H. et al. (2008) *Journal of Controlled Release*, 129(2): 107-116), которая заключает в себе РНК-агент. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию РНК-агента при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов РНК-агентов может осуществить специалист в данной области (см., например, публикации 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 в полном объеме включены здесь посредством ссылки). Некоторые не ограничивающие примеры систем доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки РНК-агентов, включают DOTAP (Sorensen D.R. et al. (2003), выше; Verma U.N. et al. (2003), выше), олигофектамин, «твердые частицы нуклеиновая кислота-липид» (Zimmermann T.S. et al. (2006) *Nature*, 441: 111-114), кардиолипид (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. в печати; Aigner A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.*, 71659), пептиды Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu S. (2006) *Mol. Pharm.*, 3: 472-487) и полиамидоамины (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 иРНК-агент образует комплекс с циклодекстрином для системного введения. Способы введения и фармацевтические композиции иРНК-агентов и циклодекстринов можно найти в патенте США № 7427605, который в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки.

Некоторые аспекты настоящего описания относятся к способу снижения экспрессии гена-мишени LRRK2 в клетке, включающему приведение в контакт указанной клетки с двухцепочечным РНК-агентом по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления клетка представляет собой внепеченочную клетку, необязательно клетку ЦНС, такую как клетка головного мозга. В другом варианте осуществления клетка представляет собой внепеченочную клетку, необязательно глазную клетку.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу снижения экспрессии гена-мишени LRRK2 у субъекта, включающему введение субъекту двухцепочечного РНК-агента по настоящему изобретению.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта, страдающего расстройством ЦНС (нейродегенеративным расстройством), включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКи-агента, нацеленного на LRRK2 по настоящему изобретению, тем самым обеспечивая лечение субъекта. Иллюстративные расстройства ЦНС, которые можно лечить способом по настоящему изобретению, включают расстройство ЦНС, ассоциированное с LRRK2, такое как болезнь Паркинсона.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта, страдающего заболеванием глазной системы, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества двухцепочечного РНКи-агента, нацеленного на LRRK2, по настоящему изобретению, тем самым обеспечивая лечение субъекта. Примеры глазных болезней, которые можно лечить способом по настоящему изобретению, включают болезни глаз, ассоциированные с LRRK2, такие как отек глаз, хрусталика и слуховых пузырьков.

В одном варианте осуществления двухцепочечный РНКи-агент вводят интратекально. Посредством интратекального введения двухцепочечного РНКи-агента с использованием данного способа может снизить экспрессию гена-мишени LRRK2 в тканях головного мозга (например, полосатого тела) или позвоночника, например, в коре головного мозга, мозжечке, шейном отделе позвоночника, поясничном отделе позвоночника и грудном отделе позвоночника, иммунных клетках, таких как моноциты и Т-клетки.

Для простоты изложения состава, композиции и способы в этом разделе обсуждаются в основном в отношении модифицированных соединений миРНК. Однако следует понимать, что эти составы, композиции и способы можно применять на практике с другими соединениями миРНК, например, немодифицированными соединениями миРНК, и такая практика находится в рамках настоящего изобретения. Композиция, включающая РНКи-агент, можно доставить субъекту различными путями. Типичные пути введения включают: интратекальный, внутривенный, местный, ректальный, анальный, интравагинальный, назальный, легочный и глазной.

РНКи-агенты по настоящему изобретению можно включить в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Такие композиции обычно включают один или более видов РНКи-агента и фармацевтически приемлемый носитель. В рамках настоящего изобретения, выражение «фармацевтически приемлемый носитель» предназначено включать любой и все растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие всасывание средства и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Использование таких сред и средств для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любая общепринятая среда или средство является несовместимым с активным соединением, предусматривается его использование в композициях. В композиции также можно вводить дополнительные активные соединения.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими путями в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от области, которая подвергается лечению. Введение может быть местным (включая глазное, интравагинальное, ректальное, интраназальное, чрескожное), интратекальным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную капельную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию, интратекальное или внутрижелудочковое введение.

Путь и место введения могут быть выбраны для повышения целенаправленного действия. Например, для воздействия на нервную ткань или спинной мозг интратекальная инъекция является логичным выбором. На клетки легких можно воздействовать путем введения РНКи-агента в форме аэрозоля. На эндотелиальные клетки сосудов можно нацеливать, покрывая баллонный катетер РНКи-агентом и механически вводя РНК.

Составы для местного применения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и т.п. Презервативы с покрытием, перчатки и т.п. также могут быть пригодными.

Композиции для перорального введения включают порошки или гранулы, суспензии или растворы в воде, сиропы, эликсиры или неводные среды, таблетки, капсулы, леденцы или пастилки. В случае таблеток носители, которые можно использовать, включают лактозу, цитрат натрия и соли фосфорной кислоты. В таблетках обычно используются различные разрыхлители, такие как крахмал, и смазывающие вещества, такие как стеарат магния, лаурилсульфат натрия и тальк. Для перорального введения в форме капсул пригодными разбавителями являются лактоза и высокомолекулярные полиэтиленгликоли. Когда для перорального применения требуются водные суспензии, то композиции нуклеиновых кислот можно комбинировать с эмульгирующими и суспендирующими агентами. При желании могут быть добавлены определенные подсластители или ароматизаторы.

Композиции для интратекального или внутрижелудочкового введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки.

Составы для парентерального введения могут включать стерильные водные растворы, которые также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Внутрижелудочковую инъекцию можно упростить с помощью внутрижелудочкового катетера, например, присоединенного к резервуару. Для внутривенного применения можно контролировать общую концентрацию растворенных веществ, чтобы сделать препарат изотоническим.

В одном варианте осуществления введение соединения миРНК, например, двухцепочечного соединения миРНК или соединения омиРНК, композиция является пригодной для парентерального введения, например, внутривенным (например, в виде

болюса или в виде диффузионной инфузии), внутривенным, внутримышечным, интратекально, внутрижелудочково, внутричерепно, подкожно, через слизистую, буккально, сублингвально, эндоскопически, ректально, перорально, вагинально, местно, легочно, интраназально, уретрально или глазно. Введение может осуществлять субъект или другое лицо, например поставщик медицинских услуг. Лекарственный препарат может поставляться в отмеренных дозах или в дозаторе, который выдает отмеренную дозу. Выбранные способы доставки обсуждаются более подробно ниже.

А. Интратекальное введение

В одном варианте осуществления двухцепочечный РНК-агент доставляется путем интратекальной инъекции (т.е. инъекции в спинномозговую жидкость, которая омывает ткань головного и спинного мозга). Интратекальная инъекция РНК-агентов в спинномозговую жидкость может быть выполнена в виде болюсной инъекции или с помощью мининасосов, которые можно имплантировать под кожу, обеспечивая регулярную и постоянную доставку миРНК в спинномозговую жидкость. Циркуляция спинномозговой жидкости из сосудистого сплетения, где она образуется, вниз вокруг спинного мозга и ганглиев задних корешков, а затем вверх, мимо мозжечка и через кору к арахноидальным грануляциям, где жидкость может выйти из ЦНС, и в зависимости от размера, стабильности и растворимости введенные молекулы соединений, доставляемых интратекально, могут поражать мишени во всей ЦНС.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляется с помощью насоса. Насос может представлять собой хирургически имплантированный осмотический насос. В одном варианте осуществления осмотический насос имплантируют в субарахноидальное пространство спинномозгового канала для облегчения интратекального введения.

В некоторых вариантах осуществления интратекальное введение осуществляется через систему интратекальной доставки фармацевтического препарата, включающую резервуар, содержащий определенный объем фармацевтического агента, и насос, сконфигурированный для доставки части фармацевтического агента, содержащегося в резервуаре. Более подробную информацию об этой системе интратекальной доставки можно найти в WO 2015/116658, которая в полном объеме включена здесь посредством ссылки.

Количество интратекально вводимых РНК-агентов может варьироваться для одного гена-мишени до другого гена-мишени, и подходящее количество, которое необходимо применять, может определяться индивидуально для каждого гена-мишени. Обычно это количество составляет от 10 мкг до 2 мг, предпочтительно от 50 мкг до 1500 мкг, более предпочтительно от 100 мкг до 1000 мкг.

В. РНК-агенты по настоящему изобретению, кодированные вектором

РНК-агенты, нацеленные на ген LRRK2, могут экспрессироваться из транскрипционных единиц, встроенных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture

A et al., TIG. (1996), 12:5-10; WO 00/22113, WO 00/22114 и патент США 6054299). Экспрессия предпочтительно является продолжительной (в течение месяцев или более) в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа ткани или клетки-мишени. Эти трансгены могут быть введены в виде линейной конструкции, кольцевой плазмиды или вирусного вектора, который может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор. Трансген также может быть сконструирован таким образом, чтобы его можно было наследовать в виде внехромосомной плазмиды (Gassmann et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 92:1292).

Отдельная цепь или цепи РНКи-агента могут быть транскрибированы с промотора в экспрессионном векторе. Если две отдельные цепи должны быть экспрессированы для получения, например, дцРНК, то два отдельных экспрессионных вектора можно ввести совместно (например, путем трансфекции или инфекции) в клетку-мишень. Альтернативно, каждая отдельная цепь дцРНК может транскрибироваться промоторами, каждый из которых расположен на одной и той же экспрессионной плазмиде. В одном варианте осуществления дцРНК экспрессируется в виде полинуклеотидов с инвертированными повторами, соединенных линкерной полинуклеотидной последовательностью, так что дцРНК имеет структуру «стебель-петля».

Экспрессионные векторы РНКи-агента обычно представляют собой ДНК-плазмиды или вирусные векторы. Экспрессионные векторы, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно совместимые с клетками позвоночных, можно использовать для получения рекомбинантных конструкций для экспрессии РНКи-агента, как здесь описано. Доставка векторов, экспрессирующих РНКи-агент, может быть системной, например, путем внутривенного или внутримышечного введения, путем введения в клетки-мишени, эксплантированные у пациента, с последующим повторным введением в организм пациента, или любым другим способом, позволяющим осуществить введение в желаемую клетку-мишень.

Системы вирусных векторов, которые можно использовать в способах и композициях, описанных здесь, включают без ограничения (a) аденовирусные векторы; (b) ретровирусные векторы, включая без ограничения лентивирусные векторы, вирус лейкоза мышей Молони и т.д.; (c) векторы на основе аденоассоциированных вирусов; (d) векторы на основе вируса простого герпеса; (e) векторы на основе вируса SV40; (f) векторы на основе вируса полиомы; (g) векторы на основе вируса папилломы; (h) пикорнавирусные векторы; (i) векторы на основе поксвирусов, таких как ортопоксвирус, например, векторы на основе вируса осповакцины или авипоксвируса, например, поксвируса канареек или вируса оспы птиц; и (j) зависимый от хелперов или имеющий усеченный геном аденовирус. Дефектные по репликации вирусы также могут быть предпочтительными. Разные векторы будут включаться или не будут включаться в геном клеток. Конструкции при необходимости могут содержать вирусные последовательности для трансфекции. Альтернативно, конструкция может быть включена в векторы, способные к эпизомной репликации, например, векторы EPV и EBV. Для конструкций для рекомбинантной

экспрессии РНКи-агента обычно могут потребоваться регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.д., чтобы обеспечить экспрессию РНКи-агента в клетках-мишенях. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, известны в данной области.

VI. Фармацевтические композиции по изобретению

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и составам, которые включают РНКи-агенты по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим РНКи-агент, как здесь описано, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие РНКи-агент, применимы для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с экспрессией или активностью LRRK2, например, заболевания, ассоциированного с LRRK2.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции по изобретению являются стерильными. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции по изобретению являются апирогенными.

Такие фармацевтические композиции формулируют с учетом способа доставки. Одним примером являются композиции, составленные для системного введения посредством парентеральной доставки, например, внутривенной (в/в), внутримышечной (в/м) или подкожной (п/к) доставки. Другим примером являются композиции, составленные для прямой доставки в ЦНС, например, интратекальной или интравитреальной инъекцией, необязательно инфузией в головной мозг (например, полосатое тело), такой как непрерывная инфузия с помощью насоса.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена LRRK2. Как правило, подходящая доза РНКи-агента по настоящему изобретению будет находиться в диапазоне примерно от 0,001 до примерно 200,0 мг на кг массы тела реципиента в день, обычно в диапазоне примерно от 1 до 50 мг на кг массы тела на человека в день.

Режим повторных доз может включать введение терапевтического количества РНКи-агента на регулярной основе, например, от одного раза в месяц до одного раза в шесть месяцев. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент вводят примерно один раз в квартал (т.е. примерно один раз каждые три месяца) до примерно двух раз в год.

После начальной схемы лечения (например, нагрузочной дозы) лечение можно проводить реже.

В еще одних вариантах осуществления разовая доза фармацевтических композиций может быть продолжительной, так что последующие дозы вводят с интервалом не более 1, 2, 3 или 4 или более месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят один раз в месяц. В других вариантах осуществления изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят от одного раза в квартал до двух раз в год.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что определенные факторы

могут оказывать влияние на дозировку и временной режим, необходимые для эффективного лечения субъекта, включая, помимо прочего, тяжесть заболевания или расстройства, предшествующее лечение, общее состояние здоровья или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта терапевтически эффективным количеством композиции может включать однократное лечение или цикл лечений.

Достижения в области генетики мышей привели к созданию ряда мышинных моделей для изучения различных заболеваний человека, таких как ALS и FTD, при которых было бы полезно снижение экспрессии LRRK2. Такие модели можно использовать для тестирования РНКи-агентов *in vivo*, а также для установления терапевтически эффективной дозы. Подходящие модели на грызунах известны в данной области техники и включают, например, модели, описанные, например, в публикации Cepeda et al. (ASN Neuro (2010) 2(2):e00033) и Pouladi et al. (Nat. Reviews (2013) 14:708).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно вводить несколькими путями в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и от области, которая подвергается лечению. Введение может быть местным (например, с помощью трансдермального пластыря), легочным, например, путем ингаляции или инсуффляции порошков или аэрозолей, в том числе с помощью небулайзера; интратрахеальным, интраназальным, эпидермальным и чрескожным, пероральным или парентеральным. Парентеральное введение включает внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутрибрюшинную или внутримышечную инъекцию или инфузию; подкожно, например, через имплантированное устройство; или внутричерепное, например, внутрименингеальное, интратекальное или желудочковое введение.

РНКи-агенты могут быть доставлены таким образом, чтобы нацеливаться на конкретную ткань, такую как ЦНС (например, нейрональную, глиальную или сосудистую ткань головного мозга).

Фармацевтические композиции и препараты для местного введения могут включать трансдермальные пластыри, мази, лосьоны, кремы, гели, капли, суппозитории, спреи, жидкости и порошки. Могут быть необходимы или желательны обычные фармацевтические носители, водные, порошкообразные или масляные основы, загустители и тому подобное. Также могут быть применимы покрытые слоем презервативы, перчатки и тому подобное. Подходящие составы для местного применения, в которых РНКи-агенты, описанные здесь, 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, диолеоилфосфатидилэтаноламин, DOPE, димиристоилфосфатидилхолин, DMPC, дистеароилфосфатидилхолин), отрицательные (например, димеристоилфосфатидилглицерин, DMPG) и катионные (например, диолеоилтетраметиламинопропил, DOTAP и диолеоилфосфатидилэтаноламин, DOTMA). РНКи-агенты, охарактеризованные в изобретении, могут быть инкапсулированы в

липосомы или могут образовывать с ними комплексы, в частности с катионными липосомами. Альтернативно, РНКи-агенты могут находиться в комплексе 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-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или сложный C_{1-20} алкиловый эфир (например, изопропилмиристат, IPM), моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемая соль. Составы для местного применения подробно описаны в патенте США № 6747014, который включен здесь посредством ссылки.

А. Составы РНКи-агентов, содержащие мембранные молекулярные структуры

РНКи-агент для применения в композициях и способах по настоящему изобретению может быть составлен для доставки в виде мембранной молекулярной структуры, например липосомы или мицеллы. В рамках настоящего изобретения, термин «липосома» относится к везикуле, состоящей из амфифильных липидов, расположенных по меньшей мере в одном бислое, например, в одном бислое или во множестве бислоев. Липосомы включают однослойные и многослойные везикулы, которые имеют мембрану, образованную из липофильного материала, и водное внутреннее пространство. Водное пространство содержит композицию РНКи-агента. Липофильный материал изолирует водное внутреннее пространство от водной внешней среды, которое обычно не включает композицию РНКи-агента, хотя в некоторых примерах это происходит. Липосомы полезны для переноса и доставки активных ингредиентов к месту проявления своего действия. Поскольку липосомальная мембрана структурно подобна биологическим мембранам, то при нанесении липосом на ткань липосомальный бислой сливается с бислоем клеточных мембран. По мере слияния липосомы и клетки содержимое внутреннего водного пространства, которое включает РНКи-агент, доставляется в клетку, где РНКи-агент может специфически связываться с РНК-мишенью и может опосредовать РНКи. В некоторых вариантах осуществления липосомы также специально нацелены, например, для направления агента РНК-интерференции к определенным типам клеток.

Липосомы, содержащие РНКи-агент, могут быть получены различными способами. В одном примере липидный компонент липосомы растворяют в детергенте, при этом липидный компонент образует мицеллы. Например, липидный компонент может представлять собой амфипатический катионный липид или липидный конъюгат. Детергент может иметь высокую критическую концентрацию при мицеллообразовании и может быть неионогенным. Примеры детергентов включают холат, CHAPS, октилглюкозид, дезоксихолат и лауроилсаркозин. Затем препарат РНКи-агента добавляют к мицеллам, которые включают липидный компонент. Катионные группы липида взаимодействуют с РНКи-агентом и конденсируются вокруг РНКи-агента с образованием липосомы. После конденсации детергент удаляют, например, диализом, для получения липосомального

препарата РНКи-агента.

При необходимости соединение-носитель, которое способствует конденсации, может быть добавлено во время реакции конденсации, например, путем контролируемого добавления. Например, соединение-носитель может представлять собой полимер, отличный от нуклеиновой кислоты (например, спермин или спермидин). Значение pH также можно корректировать, чтобы способствовать конденсации.

Способы получения стабильных носителей для доставки полинуклеотидов, которые включают комплекс полинуклеотид/катионный липид в качестве структурных компонентов носителя для доставки, дополнительно описаны, например, в WO 96/37194, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Формирование липосом также может включать один или несколько аспектов иллюстративных способов, описанных Felgner P. L. et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8:7413-7417; патент США № 4897355; патент США № 5171678; Bangham et al. (1965) *M. Mol. Biol.*, 23:238; Olson et al. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 557:9; Szoka et al. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 4194; Mayhew et al. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 775:169; Kim et al. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 728:339; и Fukunaga et al. (1984) *Endocrinol.*, 115:757. Обычно используемые методы приготовления липидных агрегатов подходящего размера для использования в качестве средств доставки включают обработку ультразвуком и процедуру замораживания-оттаивания плюс экструзию (см., например, Mayer et al. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 858:161). Микрофлюидизацию можно использовать, когда желателен получить стабильно небольшие (от 50 до 200 нм) и относительно однородные агрегаты (Mayhew et al. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 775:169). Эти способы легко адаптируются для упаковки препаратов РНКи-агента в липосомы.

Липосомы делятся на две больших группы. Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные липосомы, которые взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновой кислоты с образованием стабильного комплекса. Положительно заряженный комплекс нуклеиновая кислота/липосома связывается с отрицательно заряженной поверхностью клетки и интернализуется в эндосоме. За счет кислого значения pH внутри эндосом липосомы разрушаются, высвобождая свое содержимое в цитоплазму клетки (Wang et al. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147:980-985).

Липосомы, чувствительные к pH, или отрицательно заряженные липосомы, захватывают нуклеиновые кислоты, а не образуют с ними комплексы. Поскольку и нуклеиновая кислота, и липид заряжены одинаково, то происходит скорее отталкивание, чем образование комплекса. Тем не менее, некоторое количество нуклеиновой кислоты захватывается внутрь водного пространства этих липосом. Липосомы, чувствительные к pH, использовались для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих ген тимидинкиназы, в клеточные монослои в культуре. Экспрессию экзогенного гена обнаруживали в клетках-мишенях (Zhou et al. (1992) *Journal of Controlled Release*, 19:269-274).

Один из основных типов липосомальной композиции включает фосфолипиды,

отличные от фосфатидилхолина природного происхождения. Нейтральные липосомальные композиции, например, могут быть получены из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC) или дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC). Анионные липосомальные композиции обычно образуются из димиристоилфосфатидилглицерина, в то время как анионные фузогенные липосомы образуются главным образом из диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE). Другой тип липосомальной композиции образуется из фосфатидилхолина (PC), например, такого как соевый PC и яичный PC. Другой тип образуется из смесей фосфолипидов, фосфатидилхолина или холестерина.

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

Неионогенные липосомальные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в коже, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome™ I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome™ II (глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки циклоспорина А в дерму кожи мыши. Результаты показали, что такие неионогенные липосомальные системы эффективно способствуют отложению циклоспорина А в различных слоях кожи (Hu et al. (1994) S.T.P. Pharma. Sci., 4(6):466).

Липосомы также включают «стерически стабилизированные» липосомы, термин, который в используемом здесь смысле, относится к липосомам, содержащим один или несколько специализированных липидов, которые при включении в липосомы приводят к повышению периода полураспада в кровотоке по сравнению с липосомами, в которых отсутствуют такие специализированные липиды. Примерами стерически стабилизированных липосом являются липосомы, в которых часть везикула-образующих липидов липосомы (А) содержит один или более гликолипидов, таких как моносиалоганглиозид G_{M1}, или (В) дериватизована одним или более гидрофильными полимерами, такими как группа полиэтиленгликоля (ПЭГ). Не желая ограничиваться конкретной теорией, в данной области полагают, что, по меньшей мере, в случае стерически стабилизированных липосом, содержащих ганглиозиды, сфингомиелин или ПЭГ-дериватизованные липиды, увеличенное время полураспада таких стерически стабилизированных липосом в кровотоке происходит, вследствие пониженного захвата в клетки ретикулоэндотелиальной системы (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Различные липосомы, содержащие один или более гликолипидов, известны в данной области. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) сообщили о способности моносиалоганглиозид G_{M1}, галактоцеребозидсульфата и фосфатидилинозитола

увеличивать время полураспада липосом в крови. Такие данные были уточнены Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). В патенте США № 4837028 и в публикации WO 88/04924 Allen et al. раскрыли липосомы, содержащие (1) сфингомиелин и (2) ганглиозид G_{M1} или сложный эфир галактоцереброзидсульфата. В патенте США № 5543152 (Webb et al.) раскрыты липосомы, содержащие сфингомиелин. Липосомы, содержащие 1,2-sn-димиристоилфосфатидилхолин, раскрыты в WO 97/13499 (Lim et al.).

В одном варианте осуществления используются катионные липосомы. Преимущество катионных липосом заключается в том, что они способны сливаться с клеточной мембраной. Некатионные липосомы, хотя и не способны так же эффективно сливаться с плазматической мембраной, поглощаются макрофагами *in vivo* и могут использоваться для доставки РНК-агента в макрофаги.

Дополнительные преимущества липосом включают: липосомы, полученные из природных фосфолипидов, являются биосовместимыми и биodeградируемыми; липосомы могут включать широкий спектр водорастворимых и жирорастворимых лекарственных средств; липосомы могут защищать инкапсулированные РНК-агенты в их внутренних компартментах от метаболизма и деградации (Rosoff, in «Pharmaceutical Dosage Forms», Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Важными факторами при приготовлении липосомальных составов являются поверхностный заряд липидов, размер везикул и водный объем липосом.

Положительно заряженный синтетический катионный липид, N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-N,N,N-триметиламмоний хлорид (DOTMA), можно использовать для получения небольших липосом, которые спонтанно взаимодействуют с нуклеиновой кислотой с образованием комплексов липид-нуклеиновая кислота, которые способны сливаться с отрицательно заряженными липидами клеточных мембран клеток в культурах тканей, что приводит к доставке РНК-агента (см., например, Felgner P.L. et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417 и патент США № 4897355 для описания DOTMA и его применения с ДНК).

Аналог DOTMA, 1,2-бис(олеилокси)-3-(триметиламмоний)пропан (DOTAP), можно использовать в сочетании с фосфолипидом для образования ДНК-комплексобразующих везикул. Липофектин™ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) является эффективным средством для доставки высокоанионных нуклеиновых кислот в клетки культуры живых тканей, которые содержат положительно заряженные липосомы с DOTMA, которые спонтанно взаимодействуют с отрицательно заряженными полинуклеотидами с образованием комплексов. Когда используется достаточное количество положительно заряженных липосом, то суммарный заряд образующихся комплексов также положительный. Полученные таким образом положительно заряженные комплексы спонтанно прикрепляются к отрицательно заряженным клеточным поверхностям, сливаются с плазматической мембраной и эффективно доставляют функциональные нуклеиновые кислоты, например, в клетки тканевых культур. Другой коммерчески доступный катионный липид, 1,2-бис(олеилокси)-

3,3-(триметиламмоний)пропан («DOTAP») (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana), отличается от DOTMA тем, что олеоильные группы связаны сложноэфирной связью, а не эфирными связями.

Другие катионные липидные соединения, о которых сообщалось, включают те, которые были конъюгированы с различными группами, включая, например, карбокиспермин, который был конъюгирован с одним из двух типов липидов, и он включает такие производные, как 5-карбокиспермилглициндиоктоолеоиламид («DOGS») (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) и дипальмитоилфосфатидилэтаноламин-5-карбокиспермиламид («DPPEs») (см., например, патент США № 5171678).

Другой конъюгат катионного липида включает производное липида и холестерина («DC-Chol»), который был формулирован в виде липосом в комбинации с DOPE (см. Gao X. and Huang L. (1991) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 179:280). Сообщалось, что липополилизин, полученный конъюгированием полилизина с DOPE, эффективен для трансфекции в присутствии сыворотки (Zhou X. et al. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1065:8). Сообщалось, что для определенных линий клеток такие липосомы, содержащие конъюгированные катионные липиды, проявляют более низкую токсичность и обеспечивают более эффективную трансфекцию по сравнению с DOTMA-содержащими композициями. Другие коммерчески доступные продукты катионных липидов включают DMR1E и DMR1E-HP (Vical, La Jolla, California) и липофектамин (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Другие катионные липиды, подходящие для доставки олигонуклеотидов, описаны в WO 98/39359 и WO 96/37194.

Липосомальные составы особенно подходят для местного применения, при этом липосомы обладают некоторыми преимуществами по сравнению с другими составами. К таким преимуществам относятся сниженные побочные эффекты, связанные с высокой системной абсорбцией вводимого лекарственного средства, повышенное накопление вводимого лекарственного средства в желаемой мишени и возможность введения РНК-агента в кожу. В некоторых вариантах осуществления липосомы используются для доставки РНК-агента в клетки эпидермиса, а также для усиления проникновения РНК-агента в ткани дермы, например, в кожу. Например, липосомы можно применять местно. Сообщалось о местной доставке лекарственных препаратов в виде липосом в кожу (см., например, Weiner et al. (1992) *Journal of Drug Targeting*, vol. 2, 405-410 и du Plessis et al. (1992) *Antiviral Research*, 18): 259-265; Mannino R.J. and Fould-Fogerite S., (1998) *Biotechniques*, 6:682-690; Itani T. et al. (1987) *Gene*, 56:267-276; Nicolau C. et al. (1987) *Meth. Enzymol.*, 149:157-176; Straubinger R.M. и Papahadjopoulos D. (1983) *Meth. Enzymol.*, 101:512-527; Wang, C.Y. и Huang, L., (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7851-7855).

Неионогенные липосомальные системы также исследовали для определения их пригодности для доставки лекарственных средств в кожу, в частности, системы, содержащие неионогенное поверхностно-активное вещество и холестерин. Неионогенные липосомальные составы, содержащие Novasome I (глицерилдилаурат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир) и Novasome II

(глицерилдистеарат/холестерин/полиоксиэтилен-10-стеариловый эфир), использовали для доставки лекарственного средства в дерму кожи мышей. Такие составы с РНКи-агентом применимы для лечения дерматологического заболевания.

Липосомы, включающие РНКи-агенты, можно сделать высокодеформируемыми. Такая деформируемость может позволить липосомам проникать через поры, которые меньше среднего радиуса липосомы. Например, трансферсомы представляют собой разновидность деформируемых липосом. Трансферсомы могут быть получены путем добавления активаторов края поверхности, обычно поверхностно-активных веществ, к обычной липосомальной композиции. Трансферсомы, которые включают РНКи-агент, могут быть доставлены, например, подкожно посредством инфицирования для доставки РНКи-агента к кератиноцитам кожи. Для проникновения через неповрежденную кожу млекопитающих липидные везикулы должны пройти через ряд мелких пор, каждая диаметром менее 50 нм, за счет соответствующего трансдермального градиента. Кроме того, благодаря липидным свойствам эти трансферсомы могут самооптимизироваться (адаптироваться к форме пор, например, в коже), самовосстанавливаться и часто могут достигать своих целей без фрагментации, и часто и самозагружаясь.

Другие составы, применимые в настоящем изобретении, описаны в предварительных заявках на патент США с серийными номерами: 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. Заявка РСТ с номером РСТ/US2007/080331, поданная 3 октября 2007 г., также описывает составы, подходящие для настоящего изобретения.

Трансферсомы, еще один тип липосом, представляют собой высокодеформируемые липидные агрегаты, которые являются привлекательными кандидатами в качестве средств доставки лекарственных препаратов. Трансферсомы можно описать как капли липидов, которые настолько высоко деформируются, что легко могут проникать через поры, которые меньше самой капли. Трансферсомы адаптируются к среде, в которой они используются, например, они самооптимизируются (адаптируются к форме пор кожи), самовосстанавливаются, часто достигают своих мишеней без фрагментации и часто самозагружаются. Для получения трансферсом к стандартной липосомальной композиции можно добавить активаторы краевых поверхностей, обычно поверхностно-активные вещества. Трансферсомы использовались для доставки сывороточного альбумина в кожу. Показано, что опосредованная трансферсомами доставка сывороточного альбумина столь же эффективна, как и подкожная инъекция раствора, содержащего сывороточный альбумин.

Поверхностно-активные вещества находят широкое применение в составах, таких как описанные здесь, особенно в эмульсиях (включая микроэмульсии) и липосомах. Наиболее распространенный способ классификации и ранжирования свойств многих различных типов поверхностно-активных веществ, как природных, так и синтетических, заключается в использовании гидрофильно-липофильного баланса (HLB). Свойства гидрофильной группы (известной также как «головка») обеспечивает наиболее полезные критерии для

классификации различных поверхностно-активных веществ, используемых в препаратах (Rieger, в монографии «Pharmaceutical Dosage Forms», Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Если молекула поверхностно-активного вещества не ионизована, то такая молекула относится к группе неионогенных поверхностно-активных веществ. Неионогенные поверхностно-активные вещества широко применяются в фармацевтических и косметических продуктах и используются в широком интервале значений pH. Обычно значения HLB находятся в диапазоне от 2 до примерно 18, в зависимости от их структуры. Неионогенные поверхностно-активные вещества включают неионогенные сложные эфиры, такие как сложные эфиры этиленгликоля, сложные эфиры пропиленгликоля, глицериловые сложные эфиры, полиглицериловые сложные эфиры, сложные эфиры сорбитана, сложные эфиры сахарозы и этоксилированные сложные эфиры. В группу таких соединений также включаются неионогенные алканоламиды и простые эфиры, такие как этоксилаты жирного спирта, пропоксилированные спирты и этоксилированные/пропоксилированные блоксополимеры. Наиболее известными представителями группы неионогенных поверхностно-активных веществ являются полиоксиэтиленовые поверхностно-активные вещества.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет отрицательный заряд, в том случае, когда она растворена или диспергирована в воде, то такое поверхностно-активное вещество классифицируют как анионогенное. Анионогенными поверхностно-активными веществами являются карбоксилаты, такие как мыла, ациллактилаты, ациламины 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 анионогенных поверхностно-активных веществ являются алкилсульфаты и мыла.

Если молекула поверхностно-активного вещества несет положительный заряд, в том случае, когда она растворена или диспергирована в воде, то такое поверхностно-активное вещество классифицируют как катионогенное. Катионогенными поверхностно-активными веществами являются четвертичные аммониевые соли и этоксилированные амины. Наиболее часто используемыми представителями такого класса являются четвертичные аммониевые соли.

Если молекула поверхностно-активного вещества способна нести как положительный, так и отрицательный заряд, то поверхностно-активное вещество классифицируется как амфотерное. Амфотерные поверхностно-активные вещества включают производные акриловой кислоты, замещенные алкиламины, N-алкилбетаины и фосфатиды.

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

РНКи-агент для применения в способах по настоящему изобретению также может

быть представлен в виде мицеллярных составов. «Мицеллы» определяют в настоящем описании как конкретный тип молекулярного агрегата, в котором амфипатические молекулы располагаются в сферическую структуру таким образом, что все гидрофобные участки молекулы направлены внутрь, оставляя гидрофильные участки в контакте с окружающей водной фазой. Существует обратное расположение, если окружающая среда является гидрофобной.

Смешанный мицеллярный состав, подходящий для доставки через трансдермальные мембраны, можно получить смешиванием водного раствора композиции миРНК, C_8 - C_{22} алкилсульфата щелочного металла и образующего мицеллы соединения. Иллюстративные соединения, образующие мицеллы, включают лецитин, гиалуроновую кислоту, фармацевтически приемлемые соли гиалуроновой кислоты, гликолевую кислоту, молочную кислоту, экстракт ромашки, экстракт огурца, олеиновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, моноолеин, моноолеаты, монолаураты, масло бурачника, масло энотеры, ментол, тригидроксиоксохоланилглицин и его фармацевтически приемлемые соли, глицерин, полиглицерин, лизин, полилизин, триолеин, простые эфиры полиоксиэтилена и их аналоги, простые полидоканолалкиловые эфиры и их аналоги, хенодезоксихолат, дезоксихолат и их смеси. Образующие мицеллы соединения можно добавлять одновременно или после добавления алкилсульфата щелочного металла. Смешанные мицеллы образуются по существу при любом типе перешивания ингредиентов, но при интенсивном перемешивании для обеспечения мицелл с меньшим размером.

В одном способе получают первую мицеллярную композицию, которая содержит композицию миРНК и по меньшей мере алкилсульфат щелочного металла. Затем первую мицеллярную композицию смешивают по меньшей мере с тремя образующими мицеллы соединениями для получения смешанной мицеллярной композиции. В другом способе мицеллярную композицию получают смешиванием композиции миРНК, алкилсульфата щелочного металла и по меньшей мере одного из соединений, образующих мицеллы, с последующим добавлением оставшихся образующих мицеллы соединений при интенсивном перемешивании.

В смешанную мицеллярную композицию можно добавить фенол или м-крезол для стабилизации состава и защиты от роста бактерий. Альтернативно, к мицеллообразующим ингредиентам можно добавить фенол или м-крезол. Изотонический агент, такой как глицерин, также может быть добавлен после образования смешанной мицеллярной композиции.

Для доставки мицеллярного состава в виде спрея состав можно поместить в аэрозольный распылитель и наполнить распылитель пропеллентом. Пропеллент, который находится под давлением, в распылителе находится в жидкой форме. Соотношения ингредиентов доводят таким образом, чтобы водная фаза и фаза пропеллента стали одной фазой, т.е. присутствовала одна фаза. Если существует две фазы, необходимо встряхивать распылитель перед распылением части содержимого, например, через дозирующий клапан. Распыляемая доза фармацевтического средства дозируется из дозирующего клапана в виде

тонкодисперсного спрея.

Пропелленты могут включать водородсодержащие хлорфторуглероды, водородсодержащие фторуглероды, диметиловый эфир и диэтиловый эфир. В некоторых вариантах осуществления можно использовать HFA 134a (1,1,1,2-тетрафторэтан).

Конкретные концентрации основных ингредиентов можно определить с помощью относительно простых экспериментов. Для всасывания через ротовую полость часто желательно увеличить, например, по меньшей мере вдвое или втрое дозу, которую используют для инъекций или введения через желудочно-кишечный тракт.

В. Липидные частицы

РНКи-агенты, например, дцРНК по настоящему изобретению, можно полностью инкапсулировать в липидный состав, например, LNP или другую частицу нуклеиновая кислота-липид.

В рамках настоящего изобретения, термин «LNP» относится к стабильной частице нуклеиновая кислота-липид. LNP обычно содержат катионный липид, некатионный липид и липид, предотвращающий агрегацию частицы (например, конъюгат ПЭГ-липид). LNP очень полезны для системных применений, поскольку они демонстрируют более длительное время нахождения в кровотоке после внутривенной (в/в) инъекции и накапливаются в удаленных местах (например, местах, физически отделенных от места введения). LNP включают «pSPLP», которые включают инкапсулированный комплекс конденсирующий агент-нуклеиновая кислота, как указано в WO 00/03683. Частицы по настоящему изобретению обычно имеют средний диаметр от примерно 50 нм до примерно 150 нм, более типично от примерно 60 нм до примерно 130 нм, более типично от примерно 70 нм до примерно 110 нм, наиболее типично от примерно 70 нм до примерно 90 нм, и практически нетоксичны. Кроме того, нуклеиновые кислоты, если они присутствуют в липидных частицах нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению, устойчивы в водном растворе к расщеплению нуклеазой. Частицы нуклеиновая кислота-липид и способ их получения раскрыты, например, в патентах США № 5976567; 5981501; 6534484; 6586410; 6815432; в публикации заявки на патент США № 2010/0324120 и WO 96/40964.

В одном варианте осуществления соотношение липида к лекарственному средству (соотношение масса/масса) (например, соотношение липида к дцРНК) будет находиться в диапазоне примерно от 1:1 до примерно 50:1, примерно от 1:1 до примерно 25:1, примерно от 3:1 до примерно 15:1, примерно от 4:1 до примерно 10:1, примерно от 5:1 до примерно 9:1 или примерно от 6:1 до примерно 9:1. Диапазоны, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам, также рассматриваются как часть раскрытия.

Некоторые конкретные составы LNP для доставки РНКи-агентов были описаны в данной области, включая, например, составы «LNP01», как описано, например, в WO 2008/042973, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные составы липид-дцРНК приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1

	Ионизируемый/катионный липид	Катионный липид/некатионный липид/холестерин/конъюгат ПЭГ-липид Соотношение липид:миРНК
SNALP-1	1,2-Дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/холестерин/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) липид:миРНК ~ 7:1
2-ХТС	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DPPC/холестерин/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 липид:миРНК ~ 7:1
LNP05	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 липид:миРНК ~ 6:1
LNP06	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 липид:миРНК ~ 11:1
LNP07	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, липид:миРНК ~ 6:1
LNP08	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, липид:миРНК ~ 11:1
LNP09	2,2-Дилинолеил-4-диметиламиноэтил-[1,3]диоксолан (ХТС)	ХТС/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 липид:миРНК 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:миPHK 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:миPHK 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазандиил)дидодекан-2- ол (Tech G1)	Tech G1/DSPC/холестерин/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 липид:миPHK 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 липид:миPHK: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 40/15/40/5 липид:миPHK: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 липид:миPHK: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 липид:миPHK: 7:1

LNP17	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 липид:миPHК: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 липид:миPHК: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DMG 50/10/35/5 липид:миPHК: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Chol/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 липид:миPHК: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 липид:миPHК: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Chol/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 липид:миPHК: 10:1

DSPC: дистеароилфосфатидилхолин; DPPC: дипальмитоилфосфатидилхолин; PEG-DMG: PEG-дидириристоилглицерин (C14-PEG или PEG-C14) (PEG со средней молекулярной массой 2000); PEG-DSG: PEG-дистирилглицерин (C18-PEG или PEG-C18) (PEG со средней молекулярной массой 2000); PEG-cDMA: составы, содержащие PEG-карбамоил-1,2-димиристиллоксипропиламин (PEG со средней молекулярной массой 2000) и SNALP (1,2-дилиноленилокси-N,N-диметиламинопропан (DLinDMA)) описаны в WO 2009/127060, которая включена здесь посредством ссылки.

Составы, содержащие ХТС, описаны в WO 2010/088537, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

Составы, содержащие MC3, описаны, например, в публикации патента США № 2010/0324120, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

Составы, содержащие ALNY-100, описаны в WO 2010/054406, полное содержание которой включено здесь в качестве ссылки.

Составы, содержащие C12-200, описаны в WO 2010/129709, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

Композиции и составы для перорального введения включают порошки или гранулы, микрочастицы, наночастицы, суспензии или растворы в воде или в безводных средах, капсулы, гелевые капсулы, саше, таблетки или мини-таблетки. Для их получения может оказаться желательным использование загустителей, ароматизаторов, разбавителей, эмульгаторов, диспергирующих добавок или связующих агентов. В некоторых вариантах осуществления составами для перорального введения являются препараты, в случае которых дцРНК, описанную здесь, вводят в сочетании с одним или более усилителями проницаемости, поверхностно-активными веществами и хелатообразующими агентами. Подходящие поверхностно-активные вещества включают жирные кислоты и/или их сложные эфиры или соли, желчные кислоты и/или их соли. Подходящими желчными кислотами/солями являются хенодезоксихолевая кислота (CDCA) и урзидезоксиходезоксихолевая кислота (UDCA), холевая кислота, дегидрохолевая кислота, дезоксихолевая кислота, глюкохолевая кислота, гликохолевая кислота, гликодезоксихолевая кислота, таурохолевая кислота, таурозидезоксихолевая кислота, тауро-24,25-дигидрофузидат натрия и гликодигидрофузидат натрия. Подходящими жирными кислотами являются арахидоновая кислота, ундекановая кислота, олеиновая кислота, лауриновая кислота, каприловая кислота, каприновая кислота, миристиновая кислота, пальмитиновая кислота, стеариновая кислота, линолевая кислота, линоленовая кислота, дикапрат, трикапрат, моноолеин, дилаурин, глицерил-1-монокапрат, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитин, ацилхолин или моноглицерид, диглицерид или их фармацевтически приемлемые соли (например, соли натрия). В некоторых вариантах используют комбинации усилителей проницаемости, например жирных кислот/солей в сочетании с желчными кислотами/солями. Одним примером комбинации является натриевая соль лауриновой кислоты, каприновой кислоты и UDCA. Другими усилителями проницаемости являются полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир,

полиоксиэтилен-20-цетиловый эфир, днРНК, охарактеризованные в изобретении, могут быть доставлены перорально, в гранулярной форме, включая распыляемые сухие частицы, или в комплексе с образованием микро- или наночастиц. Агенты, образующие комплексы с днРНК, включают полиаминокислоты; полиимины; полиакрилаты; полиалкилакрилаты, полиоксэтаны, полиалкилцианоакрилаты; катионизированные желатины, альбумины, крахмалы, акрилаты, полиэтиленгликоли (ПЭГ) и крахмалы; полиалкилцианоакрилаты; DEAE-derivatизированные полиимины, пуллуланы, целлюлозы и крахмалы. Подходящими комплексообразующими агентами являются хитозан, N-триметилхитозан, поли-L-лизин, полигистидин, полиорнитин, полиспермины, протамин, поливинилпиридин, политиодиэтиламин метилэтилен P(TDAE), 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-молочная кислота), сополимер DL-молочной и гликолевой кислоты (PLGA), альгинат и полиэтиленгликоль (ПЭГ). Составы для перорального введения днРНК и их получение подробно описаны в патенте США 6887906, публикации заявки на патент США № 20030027780 и патенте США № 6747014, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки.

Композиции и составы для парентерального, интрапаренхиматозного (в головной мозг), интратекального, внутрижелудочкового введения или введения в печень могут включать стерильные водные растворы, которые могут также содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки, такие как без ограничения усилители проницаемости, соединения-носители и другие фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать без ограничения растворы, эмульсии и составы, содержащие липосомы. Такие композиции можно получить из различных компонентов, которые включают без ограничения предварительно приготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества.

Фармацевтические препараты по настоящему изобретению, которые обычно могут представлять собой разовую лекарственную форму, можно получить обычными способами, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие способы включают в себя стадию смешивания активных ингредиентов с фармацевтически приемлемым(и) носителем(ями) и эксципиентом(ами). В общем, составы получают путем равномерного и тщательного смешивания активных ингредиентов с жидкими носителями и с тонко измельченными твердыми носителями или с теми и другими, с последующим, если это необходимо, формованием продукта.

Композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в любой из многих возможных лекарственных форм, таких как без ограничения таблетки, капсулы, гелевые капсулы, жидкие сиропы, мягкие гели, суппозитории и клизмы. Композиции также

можно приготовить в виде суспензий в водной, безводной или смешанной среде. Водные суспензии могут дополнительно содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Такая суспензия может также содержать стабилизаторы.

С. Дополнительные препараты

і. Эмульсии

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и приготовлены в виде эмульсий. Эмульсии обычно представляют собой гетерогенные системы, состоящие из одной жидкости, диспергированной в другой жидкости в виде капель, 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, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., in Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Эмульсии часто представляют собой двухфазные системы, содержащие две несмешивающиеся жидкие фазы, однородно смешанные и диспергированные одна в другой. В общем, эмульсии могут представлять собой либо эмульсии типа «вода-в-масле» (в/м), либо «масло-в-воде» (м/в). Если водная фаза является тонкодисперсной и диспергирована в виде небольших капелек в объемной масляной фазе, то получаемую в результате композицию называют эмульсией типа «вода-в-масле» (в/м). Альтернативно, если масляная фаза является тонкодисперсной и диспергирована в виде небольших капелек в объемной водной фазе, то получаемую в результате композицию называют эмульсией типа «масло-в-воде» (м/в). Помимо диспергированных фаз, эмульсии могут содержать дополнительные компоненты и активное лекарственное средство, которое может присутствовать в виде раствора в водной фазе, масляной фазе или в виде отдельной фазы. При необходимости, в эмульсии также могут присутствовать фармацевтические эксципиенты, такие как эмульгаторы, стабилизаторы, красители и антиоксиданты. Фармацевтические эмульсии могут также представлять собой многосоставные эмульсии, состоящие более чем из двух фаз, например, в случае эмульсий типа «масло - в воде - в масле» (м/в/м) и типа «вода-в масле-в воде» (в/м/в). Такие сложные составы часто имеют определенные преимущества, которыми не обладают простые бинарные эмульсии. Мультикомпонентные эмульсии, в которых отдельные масляные капельки эмульсии типа м/в заключены в небольшие водные капельки, составляют эмульсию типа в/м/в. Подобным образом, система масляных капелек, включенных в глобулы воды, стабилизированные в масляной непрерывной фазе, составляют эмульсию типа м/в/м.

Эмульсии характеризуются низкой термодинамической стабильностью или ее отсутствием. Часто дисперсная или прерывистая фаза эмульсии хорошо диспергируется во

внешней или в непрерывной фазе и поддерживается в этой форме, благодаря эмульгаторам или вязкости данного состава. Любая из фаз эмульсии может быть полутвердой или твердой, как в случае основ для мазей типа эмульсии и кремов. Другой способ стабилизации эмульсий заключается в использовании эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. В общем, эмульгаторы можно разделить на четыре группы: синтетические поверхностно-активные вещества, встречающиеся в природе эмульгаторы, абсорбционные основы и тонкодисперсные 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, in 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 поверхностно-активные агенты, находят широкое применение в формуляции эмульсионных препаратов и описаны 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, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, in 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 гидрофильности к гидрофобности поверхностно-активного вещества называется гидрофильно-липофильным балансом (HLB) и является ценным инструментом при его отнесении к той или иной группе и при отборе поверхностно-активных веществ для приготовления составов. Поверхностно-активные вещества можно разделить на разные группы на основе природы их гидрофильной группы: неионогенные, анионогенные, катионогенные 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, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

Природными эмульгаторами, используемыми в эмульсионных препаратах, являются ланолин, пчелиный воск, фосфатиды, лецитин и аравийская камедь. Абсорбционные основы обладают гидрофильными свойствами, и поэтому они могут впитывать воду и образовывать эмульсии типа в/м, которые еще сохраняют свою полутвердую консистенцию, и такими основами являются безводный ланолин и гидрофильный вазелин. Тонко измельченные твердые вещества также применяли в качестве хороших эмульгаторов, особенно в сочетании с поверхностно-активными веществами и в вязких препаратах. Указанные вещества включают полярные неорганические твердые вещества, такие как гидроксиды тяжелых металлов, ненабухающие глины, такие как бентонит, аттапульгит, гекторит, каолин, монтмориллонит, коллоидный силикат алюминия и коллоидный силикат магния-алюминия, пигменты и неполярные твердые вещества, такие как уголь или

глицерилтристеарат.

Многочисленные разнообразные неэмульгирующие вещества также включают в эмульсионные препараты, и такие вещества вносят вклад в определенные свойства эмульсий. Такими веществами являются жиры, масла, воски, жирные кислоты, жирные спирты, сложные эфиры жирных кислот, увлажнители, гидрофильные коллоиды, консерванты и антиоксиданты (Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

Гидрофильными коллоидами или гидроколлоидами являются встречающиеся в природе смолы и синтетические полимеры, такие как полисахариды (например, аравийская камедь, агар, альгиновая кислота, каррагенан, гуаровая камедь, камедь карайи и трагакантовая камедь), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлоза и карбоксипропилцеллюлоза) и синтетические полимеры (например, карбомеры, эфиры целлюлозы и карбоксивиниловые полимеры). Такие вещества диспергируются или набухают в воде с образованием коллоидных растворов, которые стабилизируют эмульсию за счет образования прочных межфазных пленок вокруг капелек дисперсионной фазы и посредством повышения вязкости внешней фазы.

Поскольку эмульсии часто содержат ряд ингредиентов, таких как углеводы, белки, стеролы и фосфатиды, которые могут хорошо поддерживать рост микробов, то часто в такие препараты включают консерванты. Широко используемыми консервантами, включаемыми в эмульсионные препараты, являются метилпарабен, пропилпарабен, четвертичные аммониевые соли, хлорид бензалкония, сложные эфиры п-гидроксibenзойной кислоты и борная кислота. В эмульсионные препараты также обычно добавляют антиоксиданты для предотвращения разложения препарата. Используемыми антиоксидантами могут быть акцепторы свободных радикалов, такие как токоферолы, алкилгаллаты, бутилированный гидроксианизол, бутилированный гидрокситолуол, или восстановители, такие как аскорбиновая кислота и метабисульфит натрия, и антиоксиданты-синергисты, такие как лимонная кислота, винная кислота и лецитин.

Применение эмульсионных составов чрескожным, пероральным и парентеральным путями и способы их получения описаны 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, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Эмульсионные составы для пероральной доставки очень широко применяли за счет простоты их приготовления, а также их эффективности с точки зрения всасывания и биологической доступности (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, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p.

245; Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Слабительные на основе минерального масла, растворимые в масле витамины и питательные препараты с высоким содержанием жира относятся к веществам, которые обычно вводят перорально в виде эмульсий «м/в».

ii. Микроэмульсии

В одном варианте осуществления настоящего изобретения РНК-агенты и нуклеиновые кислоты формулируют в виде микроэмульсий. Микроэмульсию можно определить как систему, состоящую из воды, масла и амфифильного вещества, которая представляет собой оптически изотропный и термодинамически стабильный жидкий раствор (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, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Обычно микроэмульсии представляют собой системы, которые получают сначала диспергированием масла в водном растворе поверхностно-активного вещества с последующим добавлением достаточного количества четвертого компонента, обычно спирта со средней длиной цепи, с образованием прозрачной системы. Поэтому микроэмульсии также были описаны как термодинамически стабильные изотропно чистые дисперсии из двух несмешивающихся жидкостей, которые стабилизируются межфазными пленками, состоящими из поверхностно-активных молекул (Leung and Shah, в «*Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*», Rosoff M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, p. 185-215). Микроэмульсии обычно получают объединением от трех до пяти компонентов, которые включают масло, воду, поверхностно-активное вещество, вторичное поверхностно-активное вещество и электролит. Насколько микроэмульсия представляет собой микроэмульсию типа «вода-в-масле» (в/м) или «масло-в-воде» (м/в), зависит от свойств масла и используемого поверхностно-активного вещества и от структуры и геометрической упаковки полярных «головок» и углеводородных «хвостов» поверхностно-активных молекул (Schott, in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

Были проведены всесторонние исследования фазовых диаграмм с использованием феноменологического подхода и были получены исчерпывающие сведения о том, как специалисты в данной области могут приготовить 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, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). По сравнению со обычными эмульсиями микроэмульсии обеспечивают преимущество, которое заключается в солюбилизации нерастворимых в воде лекарственных средств в препарате, состоящем из термодинамически стабильных капелек, которые образуются спонтанно.

Поверхностно-активные вещества, используемые для получения микроэмульсий, включают без ограничения ионогенные поверхностно-активные вещества, неионогенные поверхностно-активные вещества, Brij 96, простые олеиловые эфиры полиоксиэтилена, сложные эфиры полиглицерина и жирных кислот, монолаурат тетраглицерина (ML310), моноолеат тетраглицерина (MO310), моноолеат гексаглицерина (PO310), пентаолеат гексаглицерина (PO500), монокапрат декаглицерина (MCA750), моноолеат декаглицерина (MO750), секвиолеат декаглицерина (SO750), декаолеат декаглицерина (DAO750), одни или в сочетании со вспомогательными поверхностно-активными веществами. Вспомогательное поверхностно-активное вещество, обычно спирт с короткой цепью, такой как этанол, 1-пропанол и 1-бутанол, служит для повышения текучести за счет проникновения в пленку поверхностно-активного вещества с последующим образованием неупорядоченной пленки в результате образования пустого пространства между молекулами поверхностно-активного вещества. Однако микроэмульсии можно получить и без использования вспомогательных поверхностно-активных веществ, и в данной области известны самоэмульгирующиеся микроэмульсионные системы, не содержащие спирта. Водной фазой обычно могут служить без ограничения, вода, водный раствор лекарственного средства, глицерин, ПЭГ300, ПЭГ400, полиглицерины, пропиленгликоли и производные этиленгликоля. Масляной фаза может содержать, без ограничения, такие вещества, как Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, сложные эфиры жирных кислот, моно-, ди- и триглицериды со средней длиной цепи (C8-C12), полиоксиэтилированные эфиры глицерина и жирных кислот, жирные спирты, полиглицеролевые глицериды, насыщенные полиглицеролизированные C8-C10-глицериды, растительные масла и силиконовое масло.

Микроэмульсии представляют особый интерес с точки зрения солюбилизации и усиления всасывания лекарственных средств. Было высказано предположение, что микроэмульсии на основе липидов (как м/в, так и в/м) повышают биодоступность лекарственных средств, включая пептиды, при пероральном введении (см., например, патенты США № 6191105, 7063860, 7070802, 7157099; публикацию Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Преимущества микроэмульсий заключаются в повышенной солюбилизации лекарственных средств, защите лекарственного средства от ферментативного гидролиза, возможном усилении всасывания лекарственного средства, обусловленном индуцированным поверхностно-активным веществом изменением текучести и проницаемости мембраны, легкости приготовления, легкости перорального введения в виде твердых лекарственных форм, повышенной клинической эффективности и пониженной токсичности (см., например, патенты 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 спонтанно при взаимодействии их компонентов при температуре окружающей среды. Это может быть особенно предпочтительным в случае приготовления термолабильных лекарственных средств, пептидов или РНКи-агентов. Микроэмульсии также являются эффективными при

трансдермальной доставке активных компонентов в случае как косметических, так и фармацевтических применений. Предполагается, что имеющие форму микроэмульсий композиции и препараты согласно настоящему изобретению будут способствовать повышению уровня системного всасывания РНКи-агентов и нуклеиновых кислот из желудочно-кишечного тракта, а также повышению локального захвата РНКи-агентов и нуклеиновых кислот клетками.

Микроэмульсии по настоящему изобретению могут также содержать дополнительные компоненты и добавки, такие как моностеарат сорбитана (Grill 3), лабразол и усилители проницаемости, улучшающие свойства препарата и усиливающие всасывание РНКи-агентов и нуклеиновых кислот по настоящему изобретению. Усилители проницаемости, используемые в микроэмульсиях по настоящему изобретению, могут быть классифицированы как вещества, относящиеся к одной из пяти больших групп, а именно поверхностно-активным веществам, жирным кислотам, солям желчных кислот, хелатообразующим агентам и веществам, не являющимся ни хелатообразующими, ни поверхностно-активными веществами (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Каждая из таких групп обсуждалась выше.

iii. Микрочастицы

РНКи-агент по настоящему изобретению можно включить в частицу, например, микрочастицу. Микрочастицы могут быть получены распылительной сушкой, но также могут быть получены другими способами, включая лиофилизацию, выпаривание, сушку в псевдооживленном слое, вакуумную сушку или комбинацию этих методов.

iv. Усилители проницаемости

В одном варианте осуществления настоящего изобретения используют различные усилители проницаемости в целях обеспечения эффективной доставки нуклеиновых кислот, в частности РНКи-агентов, в кожу животных. Большинство лекарственных средств находится в растворе как в ионизированной, так и в неионизированной формах. Однако обычно через клеточные мембраны легко проходят только растворимые в липидах или липофильные лекарственные средства. Было обнаружено, что через клеточные мембраны могут проходить даже нелипофильные лекарственные средства, если такая пересекаемая мембрана обработана усилителем проницаемости. Усилители проницаемости, помимо стимуляции диффузии нелипофильных лекарственных средств через клеточные мембраны, также повышают проницаемость для липофильных лекарственных средств.

Усилители проницаемости можно разделить на группы, включающие соединения, относящиеся к одной из пяти больших категорий, т. е. поверхностно-активные вещества, жирные кислоты, соли желчных кислот, хелатообразующие агенты и соединения, не образующие хелатные комплексы и не являющиеся поверхностно-активными веществами (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). Каждая из вышеуказанных групп усилителей проницаемости более подробно описана ниже.

Поверхностно-активные вещества (или «поверхностно-активные агенты») представляют собой химические молекулы, которые при их растворении в водном растворе снижают поверхностное натяжение раствора или межфазное поверхностное натяжение между водным раствором и другой жидкостью, в результате чего повышается уровень всасывания РНКи-агентов через слизистую оболочку. Помимо солей желчных кислот и жирных кислот, такими усилителями проницаемости являются, 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).

Различные жирные кислоты и их производные, которые функционируют в качестве усилителей проницаемости, включают, например, олеиновую кислоту, лауриловую кислоту, каприновую кислоту (н-декановую кислоту), миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, линолевую кислоту, линоленовую кислоту, дикапрат, трикапрат, моноолеин (1-моноолеоил-рац-глицерин), дилаурин, каприловую кислоту, арахидоновую кислоту, 1-монокапрат глицерина, 1-додецилазациклогептан-2-он, ацилкарнитины, ацилхолины или их сложные C₁₋₂₀ алкиловые эфиры (например, метиловый, изопропиловый и трет-бутиловый) и моно- и диглицериды (т.е., олеат, лаурат, капрат, миристан, пальмитат, стеарат, линолеат и т.п.) (см., например, Touitou E. et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

Физиологическая роль желчи состоит в способствовании диспергированию и всасыванию 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). Различные природные соли желчных кислот и их синтетические производные функционируют в качестве усилителей проницаемости. Таким образом, термин «соли желчных кислот» включает любой из встречающихся в природе компонентов 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), дезоксхолевую кислоту (дезоксхолат натрия), глюкохолевую кислоту (глюкохолат натрия), гликохолевую кислоту (гликохолат натрия), гликодезоксхолевую кислоту (гликодезоксхолат натрия), таурохолевую кислоту (таурохолат натрия), тауродезоксхолевую кислоту (тауродезоксхолат натрия), хенодезоксхолевую кислоту (хенодезоксхолат натрия), урсодезоксхолевую кислоту (UDCA), тауро-24,25-дигидрофузидат натрия (STDHF), 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).

Хелатообразующие агенты, используемые в настоящем изобретении, можно определить как соединения, которые удаляют ионы металлов из раствора посредством образования комплексов с такими ионами, что приводит к усилению всасывания РНКи-агентов через слизистую оболочку. В отношении использования таких агентов в качестве усилителей проницаемости в настоящем изобретении, то такие хелатообразующие агенты имеют дополнительное преимущество, которое состоит в том, что они также служат в качестве ингибиторов ДНКазы, поскольку наиболее известным ДНК-нуклеазам для осуществления катализа необходим ион двухвалентного металла, и поэтому они ингибируются хелатообразующими агентами (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Подходящие хелатообразующие агенты включают, без ограничения, этилендиаминотетраацетат динатрия (EDTA), лимонную кислоту, салицилаты (например, салицилат натрия, 5-метоксисалицилат и гомованилат), N-ацильные производные коллагена, лаурет-9 и N-аминоацильные производные β -дикетонов (енаминов) (см., например, Katdare A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

В рамках настоящего изобретения, усилители проницаемости, не образующие хелатные комплексы и не являющиеся поверхностно-активными веществами, можно определить как соединения, которые проявляют незначительную активность в качестве хелатообразующих агентов или в качестве поверхностно-активных веществ, но, тем не менее, усиливают всасывание РНКи-агентов через слизистую оболочку пищеварительного тракта (см., например, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Такая группа усилителей проницаемости включает, например, ненасыщенные циклические мочевины, производные 1-алкил- и 1-алкенилазациклоалканонов (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92); и нестероидные противовоспалительные средства, такие как диклофенак-натрий, индометацин и фенилбутазон (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Агенты, которые усиливают поглощение РНКи-агентов на клеточном уровне, также могут быть добавлены к фармацевтическим и другим композициям по настоящему изобретению. Например, также известно, что катионные липиды, такие как липофектин (Junichi et al., патент США № 5705188), катионные производные глицерина и поликатионные молекулы, такие как полилизин (WO 97/30731), усиливают поглощение дцРНК клетками.

Для усиления проникновения вводимых нуклеиновых кислот можно использовать другие агенты, включая гликоли, такие как этиленгликоль и пропиленгликоль, пирролы, такие как 2-пиррол, азоны и терпены, такие как лимонен и ментон.

v. Эксципиенты

В отличие от соединения-носителя «фармацевтический носитель» или «эксципиент» представляет собой фармацевтически приемлемый растворитель, суспендирующий агент или любой другой фармакологически инертный носитель для доставки одной или нескольких нуклеиновых кислот в организм животного. Эксципиент может быть жидким или твердым, и он может быть выбран в соответствии с планируемым способом введения, так чтобы при объединении с нуклеиновой кислотой и с другими компонентами данной фармацевтической композиции он обеспечивал желаемый объем, консистенцию и т.д. Типичные фармацевтические носители включают, без ограничения, связывающие вещества (например, предварительно желатинизированный кукурузный крахмал, поливинилпирролидон или гидроксипропилметилцеллюлозу и т.д.); наполнители (например, лактозу и другие сахара, микрокристаллическую целлюлозу, пектин, желатин, сульфат кальция, этилцеллюлозу, полиакрилаты или бифосфат кальция и т.д.); скользящие вещества (например, стеарат магния, тальк, диоксид кремния, коллоидный диоксид кремния, стеариновую кислоту, стеараты металлов, гидрогенизированные растительные масла, кукурузный крахмал, полиэтиленгликоли, бензоат натрия, ацетат натрия и т.д.); дезинтегрирующие средства (например, крахмал, гликолят натрия-крахмала и т.д.); и увлажнители (например, лаурилсульфат натрия и т.д.).

Фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для непарентерального введения, которые не взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, вызывающими их разрушение, также можно использовать для приготовления 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 тому подобное.

Составы для местного введения 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. Такие растворы также могут содержать буферы, разбавители и другие подходящие добавки. Могут быть также использованы фармацевтически приемлемые органические или неорганические эксципиенты, подходящие для непарентерального введения, которые не вступают во взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, которые приводят к их разрушению.

Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты включают, без ограничения, воду, солевые растворы, спирты, полиэтиленгликоли, желатин, лактозу, амилозу, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин,

гидроксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидон и тому подобное.

vi. Другие компоненты

Композиции по изобретению могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно присутствующие в фармацевтических композициях на уровнях применения, установленных в данной области. Таким образом, композиции могут содержать, например, дополнительные совместимые фармацевтически активные вещества, например, такие как противозудные средства, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства, либо они могут содержать дополнительные вещества, применимые при физическом приготовлении различных дозированных форм композиций согласно настоящему изобретению, такие как красители, корригенты, консерванты, антиоксиданты, вещества для придания светопоглощающих свойств, загустители и стабилизаторы. Однако такие вещества при их добавлении не должны оказывать чрезмерного влияния на биологическую активность компонентов композиций согласно настоящему изобретению. Препараты можно стерилизовать и при необходимости смешивать с вспомогательными средствами, например, скользящими веществами, консервантами, стабилизаторами, увлажнителями, эмульгаторами, солями, влияющими на осмотическое давление, буферами, красителями, корригентами и/или ароматизирующими веществами и тому подобными, которые не вступают во взаимодействие с нуклеиновой кислотой(ами) в препарате, вызывающее из разрушение.

Водные суспензии могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензии, включая, например, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и/или декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные здесь, включают (а) один или более РНКи-агентов и (б) один или более агентов, которые действуют по механизму, отличному от РНК-интерференции, и которые также применимы для лечения расстройств, ассоциированных с LRRK2. Примеры таких агентов включают, не ограничиваясь этим, ингибиторы моноаминов, резерпин, противосудорожные средства, антипсихотические средства и антидепрессанты.

Токсичность и терапевтическую эффективность таких соединений можно определить стандартными фармацевтическими способами с использованием клеточных культур или экспериментальных животных, например, для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение дозы, оказывающей токсическое действие, к дозе, оказывающей терапевтическое действие, представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено в виде отношения LD₅₀/ED₅₀. Предпочтительными являются соединения, которые имеют высокие терапевтические индексы.

Данные, полученные в результате анализов на клеточных культурах или в исследованиях на животных, могут быть использованы в целях обоснования доз в определенном диапазоне для применения у человеке. Дозы композиций, охарактеризованных в изобретении, обычно лежат в диапазоне концентраций в кровотоке,

который включает значение ED_{50} , с низкой токсичностью или в отсутствие токсичности. Доза может варьировать в таком диапазоне, в зависимости от используемой лекарственной формы и от применяемого способа введения. Для любого соединения, используемого в способах, описанных здесь, терапевтически эффективную дозу сначала можно оценить в анализах на культуре клеток. В случае моделей на животных доза может быть приготовлена так, чтобы достичь циркулирующего в плазме диапазона концентраций соединения или, в соответствующем случае, полипептидного продукта последовательности-мишени (например, достижение пониженной концентрации полипептида), который включает IC_{50} (т.е., концентрацию тестируемого соединения, которая приводит к половинному от максимального подавления симптомов), которую определяют на культуре клеток. Такую информацию можно использовать для более точного определения доз для человека. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В дополнение к их введению, как обсуждалось выше, РНКи-агенты, представленные в описании, можно вводить в комбинации с другими известными агентами, эффективными в лечении патологических процессов, опосредованных экспрессией нуклеотидных повторов. В любом случае лечащий врач может регулировать дозу и временной режим введения РНКи-агента на основе результатов, наблюдаемых с использованием стандартных показателей эффективности, известных в данной области или описанных в настоящем документе.

VII. Наборы

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к наборам, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтический состав соединения миРНК, например, двухцепочечного соединения миРНК или одноцепочечного соединения миРНК (например, предшественника, например, более крупного соединения миРНК, которое может процессироваться в соединение омиРНК или ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например, двухцепочечное соединение миРНК или соединение омиРНК, или их предшественник).

Такие наборы включают один или более дцРНК-агентов и инструкции по применению, например, инструкции по введению профилактически или терапевтически эффективного количества дцРНК-агента(ов). ДцРНК-агент может находиться во флаконе или предварительно наполненном шприце. Наборы могут дополнительно содержать средства для введения дцРНК-агента (например, инъекционное устройство, такое как предварительно заполненный шприц или интратекальный насос) или средства для оценки ингибирования C3 (например, средства для оценки ингибирования мРНК LRRK2, белка LRRK2 и/или активности LRRK2). Такие средства для оценки ингибирования LRRK2 могут включать средства для получения образца от субъекта, например, такого как образец спинномозговой жидкости и/или плазмы. Наборы по изобретению могут дополнительно включать средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

В некоторых вариантах осуществления отдельные компоненты фармацевтического состава могут находиться в одном контейнере. Альтернативно, может быть желательным представить компоненты фармацевтического состава по отдельности в двух или более контейнерах, например, один контейнер для препарата миРНК- соединения и, по меньшей мере, другой контейнер для соединения-носителя. Набор может быть упакован в нескольких различных конфигураций, таких как один или несколько контейнеров в одной коробке. Различные компоненты можно комбинировать, например, в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору. Компоненты можно комбинировать в соответствии со способом, описанным здесь, например, для приготовления и введения фармацевтической композиции. В набор также может входить устройство для доставки.

VIII. Способы ингибирования экспрессии LRRK2

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования экспрессии гена LRRK2 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с РНКи-агентом, например, агентом на основе двухцепочечной РНКи, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии и/или активности LRRK2 в клетке, тем самым ингибируя экспрессию и/или активность LRRK2 в клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения экспрессия и/или активность LRRK2 ингибируется, по меньшей мере, на 30% преимущественно в клетках ЦНС (например, головного мозга). В конкретных вариантах осуществления экспрессия и/или активность LRRK2 ингибируется, по меньшей мере, на 30%. В еще одних вариантах осуществления изобретения экспрессия и/или активность LRRK2 предпочтительно ингибируется, по меньшей мере, на 30% в клетках глаза (например, глазных клетках). В некоторых других вариантах осуществления изобретения экспрессия и/или активность LRRK2 ингибируется, по меньшей мере, на 30% преимущественно в гепатоцитах.

Контактирование клетки с РНКи-агентом, например, двухцепочечным РНКи-агентом, может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Контактирование клетки *in vivo* с РНКи-агентом включает контактирование клетки или группы клеток субъекта, например человека, с РНКи-агентом. Также возможны комбинации способов контакта с клеткой *in vitro* и *in vivo*.

Контактирование с клеткой может быть прямым или опосредованным, как уже обсуждалось выше. Кроме того, контактирование с клеткой может осуществляться посредством нацеливающего лиганда, включая любой лиганд, описанный в настоящем документе или известный в данной области. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой углеводную группу, например, GalNAc-лиганд или любой другой лиганд, который направляет РНКи-агент в представляющий интерес сайт.

В рамках настоящего изобретения, термин «ингибирование» используется взаимозаменяемо с терминами «снижение», «сайленсинг», «понижающая регуляция», «подавление» и другими подобными терминами и включает любую степень ингибирования. В некоторых вариантах осуществления степень ингибирования, например,

для РНК-агента по настоящему изобретению, можно определить в условиях культивирования клеток, например, где клетки в клеточной культуре трансфектируют посредством липофектамина-опосредованной трансфекции при концентрации, близкой к таковой в клетке 10 нМ или ниже, 1 нМ или ниже и т. д. Нокдаун под действием данного РНК-агента можно определить сравнением уровней до обработки клеточной культуры с уровнями после обработки клеточной культуры, необязательно также сравнением с клетками, обработанными параллельно с помощью скремблированного или другой формы контрольного РНК-агента. Таким образом, нокдаун в клеточной культуре, состоящий, по меньшей мере, примерно 30%, может быть идентифицирован как показатель того, что произошло «ингибирование» или «снижение», «понижающая регуляция» или «подавление» и т. д. Определенно полагается, что оценка уровней мРНК-мишени или кодированного белка (и, следовательно, степени «ингибирования» и т. д., вызванного РНК-агентом по настоящему изобретению) также может быть оценена в системах *in vivo* для РНК-агентов по настоящему изобретению, в строго контролируемых условиях, как описано в данной области техники.

В рамках настоящего изобретения, выражение «ингибирование LRRK2», «ингибирование экспрессии гена LRRK2» или «ингибирование экспрессии LRRK2» включает ингибирование экспрессии любого гена LRRK2 (например, такого как ген LRRK2 мыши, ген LRRK2 крысы), ген LRRK2 обезьяны или ген LRRK2 человека), а также вариантов или мутантов гена LRRK2, которые кодируют белок LRRK2. Таким образом, ген LRRK2 может быть геном LRRK2 дикого типа, мутантным геном LRRK2 или трансгенным геном LRRK2 в контексте генетически модифицированной клетки, группы клеток или организма.

«Ингибирование экспрессии гена LRRK2» включает любой уровень ингибирования гена LRRK2, например, по меньшей мере частичное подавление экспрессии гена LRRK2, такое как ингибирование по меньшей мере примерно на 25%. В некоторых вариантах ингибирование составляет, по меньшей мере, примерно 25%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 90%, или по меньшей мере примерно 95%, или по меньшей мере примерно 99% относительно контрольного уровня. Ингибирование LRRK2 можно измерить с помощью анализа *in vitro*, например, на клетках A549 и с концентрацией РНК-агента 10 нМ, и анализом ПЦР, представленным здесь в приведенных примерах, считается входящим в объем настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления ингибирование LRRK2 можно оценить с помощью анализа *in vitro* на первичных гепатоцитах мыши. В еще одном варианте осуществления ингибирование LRRK2 можно измерить с помощью анализа *in vitro* на клеточной линии Cos-7 (вектор Dual-Luciferase psiCHECK2). В еще одном варианте ингибирование LRRK2 можно измерить с помощью анализа *in vitro* с клетками BE(2)-C. В некоторых вариантах осуществления ингибирование LRRK2 можно оценить с помощью анализа *in vitro* на клетках Neuro-2a.

Экспрессию гена LRRK2 можно определить на основе уровня любого переменного показателя, связанного с экспрессией гена LRRK2, например, уровня мРНК LRRK2 (например, смысловой мРНК, антисмысловой мРНК, общей мРНК LRRK2, мРНК, содержащей смысловые повторы LRRK2, и/или мРНК, содержащей антисмысловые повторы LRRK2) или уровня белка LRRK2 (например, общий белок LRRK2, белок LRRK2 дикого типа или белок, содержащий удлинённые повторы), или, например, уровень смысловых или антисмысловых фокусов и/или уровень белка с абберрантными дипептидными повторами.

Ингибирование можно оценить по снижению абсолютного или относительного уровня одной или нескольких из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Контрольный уровень может представлять собой контрольный уровень любого типа, который используется в данной области, например, исходный уровень до введения дозы или уровень, определённый на аналогичном субъекте, клетке или образце, которые не подвергались обработке или подвергались обработке контролем (например, таким как только контрольный буфер или контрольный неактивный агент).

Например, в некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена LRRK2 (например, по оценке смысловых или антисмысловых фокусов и/или уровня белка абберрантных дипептидных повторов) ингибируется по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% относительно контрольного уровня или ниже предела обнаружения в используемом анализе. В ещё одних вариантах осуществления способов по настоящему изобретению экспрессия гена LRRK2 (например, в случае оценки по уровню экспрессии мРНК или белка) ингибируется, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, по меньшей мере, примерно на 90% или по меньшей мере примерно на 95% относительно контрольного уровня. В некоторых вариантах осуществления способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии LRRK2, например, что показано клинически значимым исходом после лечения субъекта агентом для снижения экспрессии LRRK2.

Ингибирование экспрессии гена LRRK2 может проявляться уменьшением количества мРНК, экспрессированной первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, полученном от субъекта), где ген LRRK2 транскрибируется, и которая подвергалась или которые подвергались обработке (например, приведением в контакт клетки или клеток с РНКи-агентом по настоящему изобретению или введением РНКи-агента по настоящему изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали), таким образом, что экспрессия гена LRRK2 ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но которая не подвергалась или которые не подвергались такой обработке (контрольные клетки, не обработанные РНКи-агентом или не обработанные РНКи-агентом, нацеленным на представляющий интерес ген). Степень

ингибирования может быть выражена в терминах:

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

В еще одних вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена LRRK2 можно оценить с точки зрения уменьшения параметра, который функционально связан с экспрессией гена LRRK2, например, экспрессии белка LRRK2, фокусов, содержащих смысловую или антисмысловую цепь, и/или уровня белка с аберрантными дипептидными повторами. Сайленсинг гена LRRK2 можно определить в любой клетке, экспрессирующей LRRK2, как эндогенной, так и гетерологичной, из экспрессионной конструкции и с помощью любого анализа, известного в данной области.

Ингибирование экспрессии белка LRRK2 может проявляться снижением уровня белка LRRK2 (или функционального параметра, например, активности киназы и/или ГТФазы), который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровень белка, экспрессированного в образце, полученном от субъекта). Как объяснялось выше, для оценки подавления мРНК ингибирование уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток аналогичным образом может быть выражено в процентах от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток. В некоторых вариантах осуществления выражение «ингибирование LRRK2» может также относиться к ингибированию активности киназы и/или ГТФазы LRRK2, например, по меньшей мере частичному подавлению активности киназы LRRK2 и/или ГТФазы, такому как ингибирование на уровне не менее 25%. В некоторых вариантах осуществления ингибирование активности киназы LRRK2 и/или ГТФазы составляет, по меньшей мере, примерно 25%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 90%, или по меньшей мере, примерно 95%, или по меньшей мере, примерно 99% относительно контрольного уровня. Активность киназы LRRK2 можно определить с использованием анализа *in vitro*, например, анализа, описанного в публикации (Smith et al. (2006) *Nature Neuroscience*, 9(10):1231-3). ГТФазную активность LRRK2 можно измерить с помощью анализа *in vitro*, например, анализа, описанного в публикации (Xiong et al. (2010) *Plos Genet*, 6(4): e1000902).

Контрольная клетка или группа клеток, которую можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена LRRK2, включает клетку или группу клеток, которые еще не контактировали с РНКи-агентом по настоящему изобретению. Например, контрольная клетка или группа клеток могут быть получены от отдельного субъекта (например, человека или животного) до лечения субъекта РНКи-агентом.

Уровень мРНК LRRK2, который экспрессируется клеткой или группой клеток, можно определить с использованием любого известного в данной области метода оценки экспрессии мРНК. В одном варианте осуществления уровень экспрессии LRRK2 в образце определяют путем детектирования транскрибированного полинуклеотида или его

фрагмента, например, мРНК гена LRRK2. РНК можно экстрагировать из клеток с использованием методов выделения РНК, включая, например, экстракцию смесью кислый фенол/гуанидинизотиоцианат (RNAzol B; Biogenesis), наборы для подготовки РНК RNeasy™ (Qiagen®) или PAXgene (PreAnalytix, Швейцария). Типичные форматы анализов, использующих гибридизацию рибонуклеиновой кислоты, включают радиоактивные анализы, ОТ-ПЦР, анализ защиты от РНКаз, нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализ микрочипов. Специфичные для цепи мРНК LRRK2 можно детектировать с помощью методов ОТ-кПЦР и/или капельной цифровой ПЦР, описанных, например, в публикациях Jiang, et al. выше, Lagier-Tourenne, et al., см. выше, и Jiang, et al., см. выше. мРНК LRRK2 в крови можно определить с использованием методов, описанных в WO 2012/177906, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии LRRK2 оценивают с использованием нуклеиновокислотного зонда. В рамках настоящего изобретения, термин «зонд» относится к любой молекуле, которая способна избирательно связываться со специфической нуклеиновой кислотой или белком LRRK2 или их фрагментом. Зонды могут быть синтезированы специалистами в данной области, или их можно получить из соответствующих биологических препаратов. Зонды могут быть специально разработаны для мечения. Примеры молекул, которые можно использовать в качестве зондов, включают, не ограничиваясь этим, РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

Выделенную мРНК можно использовать в анализах гибридизации или амплификации, которые включают, помимо прочего, саузерн- или нозерн-анализы, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и наборы зондов. Один из методов определения уровней мРНК включает контактирование выделенной мРНК с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая может гибридизоваться с мРНК LRRK2. В одном варианте осуществления мРНК иммобилизуют на твердой поверхности и приводят в контакт с зондом, например, путем обработки выделенной мРНК на агарозном геле и переноса мРНК с геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. В альтернативном варианте осуществления зонд(ы) иммобилизуют на твердой поверхности, и мРНК контактирует с зондом(ами), например, в матрице генных чипов Affymetrix®. Специалисты в данной области могут легко адаптировать известные способы детектирования мРНК для использования в определении уровня мРНК LRRK2.

Альтернативный метод определения уровня экспрессии LRRK2 в образце включает процесс амплификации нуклеиновой кислоты или обратной транскриптазы (для получения кДНК), например, мРНК в образце, например, с использованием ОТ-ПЦР (экспериментальный вариант осуществления описан 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), системы Q-бета-репликазы (Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology*, 6:1197), репликации по типу катящегося круга (Lizardi et al., патент

США № 5854033) или любого другого метода амплификации нуклеиновых кислот с последующим детектированием амплифицированных молекул с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области. Эти схемы детектирования особенно полезны для детектирования молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии LRRK2 определяют с помощью количественной флуорогенной ОТ-ПЦР (т. е. системы TaqMan™), анализа люциферазы Dual-Glo® или другим признанным в данной области способом измерения экспрессии LRRK2 или уровня мРНК.

Уровень экспрессии мРНК LRRK2 можно определить с помощью мембранного блоттинга (например, используемого в анализе гибридизации, такого как нозерн, саузерн, дот и т.п.) или микролунок, пробирок для образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США № 5770722, 5874219, 5744305, 5677195 и 5445934, которые включены здесь посредством ссылки. Определение уровня экспрессии LRRK2 может также включать использование нуклеиновокислотных зондов в растворе.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии мРНК оценивают с помощью анализов разветвленной ДНК (bDNA) или ПЦР в режиме реального времени (кПЦР). Применение этого метода ПЦР описано и показано в примерах, представленных в данном документе. Такие методы также можно использовать для детектирования нуклеиновых кислот LRRK2.

Уровень экспрессии белка LRRK2 можно определить с использованием любого известного в данной области метода измерения уровней белка. Такие методы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), тонкослойную хроматографию (ТСХ), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (единичную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунный анализ (RIA), иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминесцентные анализы и т.п. Такие анализы также можно использовать для детектирования белков, указывающих на присутствие или репликацию белков LRRK2.

Уровень фокусов, содержащих смысловую или антисмысловую цепи, и уровень aberrантного белка с дипептидными повторами можно оценить с помощью методов, хорошо известных специалистам в данной области, включая, например, флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH), иммуногистохимию и иммуноанализ (см., например, Jiang, et al. выше). В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по настоящему изобретению в лечении заболевания, ассоциированного с LRRK2, оценивают по снижению уровня мРНК LRRK2 (например, по анализу образца спинномозговой жидкости и/или образца плазмы на уровень LRRK2, биопсию ткани головного мозга или иным образом).

В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению РНКи-агент вводят субъекту таким образом, что РНКи-агент доставляется в определенный участок в организме субъекта. Ингибирование экспрессии LRRK2 можно оценить с помощью анализа уровня или изменения уровня мРНК LRRK2 (например, смысловой мРНК, антисмысловой мРНК, общей мРНК LRRK2), белка LRRK2 (например, общего белка LRRK2, белка LRRK2 дикого типа), фокусов, содержащих смысловую цепь, фокусов, содержащих антисмысловую цепь, аберрантного белка с дипептидными повторами в образце, полученном из определенного участка в организме субъекта, например, клетки ЦНС, клетки глаза. В некоторых вариантах осуществления способы включают клинически значимое ингибирование экспрессии LRRK2, например, как показано клинически значимым исходом после лечения субъекта агентом для снижения экспрессии LRRK2, например, таким как стабилизация или ингибирование атрофии хвостатого ядра (например, по данным волюметрической MPT (vMRI)), стабилизация или снижение уровней легкой цепи нейрофиламента (Nfl) в образце спинномозговой жидкости субъекта, снижение мРНК мутантного LRRK2 или расщепленного мутантного белка LRRK2, например, полноразмерной мутантной мРНК или белка LRRK2 и расщепленной мутантной мРНК или белка LRRK2, и стабилизация или улучшение оценки по Единой шкале оценки LRRK2-ассоциированных заболеваний (UHDRS).

В рамках настоящего изобретения, термины «детектирование или определение уровня анализируемого вещества» означают выполнение стадий для определения наличия вещества, например, белка, РНК. В рамках настоящего изобретения, методы детектирования или определения включают детектирование или определение уровня аналита, который ниже предела обнаружения для используемого метода.

IX. Способы лечения или профилактики заболеваний, ассоциированных с LRRK2

Настоящее изобретение также относится к способам применения РНКи-агента по изобретению или композиции, содержащей РНКи-агент по изобретению, для снижения или ингибирования экспрессии LRRK2 в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с дцРНК по настоящему изобретению и поддержание клетки в течение периода времени, достаточного для деградации транскрипта мРНК гена LRRK2, тем самым ингибируя экспрессию гена LRRK2 в клетке.

Кроме того, настоящее изобретение также относится к способам применения РНКи-агента по изобретению или композиции, содержащей РНКи-агент по изобретению, для снижения уровня и/или ингибирования образования смысловых и антисмысловых фокусов в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с дцРНК по настоящему изобретению, тем самым снижая уровень смысловых и антисмысловых фокусов, содержащих LRRK2, в клетке.

Настоящее изобретение также относится к способам применения РНКи-агента по изобретению или композиции, содержащей РНКи-агент по изобретению, для снижения уровня и/или ингибирования образования аберрантного белка с дипептидными повторами

в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с дцРНК по настоящему изобретению, тем самым снижая уровень aberrантного белка с дипептидными повторами в клетке.

Снижение экспрессии генов, уровня смысловых и антисмысловых фокусов LRRK2 и/или aberrантного белка с дипептидными повторами можно оценить любыми методами, известными в данной области. Например, снижение экспрессии LRRK2 можно определить путем детектирования уровня экспрессии мРНК LRRK2 с использованием методов, известных специалистам в данной области, например, нозерн-блоттинга, ОТ-кПЦР; путем определения уровня белка LRRK2 с использованием методов, известных специалистам с обычной квалификацией в данной области, таких как вестерн-блоттинг, иммунологические методы.

В способах по настоящему изобретению клетку можно привести в контакт в условиях *in vitro* или *in vivo*, т. е. клетка может находиться внутри организма субъекта.

Клеткой, подходящей для лечения с использованием способов по настоящему изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген LRRK2. Клеткой, подходящей для использования в способах по настоящему изобретению, может быть клетка млекопитающего, например, клетка примата (такая как клетка человека или клетка примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), клетка примата (например, клетка крысы или клетка мыши). В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку ЦНС человека или клетку глаза человека.

Экспрессия LRRK2 (например, по оценке смысловой мРНК, антисмысловой мРНК, общей мРНК LRRK2, общего белка LRRK2) ингибируется в клетке примерно на 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или 50% относительно экспрессии в контрольной клетке. В некоторых вариантах осуществления экспрессия LRRK2 ингибируется по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70%, по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90% или по меньшей мере примерно на 95% относительно контрольного уровня.

Ингибирование, которое оценивается по содержанию смысловых или антисмысловых фокусов и/или уровню aberrантного белка с дипептидными повторами) ингибируется в клетке по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, предпочтительно по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже предела обнаружения анализа.

Способы *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей РНК-агент, где РНК-агент включает нуклеотидную последовательность, комплементарную по меньшей мере участку РНК-транскрипта гена LRRK2 млекопитающего, подлежащего лечению. Когда организм, подлежащий лечению, представляет собой млекопитающее, такое как человек, то композицию можно вводить любым способом, известным в данной области, включая, не ограничиваясь этим, пероральный, внутрибрюшинный или парентеральный пути, включая внутримозговой (например, внутрижелудочковый, интрапаренхиматозный и интратекальный), внутривенный,

внутримышечное, интравитреальное, подкожное, чрескожное, ингаляционное (в виде аэрозоля), назальное, ректальное и местное (включая трансбуккальное и сублингвальное) введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят внутривенной инфузией или инъекцией. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят подкожной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят интратекальной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется посредством инъекции депо. Инъекция депо может высвобождать РНКи-агент непрерывно в течение длительного периода времени. Таким образом, инъекция депо может снизить частоту введения, необходимую для получения желаемого эффекта, например, желаемого ингибирования LRRK2 или терапевтического или профилактического эффекта. Инъекция депо также может обеспечить более стабильные концентрации в сыворотке. Инъекции депо могут включать подкожные инъекции или внутримышечные инъекции. В предпочтительных вариантах осуществления инъекция депо представляет собой подкожную инъекцию.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется с помощью насоса. Насос может представлять собой внешний насос или насос, имплантированный хирургическим путем. В некоторых вариантах осуществления насос представляет собой подкожно имплантированный осмотический насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой инфузионный насос. Инфузионный насос можно использовать для внутривенных, внутримышечных, подкожных, артериальных или эпидуральных инфузий. В предпочтительных вариантах осуществления инфузионный насос представляет собой подкожный инфузионный насос. В других вариантах осуществления насос представляет собой насос, имплантированный хирургическим путем, который доставляет РНКи-агент в ЦНС.

Способ введения может быть выбран в зависимости от того, требуется ли местное или системное лечение, и в зависимости от области, предназначенной для лечения. Путь и место введения могут быть выбраны для улучшения нацеливания.

В одном аспекте настоящее изобретение также относится к способам ингибирования экспрессии гена LRRK2 у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, нацеленную на ген LRRK2 в клетке млекопитающего, тем самым ингибируя экспрессию гена LRRK2 в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценить любыми способами, известными в данной области техники, а также способами, например, ОТ-кПЦР, как здесь описано. Снижение продукции белка можно оценить любыми способами, известными в данной области техники, а также способами, например, ELISA, как здесь описано. В одном варианте осуществления образец биопсии ЦНС или образец спинномозговой жидкости (ЦСЖ) служат в качестве тканевого материала для мониторинга снижения экспрессии гена LRRK2 или белка (или, следовательно, его заместителей).

Настоящее изобретение также относится к способам лечения субъекта,

нуждающегося в этом. Способы лечения по настоящему изобретению включают введение РНКи-агента по настоящему изобретению субъекту, например, субъекту, для которого было бы полезно ингибирование экспрессии LRRK2, такому как субъект, имеющий миссенс-мутации и/или делеционные мутации в гене LRRK2, в терапевтически эффективном количестве РНКи-агент, нацеленного на ген LRRK2, или фармацевтической композиции, содержащей РНКи-агент, нацеленный на ген LRRK2.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам профилактики, лечения или подавления прогрессирования заболевания или расстройства, ассоциированного с LRRK2 (например, расстройства, ассоциированного с LRRK2), у субъекта. Способы включают введение субъекту терапевтически эффективного количества любого РНКи-агента, например дцРНК-агентов, или фармацевтической композиции, представленной здесь, тем самым обеспечивая профилактику, лечение или подавление прогрессирования заболевания или расстройства, ассоциированного с LRRK2, у субъекта.

РНКи-агент по настоящему изобретению можно вводить самостоятельно как «свободный РНКи-агент». Свободный РНКи-агент вводят в отсутствие фармацевтической композиции. Агент «голой» РНКи может находиться 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, содержащего РНКи-агент, можно корректировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

Альтернативно, РНКи-агент по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, такой как липосомальная композиция дцРНК.

Субъекты, для которых было бы полезно снижение или ингибирование экспрессии гена LRRK2, страдают заболеванием, ассоциированным с LRRK2, например, заболеванием, ассоциированным с LRRK2. Иллюстративные заболевания, ассоциированные с LRRK2, включают, не ограничиваясь этим, PD, болезнь Крона, иммунные нарушения и болезни глаз.

Настоящее изобретение также относится к способам применения РНКи-агента или его фармацевтической композиции, например, для лечения субъекта, для которого было бы полезно снижение или ингибирование экспрессии LRRK2, например, у субъекта, имеющего расстройство, ассоциированное с LRRK2, в сочетании с другими фармацевтическими препаратами или другими терапевтическими методами, например, с помощью известных фармацевтических препаратов или известных терапевтических методов, таких как, например, те, которые в настоящее время используются для лечения указанных расстройств. Например, в некоторых вариантах осуществления РНКи-агент, нацеленный на LRRK2, вводят в комбинации, например, с агентом, пригодным для лечения расстройства, ассоциированного с LRRK2, как описано по тексту в другом месте в настоящем документе или как известно в данной области. Например, дополнительные агенты, подходящие для лечения субъекта, для которого было бы полезно снизить экспрессию LRRK2, например,

субъекта, страдающего расстройством, ассоциированным с LRRK2, могут включать агенты, используемые в настоящее время для лечения симптомов заболеваний, ассоциированных с LRRK2. РНКи-агент и дополнительные терапевтические агенты можно вводить одновременно или в одной и той же комбинации, например, интратекально, или дополнительный терапевтический агент можно вводить в виде части отдельной композиции или в другое время, или другим способом, известным в данной области или описано здесь.

Примеры дополнительных терапевтических средств включают, например, ингибитор моноаминоксидазы, например, тетрабеназин (Ксеназин), дейтетрабеназин (Аустедо) и резерпин, противосудорожное средство, например, вальпроевую кислоту (Депакот, Депакин, Депакон) и клоназепам (Клонопин), антипсихотическое средство, например, рисперидон (Риспердал) и галоперидол (Галдол), и антидепрессант, например, пароксетин (Паксил).

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции, описанной здесь, таким образом, что экспрессия гена-мишени LRRK2 снижается в течение по меньшей мере одного месяца. В предпочтительных вариантах осуществления экспрессия снижается по меньшей мере в течение 2 месяцев, 3 месяцев или 6 месяцев.

Предпочтительно РНКи-агенты, пригодные для способов и композиций, представленных здесь, специфически нацелены на РНК (первичную или процессированную) гена-мишени LRRK2. Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с использованием РНКи-агентов можно приготовить и применять, как здесь описано.

Введение дцРНК в соответствии со способами по настоящему изобретению может привести к снижению тяжести, признаков, симптомов или маркеров таких заболеваний или расстройств у пациента с расстройством, ассоциированным с LRRK2. Под «снижением» в данном контексте подразумевается статистически значимое или клинически значимое снижение такого уровня. Снижение может составлять, например, по меньшей мере, примерно 5%, по меньшей мере, примерно 10%, по меньшей мере, примерно 15%, по меньшей мере, примерно 20%, по меньшей мере, примерно 25%, по меньшей мере, примерно 30%, по меньшей мере, примерно 35%, по меньшей мере, примерно 40%, по меньшей мере, примерно 45%, по меньшей мере, примерно 50%, по меньшей мере, примерно 55%, по меньшей мере, примерно 60%, по меньшей мере, примерно 65%, по меньшей мере, примерно 70%, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95% или примерно 100% относительно контрольного уровня.

Эффективность лечения или профилактики заболевания можно оценить, например, путем оценки прогрессирования заболевания, ремиссии заболевания, тяжести симптомов, уменьшения боли, повышения качества жизни, дозы лекарственного средства, необходимой для поддержания эффекта лечения, уровня маркера заболевания или любого другого измеримого параметра, подходящего для данного заболевания, которое лечится

или является объектом профилактики. Специалисты в данной области могут контролировать эффективность лечения или профилактики путем оценки любого из таких параметров или любой комбинации параметров. Например, эффективность лечения расстройства, ассоциированного с LRRK2, можно оценить, например, проведением периодического наблюдения за состоянием субъекта. Сравнение более поздних показаний с первоначальными показаниями дает врачу представление об эффективности лечения. Специалисты в данной области могут контролировать эффективность лечения или профилактики путем оценки любого из таких параметров или любой комбинации параметров. В отношении введения РНКи-агента, нацеленного на LRRK2, или его фармацевтической композиции, выражение «эффективное против» расстройства, ассоциированного с LRRK2, указывает на то, что введение клинически приемлемым образом приводит к положительному эффекту, по меньшей мере, у статистически значимой части пациентов, такому как ослабление симптомов, излечение, снижение заболеваемости, продление жизни, улучшение качества жизни или другой эффект, обычно признаваемый врачами, знакомыми с лечением расстройств, ассоциированных с LRRK2, и связанных с ними причин.

Лечебный или профилактический эффект является очевидным, когда имеет место статистически значимое улучшение одного или более параметров состояния болезни или отсутствие ухудшения или развития симптомов, что в противном случае можно было бы ожидать. Например, благоприятное изменение измеримого параметра заболевания, по меньшей мере, на 10%, предпочтительно, по меньшей мере, на 20, 30, 40, 50% или более может свидетельствовать об эффективном лечении. Эффективность данного лекарственного РНКи-агента или состава этого лекарственного средства также можно оценить с использованием экспериментальной модели на животных, используемой для данного заболевания, как известно в данной области. При использовании экспериментальной модели на животных эффективность лечения подтверждается, когда наблюдается статистически значимое снижение маркера или симптома.

Альтернативно, эффективность можно оценить по снижению тяжести заболевания, что определяется специалистом в области диагностики на основе клинически принятой шкалы оценки тяжести заболевания. Любое положительное изменение, приводящее, например, к уменьшению тяжести заболевания, измеренному с использованием соответствующей шкалы, представляет собой адекватное лечение с использованием РНКи-агента или состава РНКи-агента, как здесь описано.

В некоторых вариантах осуществления субъектам можно вводить терапевтическое количество дцРНК, такое как примерно от 0,01 мг/кг до примерно 200 мг/кг. В других вариантах осуществления субъектам можно вводить терапевтическое количество дцРНК, такое как примерно от 0,01 мг/кг до примерно 500 мг/кг. В еще одних вариантах осуществления субъектам можно вводить терапевтическое количество дцРНК примерно 500 мг/кг или выше.

РНКи-агент можно вводить интратекально, путем интравитреальной инъекции или

путем внутривенной инфузии в течение определенного периода времени на регулярной основе. В некоторых вариантах осуществления после начальной схемы лечения лечение можно проводить реже. Введение РНКи-агента может снизить уровни LRRK2, например, в клетке, ткани, крови, образце спинномозговой жидкости или другом компартменте в организме пациента. В одном варианте осуществления введение РНКи-агента может снизить уровни LRRK2, например, в клетке, ткани, крови, образце спинномозговой жидкости или другом компартменте в организме пациента, по меньшей мере, примерно на 25%, например примерно на 25%, примерно на 30%, примерно 40%, примерно на 50%, примерно на 60%, примерно на 70%, примерно на 80%, примерно на 90% или примерно на 95% относительно контрольного уровня.

Перед введением полной дозы РНКи-агента пациентам можно ввести более низкую дозу, такую как 5% инфузия, и контролировать побочные эффекты, такие как аллергическая реакция. В другом примере за пациентом можно проводить наблюдение на предмет нежелательных иммуностимулирующих эффектов, таких как повышенные уровни цитокинов (например, TNF-альфа или INF-альфа).

Альтернативно, РНКи-агент можно вводить подкожно, т.е. посредством подкожной инъекции. Для доставки субъекту желаемой, например, раз в месяц дозы РНКи-агента можно использовать одну или несколько инъекций. Инъекции можно повторять в течение определенного периода времени. Введение можно повторять на регулярной основе. В некоторых вариантах осуществления после начальной схемы лечения лечение можно проводить реже. Режим повторных доз может включать введение терапевтического количества РНКи-агента на регулярной основе, например, один раз в месяц или до одного раза в квартал, два раза в год, один раз в год. В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент вводят примерно от одного раза в месяц до примерно одного раза в квартал (т.е. примерно раз в три месяца).

Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут использоваться на практике или при тестировании РНКи-агентов и способов, представленных в изобретении, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указанные здесь, в полном объеме включены здесь посредством ссылки. В случае конфликта настоящая заявка, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения.

Информационный список последовательностей прилагается к настоящему документу и является частью представленной заявки.

Примеры

Пример 1. Дизайн, синтез, выбор и оценка РНКи-агента *in vitro*

Источник реагентов

Если источник реагента конкретно не указан в настоящем документе, то такой реагент может быть получен от любого поставщика реагентов для молекулярной биологии со стандартом качества/чистоты для применения в молекулярной биологии.

Биоинформатика

миРНК, нацеленные на транскрипт LRRK2 человека (мРНК богатой лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2) Homo sapiens, NCBI refseqID NG_011709.1; NCBI GeneID: 120892), были скринструированы с использованием пользовательских скриптов R и Python. мРНК человека с идентификационным номером NM_198578.4 имеет длину 9239 оснований.

Подробные списки немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей LRRK2 приведены в таблицах 3 и 6. Подробные списки модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей LRRK2 приведены в таблицах 4 и 7.

Следует понимать, что во всей заявке название дуплекса без десятичного знака эквивалентно названию дуплекса с десятичным знаком, и просто делается ссылка на номер партии дуплекса. Например, AD-601140 эквивалентен AD-601140.1.

Скрининг in vitro на клетках A549

i. Культивирование клеток и трансфекция:

Эпителиальные опухолевые клетки легкого человека A549 (ATCC) трансфектировали добавлением 5 мкл 1 нг/мкл, разведенного в Opti-MEM, вектора LRRK2 psiCHECK2 (Blue Heron Biotechnology), 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл липофектамина 2000 на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, номер по каталогу 11668-019) до 5 мкл дуплексов миРНК на лунку, с 4 повторами для каждого дуплекса миРНК, в 384-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляли 35 мкл среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (ThermoFisher), содержащей $\sim 5 \times 10^3$ клеток. Клетки инкубировали в течение 48 ч с последующим определением интенсивности люциферазы светлячка (контроль трансфекции) и Renilla (слияние с последовательностью-мишенью). Было проведено три эксперимента с дозами 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

ii. Культивирование клеток и трансфекция:

Первичные гепатоциты мыши трансфектировали добавлением 5 мкл 1 нг/мкл, разведенного в Opti-MEM, вектора LRRK2 psiCHECK2 (Blue Heron Biotechnology), 4,9 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл липофектамина 2000 на лунку (Invitrogen, Carlsbad, номер по каталогу 11668-019) до 5 мкл дуплексов миРНК на лунку, с 4 повторами для каждого дуплекса миРНК, в 384-луночном планшете и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляли 35 мкл среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко (ThermoFisher), содержащей $\sim 5 \times 10^3$ клеток. Клетки инкубировали в течение 48 ч с последующим измерением люциферазы светлячка (контроль трансфекции) и Renilla (слияние с последовательностью-мишенью). Было проведено три эксперимента с дозами 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

iii. Выделение общей фракции РНК с использованием набора для выделения мРНК

DYNABEADS:

РНК выделяли с использованием автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с использованием набора DYNABEAD (Invitrogen, номер по каталогу 61012). Вкратце, в планшет с клетками добавляли 70 мкл лизирующего/связывающего буфера и 10 мкл лизирующего буфера, содержащего 3 мкл магнитных частиц. Планшеты инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, затем собирали магнитные частицы и удаляли супернатант. Связанную с частицами РНК затем промывали 2 раза 150 мкл буфера для промывания А и один раз буфером для промывания В. Затем частицы промывали 150 мкл элюирующего буфера, снова собирали и удаляли супернатант.

iv. Синтез кДНК с использованием набора для обратной транскрипции кДНК высокой емкости ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, номер по каталогу 4368813):

К РНК, выделенной как описано выше, добавляли 10 мкл смеси мастер-микс, содержащей 1 мкл 10× буфера, 0,4 мкл 25× dNTP, 1 мкл 10× произвольных праймеров, 0,5 мкл обратной транскриптазы, 0,5 мкл ингибитора РНКазы и 6,6 мкл H₂O в расчете на одну реакцию. Планшеты герметично закрывали, перемешивали и инкубировали на электромагнитном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре, и затем в течение 2 ч при 37°C.

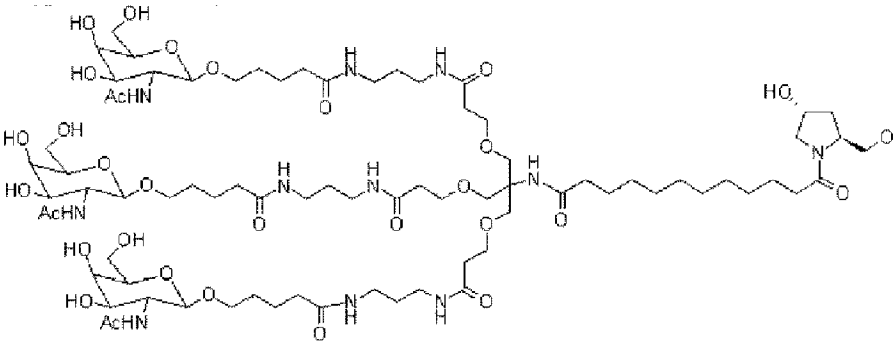
v. ПЦР в режиме реального времени:

2 мкл кДНК и 5 мкл набора смеси мастер-микс Lightcycler 480 probe (номер по каталогу Roche 04887301001) добавляли либо к 0,5 мкл зонда TaqMan GAPDH человека (4326317E), либо к 0,5 мкл зонда LRRK2 человека (Hs01115057_m1, Thermo), либо к 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan мыши (4352339E) и 0,5 мкл зонда LRRK2 мыши (Mm00481934_m1, Thermo) из расчета на лунку в 384-луночных планшетах (номер по каталогу Roche 04887301001). ПЦР в режиме реального времени проводили в системе для ПЦР в режиме реального времени LightCycler480 (Roche). Каждый дуплекс тестировали не менее двух раз, и данные нормализовали к клеткам, трансфектированным нецелевой контрольной миРНК. Для расчета относительного кратного изменения данные в реальном времени анализировали с использованием метода $\Delta\Delta C_t$ и нормализовали к данным анализа, проведенного с клетками, трансфектированным нецелевой контрольной миРНК.

Результаты скрининга дцРНК-агентов, приведенных в таблицах 3 и 4, на клетках A549 представлены в таблице 5.

Таблица 2. Аббревиатуры мономеров нуклеотидов, использованных в представлении последовательностей нуклеиновых кислот. Очевидно понятно, что эти мономеры, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями; и понятно, что когда нуклеотид содержит 2'-фтор-модификацию, то фтор заменяет гидроксильную группу в этом положении исходного нуклеотида (т.е. это 2'-дезокси-2'-фторнуклеотид).

Сокращенное обозначение	Нуклеотид(ы)
A	Аденозин-3'-фосфат
Ab	бета-L-аденозин-3'-фосфат
Abs	бета-L-аденозин-3'-фосфоротиоат
Af	2'-фтораденозин-3'-фосфат
Afs	2'-фтораденозин-3'-фосфоротиоат
As	аденозин-3'-фосфоротиоат
C	цитидин-3'-фосфат
Cb	бета-L-цитидин-3'-фосфат
Cbs	бета-L-цитидин-3'-фосфотиоат
Cf	2'-фторцитидин-3'-фосфат
Cfs	2'-фторцитидин-3'-фосфоротиоат
Cs	цитидин-3'-фосфоротиоат
G	гуанозин-3'-фосфат
Gb	бета-L-гуанозин-3'-фосфат
Gbs	бета-L-гуанозин-3'-фосфоротиоат
Gf	2'-фторгуанозин-3'-фосфат
Gfs	2'-фторгуанозин-3'-фосфоротиоат
Gs	гуанозин-3'-фосфоротиоат
T	5'-метилуридин-3'-фосфат
Tf	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфат
Tfs	2'-фтор-5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
Ts	5-метилуридин-3'-фосфоротиоат
U	уридин-3'-фосфат
Uf	2'-фторуридин-3'-фосфат
Ufs	2'-фторуридин-3'-фосфоротиоат
Us	уридин-3'-фосфоротиоат
N	любой нуклеотид, модифицированный или немодифицированный
a	2'-О-метиладенозин-3'-фосфат
as	2'-О-метиладенозин-3'-фосфоротиоат
c	2'-О-метилцитидин-3'-фосфат
cs	2'-О-метилцитидин-3'-фосфоротиоат
g	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфат
gs	2'-О-метилгуанозин-3'-фосфоротиоат

t	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфат
ts	2'-О-метил-5-метилуридин-3'-фосфототиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфототиоат
s	фосфототиоатная связь
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидододеcanoил]-4-гидроксипролинол [Нур-(GalNAc-алкил)₃] 
(Agn)	Аденозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Cgn)	Цитидингликолевая нуклеиновая кислота id (GNA)
(Ggn)	Гуанозингликолевая нуклеиновая кислота (GNA)
(Tgn)	Тимидингликолевая нуклеиновая кислота (GNA) S-изомер
P	Фосфат
VP	Винилфосфонат
dA	2'-дезоксаденозин-3'-фосфат
dAs	2'-дезоксаденозин-3'-фосфототиоат
dC	2'-дезоксцитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксцитидин-3'-фосфототиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфототиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфототиоат
dU	2'-дезоксуридин
dUs	2'-дезоксуридин-3'-фосфототиоат
(Ahd)	2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат
(Ahds)	2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфототиоат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Chds)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфототиоат

(Ghd)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфат
(Ghds)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфоротиоат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат
(Uhds)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфоротиоат

Таблица 3

Немодифицированные последовательности смысловых и антисмысловых цепей дцРНК-агентов LRRK2

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_198578.4	Последовательность антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон в NM_198578.4
AD-601140.1	CAACUCUGAAACAG UUUAACA	11	3383-3403	UGUUAACUGUUU CAGAGUUGGA	55	3381-3403
AD-599927.1	AAUUGUCAGCAUCU UUUUCUA	12	2105-2125	UAGAAAAAGAUGC UGACAAUUUG	56	2103-2125
AD-612673.1	CGUGAACAGAUGU ACGGAAA	13	2356-2376	UUUCCGUACAUCUU GUUCACGAC	57	2354-2376
AD-615420.1	UCACUCAUGGAAGA AUGGUUA	14	5413-5433	UAACCAUUCUCCA UGAGUGAGU	58	5411-5433
AD-600406.1	CAGAUAAAGACUUCU AAUUUAA	15	2603-2623	UUAAAUUAGAAGU CUUAUCUGGA	59	2601-2623
AD-601294.1	CCCUAUCAGAGAAC UUUCUUA	16	3563-3583	UAAGAAAGUUCUC UGAUAGGGAU	60	3561-3583
AD-600013.1	AAAAGGAUCAACAG UUUCUAA	17	2192-2212	UUAGAAACUGUUG AUCCUUUUGU	61	2190-2212
AD-600853.1	ACAUCACUAGACCU UUCAGCA	18	3088-3108	UGCUGAAAGGUCU AGUGAUGUAA	62	3086-3108
AD-613382.1	GGAACUUCACCAGA AUUCACA	19	3105-3125	UGUGAAUUCUGGU GAAGUCCAG	63	3103-3125

AD-600024.1	CAGUUUCUAAACCU CUGUUGA	20	2203-2223	UCAACAGAGGUUU AGAAACUGUU	64	2201-2223
AD-604701.1	AAACACAAAAUGUC UUAUUCA	21	7348-7368	UGAAUAAGACAUU UUGUGUUUUG	65	7346-7368
AD-604452.1	CAAAGAUUUUCUCC UUUUCUA	22	7097-7117	UAGAAAAGGAGAA AAUCUUUGUG	66	7095-7117
AD-603747.1	CUACUCUAUGACAU UUUGACA	23	6319-6339	UGUCAAAAUGUCA UAGAGUAGUA	67	6317-6339
AD-601616.1	CAUCUUUCUCACAA UAAACUA	24	3886-3906	UAGUUUAUUGUGA GAAAGAUGCA	68	3884-3906
AD-602766.1	UGAGAACUCUGAAA UUAUCAA	25	5190-5210	UUGAUAAUUCAG AGUUCUCACA	69	5188-5210
AD-601694.1	UACAACUUGGAACU AAGAUCA	26	3964-3984	UGAUCUUAGUCC AAGUUGUAAAC	70	3962-3984
AD-602734.1	UGGUUCCAAGCAGU UUGUCUA	27	5138-5158	UAGACAAACUGCU UGGAACCAGC	71	5136-5158
AD-599139.1	ACUAAAUAUUCUCC UUAUGUA	28	1254-1274	UACAUAAAGGAGAU UAUUUAGUGC	72	1252-1274
AD-604453.1	AAAGAUUUUCUCCU UUUCUAA	29	7098-7118	UUAGAAAAGGAGA AAAUCUUUGU	73	7096-7118
AD-616783.1	ACCAUUCAGAAACU CAUCGAA	30	7048-7068	UUCGAUGAGUUUC UGAAUGGUGA	74	7046-7068

AD-616785.1	CAUUCAGAAACUCA UCGAGAA	31	7050-7070	UUCUCGAUGAGUU UCUGAAUGGU	75	7048-7070
AD-600566.1	UUUAUUCCUGACUC UUCUAUA	32	2764-2784	UAUAGAAGAGUCA GGAAUAAAGG	76	2762-2784
AD-600852.1	UACAUCACUAGACC UUUCAGA	33	3087-3107	UCUGAAAGGUCUA GUGAUGUAAU	77	3085-3107
AD-617239.1	AAUCUUGUUUGUCU AUUUGGA	34	7526-7546	UCCAAAUAGACAA ACAAGAUUGU	78	7524-7546
AD-602466.1	GCAGUUCACUUUCU AAAUGAA	35	4849-4869	UUCAUUUAGAAAG UGAACUGCGU	79	4847-4869
AD-602848.1	CUUGAGAUUUCACC UUACAUA	36	5272-5292	UAUGUAAGGUGAA AUCUCAAGUA	80	5270-5292
AD-598424.1	CCUUGGUGUUCACC AAUUGAA	37	468-488	UUCAAUUGGUGAA CACCAAGGAC	81	466-488
AD-617233.1	AGAUACAAUCUUGU UUGUCUA	38	7520-7540	UAGACAAACAAGA UUGUAUCUCU	82	7518-7540
AD-613965.1	CUUAAGGGAACUCA UUUUUAA	39	3720-3740	UUAAAAAUGAGUU CCCUUAAGUU	83	3718-3740
AD-614239.1	GGUUUCUACAACAA CGUCUGA	40	4016-4036	UCAGACGUUGUUG UAGAAACCUU	84	4014-4036
AD-617466.1	AGUAUGCCUAUUCU UUACAAA	41	7792-7812	UUUGUAAAGAAUA GGCAUACUCU	85	7790-7812

AD-612820.1	CCUUUAUUUCCAGA UAAGUCA	42	2515-2535	UGACUUAUCUGGA AAUAAAGGAC	86	2513-2535
AD-612611.1	UUUAAUCUAUCAGG UAUGUGA	43	2286-2306	UCACAUACCUGAUA GAUUAAGA	87	2284-2306
AD-614237.1	AAGGUUUCUACAAC AACGUCA	44	4014-4034	UGACGUUGUUGUA GAAACCUUAU	88	4012-4034
AD-613966.1	UUAAGGGAACUCAU UUUUAGA	45	3721-3741	UCUAAAAAUGAGU UCCCUUAAGU	89	3719-3741
AD-612609.1	UCUUUAAUCUAUCA GGUAUGA	46	2284-2304	UCAUACCUGAUAG AUUAAAGAAG	90	2282-2304
AD-612246.1	GAUGACAAAGAAGA AUUUCUA	47	1896-1916	UAGAAAUUCUUCU UUGUCAUCA	91	1894-1916
AD-601606.1	AGAGAAACUGCAUC UUUCUCA	48	3876-3896	UGAGAAAGAUGCA GUUUCUCUAC	92	3874-3896
AD-617462.1	AAAGAGUAUGCCUA UUCUUUA	49	7788-7808	UAAAGAAUAGGCA UACUCUUUUC	93	7786-7808
AD-614236.1	UAAGGUUUCUACAA CAACGUA	50	4013-4033	UACGUUGUUGUAG AAACCUUAUG	94	4011-4033
AD-611650.1	UAUGCUGAUGCACU CUUCUUA	51	1275-1295	UAAGAAGAGUGCA UCAGCAUAGA	95	1273-1295
AD-617240.1	AUCUUGUUUGUCUA UUUGGGA	52	7527-7547	UCCCAAUAGACAA ACAAGAUUG	96	7525-7547

AD-613851.1	CUCUUUCACGUGCA UUCCAGA	53	3606-3626	UCUGGAAUGCACG UGAAAGAGUU	97	3604-3626
AD-617238.1	CAAUCUUGUUUGUC UAUUUGA	54	7525-7545	UCAAUAGACAAA CAAGAUUGUA	98	7523-7545
AD-1335323.1	CGUGAACAAGAUGU ACGGAAA	341	2356-2376	UUUCCGUACAUCUU GUUCACGAC	344	NM_025730.3_2354- 2376_C1A_as
AD-1335324.1	GGAACUUCACCAGA AUUCACA	342	3105-3125	UGUGAAUUCUGGU GAAGUCCAG	345	NM_025730.3_3103- 3125_as
AD-1335325.1	UCACUCAUGGAAGA AUGGUUA	343	5413-5433	UAACCAUUCUCCA UGAGUGAGU	346	NM_025730.3_5411- 5433_as

Таблица 4

Модифицированные последовательности смысловых и антисмысловых цепей дцРНК-агентов LRRK2

ID дууплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательности антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	мРНК последовательности- мишени 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD- 601140.1	csasacu(Chd)UfgAfAfAfcaguuuaac aL96	99	VPusGfsuuaAfaCfUfguuuCfaGfaguugsgsa	143	UCCAACUCUGAAAC AGUUUAACC	187
AD- 599927.1	asasuug(Uhd)CfaGfCfAfucuuuuuc uaL96	100	VPusAfsгааAfaAfGfaugcUfgAfcaauusug	144	CAAAUUGUCAGCA UCUUUUUCUA	188
AD- 612673.1	csgsuga(Ahd)CfaAfGfAfuguacgga aaL96	101	VPusUfsuccGfuAfCfaucuUfgUfucacgsasc	145	GUCGUGAACAAGA UGUACGGAAG	189
AD- 615420.1	uscsacu(Chd)AfuGfGfAfagaauugu uaL96	102	VPusAfsaccAfuUfCfuuccAfuGfagugasgsu	146	ACUCACUCAUGGAA GAAUGGUUU	190
AD- 600406.1	csasgau(Ahd)AfgAfCfUfucuaauuu aaL96	103	VPusUfsaaaUfuAfGfaaguCfuUfaucugsgsa	147	UCCAGAUAAAGACU UCUAAUUUAA	191
AD- 601294.1	cscscua(Uhd)CfaGfAfGfaacuuucuu aL96	104	VPusAfsagaAfaGfUfucucUfgAfuagggsasu	148	AUCCCUAUCAGAGA ACUUUCUUG	192
AD- 600013.1	asasaag(Ghd)AfuCfAfAfcaguuucua aL96	105	VPusUfsagaAfaCfUfguugAfuCfcuuusgsu	149	ACAAAAGGAUCAA CAGUUUCUAA	193
AD- 600853.1	ascsauc(Ahd)CfuAfGfAfccuuucagc aL96	106	VPusGfscugAfaAfGfgucuAfgUfgaugusasa	150	UUACAUCACUAGAC CUUUCAGCA	194
AD- 613382.1	gsgsaac(Uhd)UfcAfCfCfagaauucac aL96	107	VPusGfsugaAfuUfCfugguGfaAfguuccsasg	151	CUGGAACUUCACCA GAAUUCACU	195

AD-600024.1	csasguu(Uhd)CfuAfAfAfccucuguu gaL96	108	VPusCfsaacAfgAfGfguuuAfgAfaacugsusu	152	AACAGUUUCUAAA CCUCUGUUGC	196
AD-604701.1	asasaca(Chd)AfaAfAfUfgucuuauuc aL96	109	VPusGfsaauAfaGfAfcauuUfuGfuguuusug	153	CAAAACACAAAAU GUCUUAUUCU	197
AD-604452.1	csasaag(Ahd)UfuUfUfCfuccuuuuc uaL96	110	VPusAfsgaaAfaGfGfagaaAfaUfcuuugsug	154	CACAAAGAUUUUC UCCUUUUCUA	198
AD-603747.1	csusacu(Chd)UfaUfGfAfcauuuugac aL96	111	VPusGfsucaAfaAfUfgucaUfaGfaguagsusa	155	UACUACUCUAUGAC AUUUUGACA	199
AD-601616.1	csasucu(Uhd)UfcUfCfAfcauaaacu aL96	112	VPusAfsguuUfaUfUfgugaGfaAfagaugscsa	156	UGCAUCUUUCUCAC AAUAAACUG	200
AD-602766.1	usgsaga(Ahd)CfuCfUfGfaaaauauca aL96	113	VPusUfsgauAfaUfUfucagAfgUfucucascsa	157	UGUGAGAACUCUG AAAUUAUCAU	201
AD-601694.1	usasca(Chd)UfuGfGfAfacuaagauc aL96	114	VPusGfsaucUfuAfGfuuccAfaGfuuguasasc	158	GUUACAACUUGGA ACUAAGAUGC	202
AD-602734.1	usgsguu(Chd)CfaAfGfCfaguuuguc uaL96	115	VPusAfsgacAfaAfCfugcuUfgGfaaccasgsc	159	GCUGGUUCCAAGCA GUUUGUCUG	203
AD-599139.1	ascsuaa(Ahd)UfaAfUfCfuccuuuangu aL96	116	VPusAfscauAfaGfGfagauUfaUfuuagusgsc	160	GCACUAAAUAAUC UCCUUAUGUA	204
AD-604453.1	asasaga(Uhd)UfuUfCfUfccuuuucua aL96	117	VPusUfsagaAfaAfGfgagaAfaAfucuuusgsu	161	ACAAAGAUUUUCU CCUUUUCUAA	205
AD-616783.1	ascscau(Uhd)CfaGfAfAfacucaucga aL96	118	VPusUfscgaUfgAfGfuuuucUfgAfauggusgsa	162	UCACCAUUCAGAAA CUCAUCGAG	206

AD-616785.1	csasuuc(Ahd)GfaAfAfCfucaucgaga aL96	119	VPusUfscucGfaUfGfaguuUfcUfgaaugsgsu	163	ACCAUUCAGAAACU CAUCGAGAC	207
AD-600566.1	ususuau(Uhd)CfcUfGfAfcucuucua uaL96	120	VPusAfsuagAfaGfAfgucaGfgAfauaaasgsg	164	CCUUUAUUCUGAC UCUUCUAUG	208
AD-600852.1	usascou(Chd)AfcUfAfGfaccuuucag aL96	121	VPusCfsugaAfaGfGfucuaGfuGfauguasasu	165	AUUACAUCACUAG ACCUUUCAGC	209
AD-617239.1	asasucu(Uhd)GfuUfUfGfucuaauug gaL96	122	VPusCfscaaAfuAfGfacaoAfcAfagauusgsu	166	ACAAUCUUGUUUG UCUAUUUGGG	210
AD-602466.1	gscsagu(Uhd)CfaCfUfUfucuaaauga aL96	123	VPusUfscouUfuAfGfaaagUfgAfacugcsgsu	167	ACGCAGUUCACUUU CUAAAUGAA	211
AD-602848.1	csusuga(Ghd)AfuUfUfCfaccuuacau aL96	124	VPusAfsugaAfaGfGfugaaAfuCfucaagsusa	168	UACUUGAGAUUUC ACCUUACAUG	212
AD-598424.1	cscsuug(Ghd)UfgUfUfCfaccuuuga aL96	125	VPusUfscaaUfuGfGfugaaCfaCfcaaggsasc	169	GUCCUUGGUGUUC ACCAAUUGAU	213
AD-617233.1	asgsaua(Chd)AfaUfCfUfuguuuguc uaL96	126	VPusAfsuagAfaAfCfaagaUfuGfuaucscsu	170	AGAGAUACAAUCU UGUUUGUCUA	214
AD-613965.1	csusuaa(Ghd)GfgAfAfCfucuuuuu aaL96	127	VPusUfsaaaAfaUfGfaguuCfcCfuuaagsusu	171	AACUUAAGGGAAC UCAUUUUUAG	215
AD-614239.1	gsgsuuu(Chd)UfaCfAfAfcaacgucu gaL96	128	VPusCfsagaCfUfUfuguUfaGfaaacssusu	172	AAGGUUUCUACAA CAACGUCUGA	216
AD-617466.1	asgsuau(Ghd)CfcUfAfUfucuuuacaa aL96	129	VPusUfsugaAfaAfGfaaUaGfgCfauacscsu	173	AGAGUAUGCCUAU UCUUUACAAA	217

AD-612820.1	cscsuuu(Ahd)UfuUfCfCfagauaaguc aL96	130	VPusGfsacuUfaUfCfuggaAfaUfaaaggsasc	174	GUCCUUUAUUUCCA GAUAAGUCA	218
AD-612611.1	ususuaa(Uhd)CfuAfUfCfagguau gaL96	131	VPusCfsacaUfaCfCfugauAfgAfuuaaasgsa	175	UCUUUAAUCUAUC AGGUAUGUGA	219
AD-614237.1	asasggg(Uhd)UfcUfAfCfaacaacguc aL96	132	VPusGfsacgUfuGfUfuguaGfaAfaccuusasu	176	AUAAGGUUUCUAC ACAACGUCU	220
AD-613966.1	ususaag(Ghd)GfaAfCfUfcuuuuua gaL96	133	VPusCfsuaaAfaAfUfgaguUfcCfcuaasgsu	177	ACUUAAGGGAACU CAUUUUUAGC	221
AD-612609.1	uscsuuu(Ahd)AfuCfUfAfucagguau gaL96	134	VPusCfsauaCfcUfGfauagAfuUfaaagasasg	178	CUUCUUUAAUCUA UCAGGUAUGU	222
AD-612246.1	gsasuga(Chd)AfaAfGfAfagaauuuc uaL96	135	VPusAfsгааAfuUfCfuucuUfuGfucaucsasa	179	UGAUGACAAAGA AGAAUUUCUG	223
AD-601606.1	asgsaga(Ahd)AfcUfGfCfaucuuucuc aL96	136	VPusGfsagaAfaGfAfugcaGfuUfucucusasc	180	GUAGAGAAACUGC AUCUUUCUCA	224
AD-617462.1	asasaga(Ghd)UfaUfGfCfcuaauucuuu aL96	137	VPusAfsaagAfaUfAfggcaUfaCfucuuususc	181	GAAAAGAGUAUGC CUAUUCUUUA	225
AD-614236.1	usasagg(Uhd)UfuCfUfAfcaacaacgu aL96	138	VPusAfsccgUfgUfUfguagAfaAfccuuasusg	182	CAUAAGGUUUCUA CAACAACGUC	226
AD-611650.1	usasugc(Uhd)GfaUfGfCfacucuucu uaL96	139	VPusAfsagaAfgAfGfugcaUfcAfgcauasgsa	183	UCUAUGCUGAUGC ACUCUUCUUC	227
AD-617240.1	asuscuu(Ghd)UfuUfGfUfcuaauugg gaL96	140	VPusCfsccaAfaUfAfgacaAfaCfaagaususg	184	CAAUCUUGUUUGU CUAUUUGGGA	228

AD-613851.1	csuscuu(Uhd)CfaCfGfUfgcauuccag aL96	141	VPusCfsuggAfaUfGfcacgUfgAfaagagsusu	185	AACUCUUUCACGUG CAUUCCAGA	229
AD-617238.1	csasauc(Uhd)UfgUfUfUfgucuauuu gaL96	142	VPusCfsaaaUfaGfAfcaaaCfaAfgauugsusa	186	UACAAUCUUGUUU GUCUAUUUGG	230
AD-1335323.1	csgsuga(Ahd)CfaAfGfAfuguacggas asa	347	VPusUfsuccGfuAfCfaucuUfgUfucacgsasc	350	GUCGUGAACAAGA UGUACGGAAG	189
AD-1335324.1	gsgsaac(Uhd)UfcAfCfCfagaauucas csa	348	VPusGfsugaAfuUfCfugguGfaAfguuccsasg	351	CUGGAACUUCACCA GAAUUCACU	195
AD-1335325.1	uscsacu(Chd)AfuGfGfAfagauggus usa	349	VPusAfsaccAfuUfCfuuccAfuGfagugasgsu	352	ACUCACUCAUGGAA GAAUGGUUU	190

Таблица 5

Скрининг активности однократной дозы LRRK2 на клетках A549

	Доза 10 нМ		Доза 1 нМ		Доза 0,1 нМ	
Дуплекс	Средний % оставшейся мРНК LRRK2	SD	Средний % оставшейся мРНК LRRK2	SD	Средний % оставшейся мРНК LRRK2	SD
AD-601140.1	17,7	2,8	63,1	14,4	61,0	11,7
AD-599927.1	17,7	1,7	43,0	5,5	41,9	12,9
AD-612673.1	21,2	6,5	42,2	10,1	51,7	8,3
AD-615420.1	21,5	4,1	55,4	32,3	65,3	38,7
AD-600406.1	22,5	7,3	53,5	11,7	54,2	19,6
AD-601294.1	24,5	5,2	62,7	28,6	58,0	24,1
AD-600013.1	25,2	10,9	28,9	17,1	41,8	14,7
AD-600853.1	26,4	6,7	50,4	19,9	69,8	11,5
AD-613382.1	26,4	4,8	66,7	11,1	88,6	30,0
AD-600024.1	26,6	12,3	54,6	9,1	82,6	34,3
AD-604701.1	27,0	7,4	35,2	12,0	68,7	10,2
AD-604452.1	28,7	7,2	51,0	11,0	91,2	18,3
AD-603747.1	29,0	10,9	52,9	19,1	69,5	2,0
AD-601616.1	31,3	7,3	39,8	16,6	89,6	15,9

AD-602766.1	31,8	4,6	43,9	16,8	72,6	18,4
AD-601694.1	34,8	6,8	75,1	35,9	76,9	37,1
AD-602734.1	37,0	9,5	48,8	18,7	85,8	15,3
AD-599139.1	37,2	23,0	104,5	12,0	77,3	16,1
AD-604453.1	40,4	14,3	80,0	44,1	61,2	11,1
AD-616783.1	40,8	2,6	96,7	53,3	128,5	30,3
AD-616785.1	42,6	5,9	71,5	37,8	86,5	47,1
AD-600566.1	45,0	22,3	41,1	39,8	65,8	14,9
AD-600852.1	47,6	13,1	84,2	18,3	106,9	31,2
AD-617239.1	48,2	19,3	83,2	6,3	80,8	38,2
AD-602466.1	49,0	24,5	45,1	26,7	67,8	15,8
AD-602848.1	49,7	9,7	47,4	9,3	98,4	26,4
AD-598424.1	50,4	20,2	27,8	18,3	52,5	13,7
AD-617233.1	52,4	24,9	75,6	20,8	91,0	30,2
AD-613965.1	54,0	12,0	123,3	11,5	80,6	6,4
AD-614239.1	56,5	7,5	103,1	12,9	94,7	26,4
AD-617466.1	56,7	7,5	109,2	7,7	70,1	22,3

AD-612820.1	57,0	9,2	106,7	51,3	74,5	9,2
AD-612611.1	59,4	7,6	154,4	2,8	80,2	9,9
AD-614237.1	60,2	12,0	105,9	24,5	92,2	18,1
AD-613966.1	62,0	11,9	110,0	11,7	65,6	7,0
AD-612609.1	71,8	13,5	76,0	15,4	108,2	49,5
AD-612246.1	74,1	15,8	122,2	48,7	92,5	9,7
AD-601606.1	76,4	17,6	85,9	40,8	154,0	24,3
AD-617462.1	76,4	18,0	93,2	7,5	56,8	9,9
AD-614236.1	76,5	5,7	119,1	49,6	105,4	38,4
AD-611650.1	77,6	28,9	92,0	5,7	91,1	39,9
AD-617240.1	80,2	15,7	95,4	20,1	75,7	27,4
AD-613851.1	81,0	26,3	112,8	20,1	97,2	37,2
AD-617238.1	100,6	26,3	103,9	15,0	91,8	30,4

Таблица 6

Немодифицированные последовательности смысловых и антисмысловых цепей дцРНК-агентов, реактивных к LRRK2 человека

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Источник последовательности смысловой цепи	Последовательность антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Источник последовательности антисмысловой цепи
AD-1508169	CCUUGGUGUUCAC CAAUUGAA	231	NM_198578.4_468- 488_U21A_s	UUCAAUUGGUGAA CACCAAGGAC	253	NM_198578.4_466- 488_as
AD-1508884	ACUAAAUAUUCUC CUUAUGUA	232	NM_198578.4_1254- 1274_s	UACAUAAAGGAGAU UAUUUAGUGC	254	NM_198578.4_1252- 1274_U1A_as
AD-1509672	AAUUGUCAGCAUC UUUUUCUA	233	NM_198578.4_2105- 2125_s	UAGAAAAAGAU GC UGACAAUUUG	255	NM_198578.4_2103- 2125_U1A_as
AD-1509758	AAAAGGAUCAACA GUUUCUAA	234	NM_198578.4_2192- 2212_s	UUAGAAACUGUUG AUCCUUUUGU	256	NM_198578.4_2190- 2212_U1A_as
AD-1509769	CAGUUUCUAAACC UCUGUUGA	235	NM_198578.4_2203- 2223_C21A_s	UCAACAGAGGUUU AGAAACUGUU	257	NM_198578.4_2201- 2223_G1A_as
AD-1510151	CAGAUAAAGACUUC UAAUUUAA	236	NM_198578.4_2603- 2623_s	UUAAAUUAGAAGU CUUAUCUGGA	258	NM_198578.4_2601- 2623_U1A_as
AD-1510311	UUUAUUCUGACU CUUCUAUA	237	NM_198578.4_2764- 2784_G21A_s	UAUAGAAGAGUCA GGAAUAAAGG	259	NM_198578.4_2762- 2784_C1A_as
AD-1510597	UACAUCACUAGAC CUUUCAGA	238	NM_198578.4_3087- 3107_C21A_s	UCUGAAAGGUCUA GUGAUGUAAU	260	NM_198578.4_3085- 3107_G1A_as
AD-1510598	ACAUCACUAGACC UUUCAGCA	239	NM_198578.4_3088- 3108_s	UGCUGAAAGGUCU AGUGAUGUAA	261	NM_198578.4_3086- 3108_U1A_as

AD-1510885	CAACUCUGAAACA GUUUAACA	240	NM_198578.4_3383- 3403_C21A_s	UGUUAACUGUUU CAGAGUUGGA	262	NM_198578.4_3381- 3403_G1A_as
AD-1511039	CCCUAUCAGAGAA CUUUCUUA	241	NM_198578.4_3563- 3583_G21A_s	UAAGAAAGUUCUC UGAUAGGGAU	263	NM_198578.4_3561- 3583_C1A_as
AD-1511351	AGAGAAACUGCAU CUUUCUCA	242	NM_198578.4_3876- 3896_s	UGAGAAAGAUGCA GUUUCUCUAC	264	NM_198578.4_3874- 3896_U1A_as
AD-1511361	CAUCUUUCUCACA AUAAACUA	243	NM_198578.4_3886- 3906_G21A_s	UAGUUUAUUGUGA GAAAGAUGCA	265	NM_198578.4_3884- 3906_C1A_as
AD-1511439	UACAACUUGGAAC UAAGAUC A	244	NM_198578.4_3964- 3984_C21A_s	UGAUCUAGUCC AAGUUGUAAC	266	NM_198578.4_3962- 3984_G1A_as
AD-1512211	GCAGUUCACUUUC UAAAUGAA	245	NM_198578.4_4849- 4869_s	UUCAUUAGAAAG UGAACUGCGU	267	NM_198578.4_4847- 4869_U1A_as
AD-1512479	UGGUUCCAAGCAG UUUGUCUA	246	NM_198578.4_5138- 5158_G21A_s	UAGACAAACUGCU UGGAACCAGC	268	NM_198578.4_5136- 5158_C1A_as
AD-1512511	UGAGAACUCUGAA AUUAUCAA	247	NM_198578.4_5190- 5210_U21A_s	UUGAUAAUUCAG AGUUCUCACA	269	NM_198578.4_5188- 5210_as
AD-1512593	CUUGAGAUUUCAC CUUACAUA	248	NM_198578.4_5272- 5292_G21A_s	UAUGUAAGGUGAA AUCUCAAGUA	270	NM_198578.4_5270- 5292_C1A_as
AD-1513492	CUACUCUAUGACA UUUUGACA	249	NM_198578.4_6319- 6339_s	UGUCAAAAUGUCA UAGAGUAGUA	271	NM_198578.4_6317- 6339_U1A_as
AD-1514197	CAAAGAUUUUCUC CUUUUCUA	250	NM_198578.4_7097- 7117_s	UAGAAAAGGAGAA AAUCUUUGUG	272	NM_198578.4_7095- 7117_U1A_as

AD-1514198	AAAGAUUUUCUCC UUUUCUAA	251	NM_198578.4_7098- 7118_s	UUAGAAAAGGAGA AAAUCUUUGU	273	NM_198578.4_7096- 7118_U1A_as
AD-1514446	AAACACAAAUGU CUUAUUCA	252	NM_198578.4_7348- 7368_U21A_s	UGAAUAAGACAUU UUGUGUUUUG	274	NM_198578.4_7346- 7368_as

Таблица 7

Модифицированные последовательности смысловых и антисмысловых цепей дцРНК-агентов, реактивных к LRRK2 человека

ID дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	мРНК последовательности- мишени от 5' к 3'	SEQ ID NO:
AD-1508169	cscsuug(Ghd)UfgUfUf Cfaccaauugsasa	275	VPusUfscaaUfuGfGfugaaCfa Cfcaaggsasc	297	CCUUGGUGUUCACC AAUUGAU	319
AD-1508884	ascsuuaa(Ahd)UfaAfUf Cfuccuuaugsusa	276	VPusAfscauAfaGfGfagauUfa Ufuuagusgsc	298	ACUAAAUAUCUCC UUAUGUA	320
AD-1509672	asasuug(Uhd)CfaGfCf Afucuuuuucsusa	277	VPusAfsгааAfaAfGfaugcUfg Afcaauusug	299	AAUUGUCAGCAUC UUUUUCUA	321
AD-1509758	asasaag(Ghd)AfuCfAf Afcaguucusa	278	VPusUfsagaAfaCfUfguugAf uCfcuuuusgsu	300	AAAAGGAUCAACA GUUUCUAA	322
AD-1509769	csasguu(Uhd)CfuAfAf Afcucugusgsa	279	VPusCfsaacAfgAfGfguuuAf gAfaacugsusu	301	CAGUUUCUAAACCU CUGUUGC	323
AD-1510151	csasgau(Ahd)AfgAfCf Ufucuaauuusasa	280	VPusUfsaaaUfuAfGfaaguCfu Ufaucugsgsa	302	CAGUAAGACUUC UAAUUUAA	324
AD-1510311	ususau(Uhd)CfcUfGf Afcucuucasusa	281	VPusAfsuagAfaGfAfgucaGf gAfaaaasgsg	303	UUUAUCCUGACUC UUCUAUG	325
AD-1510597	usascau(Chd)AfcUfAf Gfaccuuucasgsa	282	VPusCfsugaAfaGfGfucuaGfu Gfauguasasu	304	UACAUCACUAGACC UUUCAGC	326
AD-1510598	ascsauc(Ahd)CfuAfGf Afcuuucagscsa	283	VPusGfscugAfaAfGfgucuAf gUfgaugusasa	305	ACAUCACUAGACCU UUCAGCA	327

AD-1510885	csasacu(Chd)UfgAfAf Afcaguuuaascsa	284	VPusGfsuuaAfaCfUfguuuCfa Gfaguugsgsa	306	CAACUCUGAAACAG UUUAACC	328
AD-1511039	cscscua(Uhd)CfaGfAf Gfaacuuucususa	285	VPusAfsagaAfaGfUfucucUfg Afuagggsasu	307	CCCUAUCAGAGAAC UUUCUUG	329
AD-1511351	asgsaga(Ahd)AfcUfGf Cfaucuuucscsa	286	VPusGfsagaAfaGfAfugcaGfu Ufucucusasc	308	AGAGAAACUGCAU CUUUCUCA	330
AD-1511361	csasucu(Uhd)UfcUfCf Afcauaaacsusa	287	VPusAfsguuUfaUfUfgugaGf aAfagaugscsa	309	CAUCUUUCACAA UAAACUG	331
AD-1511439	usascaa(Chd)UfuGfGf Afacuaagauscscsa	288	VPusGfsaucUfuAfGfuuccAfa Gfuuguasasc	310	UACAACUUGGAAC UAAGAUC	332
AD-1512211	gscsagu(Uhd)CfaCfUf Ufucuaaugsasa	289	VPusUfscauUfuAfGfaaagUfg Afacugcsgsu	311	GCAGUUCACUUUCU AAAUGAA	333
AD-1512479	usgsguu(Chd)CfaAfGf Cfaguuuugcsusa	290	VPusAfsgacAfaAfCfugcuUfg Gfaaccasgsc	312	UGGUUCCAAGCAG UUUGUCUG	334
AD-1512511	usgsaga(Ahd)CfuCfUf Gfaaaauaacsusa	291	VPusUfsgauAfaUfUfucagAf gUfucucascsa	313	UGAGAACUCUGAA AUUAUCAU	335
AD-1512593	csusuga(Ghd)AfuUfUf Cfaccuuacasusa	292	VPusAfsuguAfaGfGfugaaAf uCfucaagsusa	314	CUUGAGAUUUCACC UUACAUG	336
AD-1513492	csusacu(Chd)UfaUfGf Afcauuuugascsa	293	VPusGfsucaAfaAfUfgucaUfa Gfaguagsusa	315	CUACUCUAUGACAU UUUGACA	337
AD-1514197	csasaag(Ahd)UfuUfUf Cfuccuuuucsusa	294	VPusAfsgaaAfaGfGfagaaAfa Ufcuuugsug	316	CAAAGAUUUUCUCC UUUUCUA	338

AD-1514198	asasaga(Uhd)UfuUfCf Ufccuuuucusasa	295	VPusUfsagaAfaAfGfgagaAfa Afucuuusgsu	317	AAAGAUUUUCUCC UUUUCUAA	339
AD-1514446	asasaca(Chd)AfaAfAf Ufgucuuauuscsa	296	VPusGfsaauAfaGfAfcauuUfu Gfuguuusug	318	AAACACAAAUGU CUUAUUCU	340

Пример 2. Оценка *in vivo* на трансгенных мышах

В этом примере описаны процедуры оценки *in vivo* РНКи-агентов LRRK2 на трансгенных мышах, экспрессирующих РНК LRRK2 человека.

Способность выбранных дцРНК-агентов, разработанных и испытанных в примере 1, оценивали на их способность снижать уровень как смысловых, так и антисмысловых фокусов у мышей, экспрессирующих РНК LRRK2 человека.

Вкратце, контрольным мышам из одного помета, гетерозиготным по РНК LRRK2 человека, и мышам, гомозиготным по РНК LRRK2 человека, интратекально или подкожно вводили разовую дозу представляющих интерес дцРНК-агентов, включая дуплексы AD-601140.1, AD-599927.1, AD-612673.1, AD-615420.1, AD-600406.1, AD-601294.1, AD-600013.1, AD-600853.1, AD-613382.1, AD-600024.1, AD-604701.1, AD-604452.1, AD-603747.1, AD-601616.1, AD-602766.1, AD-601694.1, AD-602734.1, AD-599139.1, AD-604453.1, AD-616783.1, AD-616785.1, AD-600566.1, AD-600852.1, AD-617239.1, AD-602466.1, AD-602848.1, AD-598424.1, AD-617233.1, AD-613965.1, AD-614239.1, AD-617466.1, AD-612820.1, AD-612611.1, AD-614237.1, AD-613966.1, AD-612609.1, AD-612246.1, AD-601606.1, AD-617462.1, AD-614236.1, AD-611650.1, AD-617240.1, AD-613851.1 и AD-617238.1 или плацебо. Через две недели после введения животных подвергали эвтаназии, собирали образцы крови и тканей, включая кору головного мозга, спинной мозг, печень, селезенку и шейные лимфатические узлы.

Для определения влияния введения дцРНК-агентов на уровень мРНК LRRK2, уровни мРНК определяли в образцах коры и спинного мозга с использованием ОТ-кПЦР (см., например, выше и публикацию Jiang, выше).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что введение однократной дозы дцРНК-агентов ингибирует продукцию мРНК LRRK2.

Для определения влияния дцРНК-агентов на уменьшение числа и/или образования фокусов, содержащих как смысловую, так и антисмысловую цепь LRRK2, в образцах, полученных от животных, которым вводили дуплексы, использовали методы FISH, описанные в публикации Jiang, выше. Использованные зонды включали зонды, направленные против смысловой и антисмысловой цепей РНК (Exiqon, Inc.). Все стадии гибридизации выполняли в условиях отсутствия РНКазы. ОСТ-замороженные срезы головного и спинного мозга размером 15 мкм пермеабилizировали и срезы блокировали. Затем срезы гибридизовали с денатурированными зондами. После гибридизации предметные стекла промывали. Гасили автофлуоресценцию липофусцина, и ядра клеток окрашивали DAPI. Количественное определение смысловых и антисмысловых фокусов РНК в лобной коре головного мозга мыши, зубчатой извилине гиппокампа, ретроспленальной коре и молекулярном слое мозжечка проводилось исследователем слепым методом. С помощью конфокальной микроскопии при 100× увеличении делали от трех до шести случайных снимков и подсчитывали 200-400 клеток.

Полученные результаты свидетельствовали о том, что введение однократной дозы дцРНК-агентов снижали уровень фокусов, содержащих смысловые и антисмысловые цепи,

в лобной коре, зубчатой извилине гиппокампа, ретроспленальной коре и молекулярном слое мозжечка.

Влияние введения агентов на уровень аберрантного белка с дипептидными повторами, а также нагрузку и размер поли(GP) и поли(GA) также оценивали, как описано, например, в публикации Jiang, выше) у животных, которым вводили представляющие интерес дуплексы, приведенные выше.

Иммуногистохимию использовали для идентификации и оценки уровня аберрантного белка с дипептидными повторами в полушарии головного мозга и спинном мозге мышей. Вкратце, из фиксированных в формалине и залитых парафином блоков делали сагиттальные срезы полушария головного мозга или коронарные срезы спинного мозга мышей толщиной от 8 до 10 мкм и помещали на предметные стекла. После высушивания предметные стекла депарафинизировали и перед промыванием регидратировали в ксилоле и спирте. Затем предметные стекла пропаривали и блокировали. После окрашивания коммерчески доступными антителами против поли(GP), поли(GA), поли(GR), поли(PA), поли(PR), GFAP, IBA-1, CD3, F4/80 и CD45R/B220 в течение ночи, наносили вторичное антитело, конъюгированное с HRP, и пероксидазную активность проявляли с использованием субстрата. Срезы докрашивали модифицированным гематоксилином Харриса и накрывали покровным стеклом.

Для количественной оценки количества и размера включений поли(GP) и поли(GA) срезы полушарий головного мозга мышей, иммуноокрашенные на поли(GP) или поли(GA), сканировали при 40× увеличении для получения изображений с высоким разрешением. С помощью подходящего программного обеспечения подсчитывали количество включений в гиппокампе или очерченной области в ретроспленальной коре. Для измерения размера включений в этих областях, изображения делали с помощью микроскопа при 63× увеличении. Хотя каждое включение в данном поле анализировали только один раз, можно сделать несколько изображений поля, чтобы гарантировать, что анализ выполняется только для тех включений, которые находятся в фокусе. Изображения открывали и увеличивали, и инструмент для создания контура использовали для отслеживания каждого включения, чтобы определить его площадь (мкм²). Для каждой мыши рассчитывали средний размер включений в мкм² в каждой тестируемой области.

Полученные данные использовали для определения того, снижает ли введение однократной дозы дцРНК-агентов уровень аберрантного белка с дипептидными повторами, в частности уровень количества включений поли(GP) и поли(GA) и их размер.

Пример 3. Оценка *in vivo* подавления мРНК LRRK2 у мышей

В этом примере описаны процедуры оценки *in vivo* РНКи-агентов LRRK2 у мышей, экспрессирующих мышинные РНК LRRK2.

Для оценки эффективности РНКи-агентов AD-1335323.1, AD-1335324.1 и AD-1335325.1 эти агенты вводили мышам, экспрессирующим мышинный LRRK2. РНКи-агенты (в буфере, таком как aCSF) или контроль aCSF вводили самкам мышей C57BL/6 в возрасте 6-8 недель. Контрольная группа состояла из 3 животных, и каждый из трех РНКи-агентов,

AD-1335323.1, AD-1335324.1 и AD-1335325.1, вводили группе из 4 животных в каждом случае. Введение осуществляли однократной интрацеребровентрикулярной инъекцией (ICV-инъекция, которую проводили вручную), в дозе 300 мкг в 5 мкл (60 мг/мл стокового раствора). Через 30 суток после введения мышей подвергали эвтаназии. Собирали цельную кровь и выделяли плазму и хранили при -80°C до анализа. Отбирали головной мозг (правое полушарие), ткань печени, легкое (левая доля) и почку (леву), мгновенно замораживали и хранили при -80°C до обработки. Дизайн исследования приведен в таблице 8.

Таблица 8

Номер группы	Номер животного	Обработка	Доза (мкг)	Временная точка	Ткань
1	1	aCSF	-	Сутки 30	Терминальная ЦСЖ Терминальная плазма крови Замороженные образцы после перфузии (для кПЦР): правое полушарие головного мозга, легкое, почка Замороженные образцы после перфузии (для анализа белка): левое полушарие головного мозга Фиксированные образцы после перфузии (гистология): легкое, почка
	2				
	3				
2	4	AD-1335323.1	300		
	5				
	6				
	7				
3	8	AD-1335324.1			
	9				
	10				
	11				
4	12	AD-1335325.1			
	13				
	14				
	15				

Эффективность РНКи-агентов оценивали измерением мРНК LRRK2 в тканях головного мозга, печени, легком и почке через 30 суток после введения дозы. Уровни мРНК мозга LRRK2 анализировали с использованием ОТ-кПЦР. Образцы головного мозга мыши (правое полушарие) измельчали и готовили тканевые лизаты. Образец лизата головного мозга инкубировали с зондом LRRK2 (Mm00481934_m1) и ЦСЖ в качестве эндогенного контроля. Уровни мРНК определяли в образцах головного мозга с помощью ОТ-кПЦР (см., например, выше и публикацию Jiang, выше). Уровни мРНК в ткани печени анализировали с помощью ОТ-кПЦР с использованием мышинового зонда GAPDH (Applied Biosystems 4351309) в качестве контрольного зонда и зонда LRRK2 (Mm00481934_m1, опытный зонд). Аналогично, уровни мРНК в ткани почки анализировали с помощью ОТ-кПЦР с использованием мышинового зонда GAPDH в качестве контрольного зонда и зонда LRRK2 (Mm00481934_m1, опытный зонд).

Результаты приведены на фиг. 1 и 2. На фиг. 1 показано снижение мРНК LRRK2 в

головном мозге (правое полушарие) после введения одного из РНКи-агентов, AD-1335323.1, AD-1335324.1 и AD-1335325.1, мышам, экспрессирующим мышинный LRRK2. Результаты демонстрируют снижение уровней мРНК LRRK2 у животных, которым вводили дозу 300 мкг РНКи-агента, по сравнению с той же дозой aCSF, которую вводили контрольным животным. AD-1335324 был более эффективным с 86% KD, и оба AD-1335323, AD-1335325 с ~60% KD (см. таблицу 9). На фиг. 2 показано относительное снижение мРНК LRRK2 в головном мозге (правом полушарии), легком (левой доле) и почке (правой) после введения дозы 300 мкг одного из РНКи-агентов, AD-1335323.1, AD-1335324.1 и AD-1335325.1, мышам, которые экспрессируют мышинный LRRK2. Результаты свидетельствуют о том, что снижение уровней мРНК LRRK2 в системных тканях, таких как легкое (левая доля) и почка (правая), имеет ту же тенденцию в отношении KD, что и в головном мозге (правое полушарие), но в меньшей степени и с большим разбросом данных (см. таблицы 9-10). При гистологическом исследовании в легком и почках признаков токсических эффектов не наблюдали.

Таблица 9

300 нг, сутки 30 кПЦР, % оставшейся матричной РНК относительно aCSF						
Ткань	Правое полушарие		Легкое		Почка	
Обработка	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
aCSF	100,00	21,78	100,00	3,90	100,00	31,83
AD-1335323	38,12	8,11	58,65	39,75	96,50	19,98
AD-1335324	13,79	6,40	23,50	18,20	70,45	13,61
AD-1335325	42,65	10,70	86,71	2,19	104,40	17,01

Таблица 10

Значения Ct aCSF соединения-инструмента для скрининга при ICV для мышинного LRRK2

Значения aCSF Ct (нормализовано к 30 нг входной РНК)			
Ткань	GAPDH Ct	LRRK2 Ct	Delta Ct
Головной мозг	20,07	30,35	10,29
Легкое	24,16	28,54	4,38
Почка	19,82	27,27	7,45

Пример 4. Определение дозы РНКи-агентов LRRK2 in vivo на мышах

В этом примере описаны процедуры определения in vivo IC50 РНКи-агентов LRRK2 (например, AD-1335324) в ЦНС и определения самой высокой эффективной дозы в ЦНС с минимальной периферической KD.

Для оценки эффективности РНКи-агента AD-1335324.1 агент вводили мышам, экспрессирующим мышинный LRRK2. РНКи-агент AD-1335324.1 (в буфере, таком как

aCSF) или контрольный aCSF вводили самкам мышей C57BL/6 в возрасте примерно 6-8 недель. Всего было 6 групп, включая контрольную группу и 5 других групп, соответствующих 5 различным дозам AD-1335324.1 в диапазоне от 10 до 300 мкг, как показано ниже в таблице 11. В каждой группе было 4 животных. Введение проводили посредством однократной интрацеребровентрикулярной инъекции (инъекцию ICV проводили вручную), в правое полушарие головного мозга в количестве 5 мкл (60 мг/мл стокового раствора). Через 30 суток после введения мышей подвергали эвтаназии и перфузировали физиологическим раствором перед сбором тканей. Отбирали цельную кровь и плазму выделяли и хранили при -80°C до анализа. Собирали головной мозг (правое полушарие), ткань печени, легкое (левая доля) и почку (левую), мгновенно замораживали и хранили при -80°C до обработки. Образцы тканей и терминальная кровь также были собраны для последующего анализа белка. Дизайн исследования приведен в таблице 11.

Таблица 11

Группа	Обработка	Доза (мкг)	Режим введения	Инъекция	Временная точка	(n)
1	aCSF	-	Однократная доза D0	ICV ведение вручную	сутки 30	4
2	AD-1335324.1	10				
3		30				
4		60				
5		100				
6		300				

Эффективность и ответную реакцию на дозу РНКи-агента AD-1335324.1 оценивали определением процентной доли мРНК LRRK2, оставшейся в тканях головного мозга, печени, легком и почке через 30 суток после введения дозы РНКи-агента. Уровни мРНК мозга LRRK2 анализировали с использованием ОТ-кПЦР. Образцы головного мозга мыши (правое полушарие) измельчали и готовили тканевые лизаты. Образец лизата головного мозга инкубировали с зондом LRRK2 (Mm00481934_m1) и ЦСЖ в качестве эндогенного контроля. Уровни мРНК определяли в образцах головного мозга с использованием ОТ-кПЦР (см., например, выше и публикацию Jiang, выше). Уровни мРНК в ткани печени анализировали с помощью ОТ-кПЦР с использованием мышинного зонда GAPDH (Applied Biosystems 4351309) в качестве контрольного зонда и зонда LRRK2 (Mm00481934_m1, опытный зонд). Аналогично, уровни мРНК в ткани почки анализировали с помощью ОТ-кПЦР с использованием мышинного зонда GAPDH в качестве контрольного зонда и зонда LRRK2 (Mm00481934_m1, опытный зонд).

Результаты приведены на фиг. 3-4. На фиг. 3А-В показано дозозависимое снижение экспрессии мРНК LRRK2, наблюдаемое при введении AD-1335324 в головной мозг мыши, экспрессирующей LRRK2. На фиг. 3А показан график, показывающий снижение мРНК LRRK2 в головном мозге (правое полушарие) после введения репрезентативного РНКи-агента AD-1335324.1 мышам, которые экспрессируют мышинный LRRK2. Результаты

свидетельствовали о дозозависимом снижении уровней мРНК LRRK2 у животных, которым вводили РНКи-агент, по сравнению с контрольными животными. Мыши, которым вводили дозу 100 мкг AD-1335324.1, показали ~40% KD, и мыши, которым вводили дозу 300 мкг AD-1335324.1, показали ~80% KD по сравнению с соответствующими дозами аCSF, введенными контрольным животным. На фиг. 3В приведен график, показывающий значение IC50 AD-1335324.1 в ЦНС. Было установлено, что абсолютное значение IC50 составляет 108,5 мкг.

На фиг. 4 показано относительное снижение мРНК LRRK2 в головном мозге (правое полушарие), легком (левой доле) и почке (правой) после введения одной из 5 доз от 10 до 300 мкг AD-1335324.1 мышам, экспрессирующим мышиный LRRK2. Результаты демонстрируют, что снижение уровней мРНК LRRK2 в системных тканях, таких как легкое (левая доля) и почка (правая), не имело той же тенденции по KD (см. таблицу 12), которую наблюдали в головном мозге (правое полушарие). Вместо этого в легком (левой доле) наблюдали значительный разброс в значениях KD в пределах тестируемых доз без дозозависимого снижения мРНК LRRK2. В почке (правой) не наблюдали снижения мРНК LRRK2 при введении различных доз от 10 до 300 мкг AD-1335324.

Таблица 12

Ответная реакция при ICV AD-1335324 на сутки 30 в % оставшейся матричной РНК мышинной LRRK2 относительно аCSF по данным кПЦР			
Ткань	Обработка/доза	Среднее значение по группе	stdev
Головной мозг - правое полушарие	аCSF	100,00	13,26
	10 мкг	129,31	23,14
	30 мкг	91,33	19,66
	60 мкг	85,66	13,76
	100 мкг	59,47	16,11
	300 мкг	19,43	5,59
Легкое	аCSF	100,00	20,29
	10мкг	70,94	28,55
	30мкг	74,67	31,82
	60мкг	67,78	44,45
	100мкг	63,09	26,04
	300мкг	66,97	27,01
Почка	аCSF	100,00	30,52
	10мкг	98,79	26,67
	30мкг	126,40	20,43
	60мкг	116,06	40,17

	100мкг	123,84	35,86
	300мкг	128,87	26,10

Эквиваленты

Специалисты в данной области поймут или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретным вариантам осуществления и способам, описанным в настоящем документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются объемом следующей формулы изобретения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ LRRK2

SEQ ID NO:1

> NM_198578.4 мРНК богатой лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2) Homo sapiens

GGGGCCCCGCGGGGAGCGCTGGCTGCGGGCGGTGAGCTGAGCTCGCCCCCGG
GGAGCTGTGGCCGGCGCCCCCTGCCGGTTCCCTGAGCAGCGGACGTTTCATGCTGGGA
GGGCGGCGGGTTGGAAGCAGGTGCCACCATGGCTAGTGGCAGCTGTCAGGGGTGCG
AAGAGGACGAGGAACTCTGAAGAAGTTGATAGTCAGGCTGAACAATGTCCAGGA
AGGAAAACAGATAGAAACGCTGGTCCAAATCCTGGAGGATCTGCTGGTGTTCACGT
ACTCCGAGCGCGCCTCCAAGTTATTTCAAGGCAAAAATATCCATGTGCCTCTGTTGA
TCGTCTTGGACTCCTATATGAGAGTCGCGAGTGTGCAGCAGGTGGGTTGGTCACTTC
TGTGCAAATTAATAGAAGTCTGTCCAGGTACAATGCAAAGCTTAATGGGACCCAG
GATGTTGGAAATGATTGGGAAGTCCTTGGTGTTCACCAATTGATTCTTAAATGCTA
ACAGTTCATAATGCCAGTGTAACCTTGTCAAGTATTGGACTGAAGACCTTAGATCTC
CTCCTAACTTCAGGTAAAATCACCTTGCTGATATTGGATGAAGAAAGTGATATTTTC
ATGTTAATTTTTGATGCCATGCACTCATTTCCAGCCAATGATGAAGTCCAGAACTT
GGATGCAAAGCTTTACATGTGCTGTTTGAGAGAGTCTCAGAGGAGCAACTGACTGA
ATTTGTTGAGAACAAAGATTATATGATATTGTTAAGTGC GTTAACAAATTTTAAAGA
TGAAGAGGAAATTGTGCTTCATGTGCTGCATTGTTTACATTCCCTAGCGATTCCCTGC
AATAATGTGGAAGTCCTCATGAGTGGCAATGTCAGGTGTTATAATATTGTGGTGGAA
GCTATGAAAGCATTCCCTATGAGTGAAAGAATTCAAGAAGTGAGTTGCTGTTTGCTC
CATAGGCTTACATTAGGTAATTTTTTCAATATCCTGGTATTAAACGAAGTCCATGAG
TTTGTGGTGAAAGCTGTGCAGCAGTACCCAGAGAATGCAGCATTGCAGATCTCAGC
GCTCAGCTGTTTGGCCCTCCTCACTGAGACTATTTTCTTAAATCAAGATTTAGAGGA
AAAGAATGAGAATCAAGAGAATGATGATGAGGGGGAAGAAGATAAATTGTTTTGG
CTGGAAGCCTGTTACAAAGCATTAAACGTGGCATAGAAAGAACAAGCACGTGCAGGA
GGCCGCATGCTGGGCACTAAATAATCTCCTTATGTACCAAAAACAGTTTACATGAGAA
GATTGGAGATGAAGATGGCCATTTCCCAGCTCATAGGGAAGTGATGCTCTCCATGCT
GATGCATTCTTCATCAAAGGAAGTTTTCCAGGCATCTGCGAATGCATTGTCAACTCT
CTTAGAACAAAATGTTAATTTTCAAGAAAATACTGTTATCAAAAGGAATACACCTGA
ATGTTTTGGAGTTAATGCAGAAGCATATACATTCTCCTGAAGTGGCTGAAAGTGGCT
GTAAAATGCTAAATCATCTTTTTGAAGGAAGCAACACTTCCCTGGATATAATGGCAG
CAGTGGTCCCCAAAATACTAACAGTTATGAAACGTCATGAGACATCATTACCAGTGC

AGCTGGAGGCGCTTCGAGCTATTTTACATTTTATAGTGCCTGGCATGCCAGAAGAAT
CCAGGGAGGATACAGAATTTTCATCATAAGCTAAATATGGTTAAAAAACAGTGTTTC
AAGAATGATATTCACAACTGGTCCTAGCAGCTTTGAACAGGTTTCATTGGAAATCCT
GGGATTCAGAAATGTGGATTAAGTAATTTCTTCTATTGTACATTTTCCTGATGCAT
TAGAGATGTTATCCCTGGAAGGTGCTATGGATTACAGTCTTCACACACTGCAGATGT
ATCCAGATGACCAAGAAATTCAGTGTCTGGGTTTAAGTCTTATAGGATACTTGATTA
CAAAGAAGAATGTGTTTCATAGGAAGTGGACATCTGCTGGCAAAAATTCTGGTTTCCA
GCTTATACCGATTTAAGGATGTTGCTGAAATACAGACTAAAGGATTTTCAGACAATCT
TAGCAATCCTCAAATTGTCAGCATCTTTTTCTAAGCTGCTGGTGCATCATTCATTTGA
CTTAGTAATATTCCATCAAATGTCTTCCAATATCATGGAACAAAAGGATCAACAGTT
TCTAAACCTCTGTTGCAAGTGTTTTGCAAAAGTAGCTATGGATGATTACTTAAAAAA
TGTGATGCTAGAGAGAGCGTGTGATCAGAATAACAGCATCATGGTTGAATGCTTGCT
TCTATTGGGAGCAGATGCCAATCAAGCAAAGGAGGGATCTTCTTTAATTTGTCAGGT
ATGTGAGAAAGAGAGCAGTCCCAAATTGGTGGAAGTCTTACTGAATAGTGGATCTC
GTGAACAAGATGTACGAAAAGCGTTGACGATAAGCATTGGGAAAGGTGACAGCCA
GATCATCAGCTTGCTCTTAAGGAGGCTGGCCCTGGATGTGGCCAACAATAGCATTG
CCTTGGAGGATTTTGTATAGGAAAAGTTGAACCTTCTTGGCTTGGTCCTTTATTTCCA
GATAAGACTTCTAATTTAAGGAAACAAACAAATATAGCATCTACACTAGCAAGAAT
GGTGATCAGATATCAGATGAAAAGTGCTGTGGAAGAAGGAACAGCCTCAGGCAGCG
ATGGAAATTTTTCTGAAGATGTGCTGTCTAAATTTGATGAATGGACCTTTATTCCTGA
CTCTTCTATGGACAGTGTGTTTGCTCAAAGTGATGACCTGGATAGTGAAGGAAGTGA
AGGCTCATTTCTTGTGAAAAAGAAATCTAATTCAATTAGTGTAGGAGAATTTTACCG
AGATGCCGTATTACAGCGTTGCTCACCAAATTTGCAAAGACATTCCAATTCCTTGGG
GCCATTTTTGATCATGAAGATTTACTGAAGCGAAAAAGAAAAATATTATCTTCAGA
TGATTCACTCAGGTCATCAAACTTCAATCCCATATGAGGCATTCAGACAGCATTTTC
TTCTCTGGCTTCTGAGAGAGAATATATTACATCACTAGACCTTTCAGCAAATGAACT
AAGAGATATTGATGCCCTAAGCCAGAAATGCTGTATAAGTGTTTCATTTGGAGCATCT
TGAAAAGCTGGAGCTTCACCAGAATGCACTCACGAGCTTTCCACAACAGCTATGTG
AACTCTGAAGAGTTTGACACATTTGGACTTGACAGTAATAAATTTACATCATTTTC
CTTCTTATTTGTTGAAAATGAGTTGTATTGCTAATCTTGATGTCTCTCGAAATGACAT
TGGACCCTCAGTGGTTTTAGATCCTACAGTGAAATGTCCAACCTCTGAAACAGTTTAA
CCTGTCATATAACCAGCTGTCTTTTGTACCTGAGAACCTCACTGATGTGGTAGAGAA
ACTGGAGCAGCTCATTTTAGAAGGAAATAAAATATCAGGGATATGCTCCCCCTTGA
GACTGAAGGAACTGAAGATTTTAAACCTTAGTAAGAACCACATTTTCATCCCTATCAG
AGAACTTTCTTGAGGCTTGTCTTAAAGTGAGAGTTTCAGTGCCAGAATGAATTTTC
TTGCTGCTATGCCTTTCTTGCCTCCTTCTATGACAATCCTAAAATTATCTCAGAACAA
ATTTTCCTGTATTCCAGAAGCAATTTTAAATCTTCCACACTTGCGGTCTTTAGATATG
AGCAGCAATGATATTCAGTACCTACCAGGTCCCGCACACTGGAAATCTTTGAACTTA
AGGGAACCTTATTTAGCCATAATCAGATCAGCATCTTGGACTTGAGTGAAAAAGCA
TATTTATGGTCTAGAGTAGAGAACTGCATCTTCTCACAATAAACTGAAAGAGATT

CCTCCTGAGATTGGCTGTCTTGAAAATCTGACATCTCTGGATGTCAGTTACAACCTTG
GAACTAAGATCCTTTCCCAATGAAATGGGGAAATTAAGCAAAATATGGGATCTTCCT
TTGGATGAACTGCATCTTAACCTTTGATTTTAAACATATAGGATGTAAAGCCAAAGAC
ATCATAAGGTTTCTTCAACAGCGATTAAAAAAGGCTGTGCCTTATAACCGAATGAAA
CTTATGATTGTGGGAAATACTGGGAGTGGTAAAACACCTTATTGCAGCAATTAATG
AAAACCAAGAAATCAGATCTTGGAATGCAAAGTGCCACAGTTGGCATAGATGTGAA
AGACTGGCCTATCCAAATAAGAGACAAAAGAAAGAGAGATCTCGTCCTAAATGTGT
GGGATTTTGCAGGTCGTGAGGAATTCTATAGTACTCATCCCCATTTTATGACGCAGC
GAGCATTGTACCTTGCTGTCTATGACCTCAGCAAGGGACAGGCTGAAGTTGATGCCA
TGAAGCCTTGGCTCTTCAATATAAAGGCTCGCGCTTCTTCTTCCCCTGTGATTCTCGT
TGGCACACATTTGGATGTTTCTGATGAGAAGCAACGCAAAGCCTGCATGAGTAAAA
TCACCAAGGAACTCCTGAATAAGCGAGGGTTCCTGCCATACGAGATTACCACTTTG
TGAATGCCACCGAGGAATCTGATGCTTTGGCAAACTTCGGAAAACCATCATAAAC
GAGAGCCTTAATTTCAAGATCCGAGATCAGCTTGTTGTTGGACAGCTGATTCCAGAC
TGCTATGTAGAACTTGAAAAAATCATTTTATCGGAGCGTAAAAATGTGCCAATTGAA
TTTCCCGTAATTGACCGGAAACGATTATTACAACCTAGTGAGAGAAAATCAGCTGCA
GTTAGATGAAAATGAGCTTCCTCACGCAGTTCACCTTTCTAAATGAATCAGGAGTCCT
TCTTCATTTTCAAGACCCAGCACTGCAGTTAAGTGACTTGTACTTTGTGGAACCCAA
GTGGCTTTGTAAAATCATGGCACAGATTTTGACAGTGAAAGTGGAAGGTTGTCCAA
AACACCCTAAGGGCATTATTTTCGCGTAGAGATGTGGAAAAATTTCTTTCAAAAAAA
AGGAAATTTCCAAAGAACTACATGTCACAGTATTTTAAGCTCCTAGAAAAATTCCAG
ATTGCTTTGCCAATAGGAGAAGAATATTTGCTGGTTCCAAGCAGTTTGTCTGACCAC
AGGCCTGTGATAGAGCTTCCCCATTGTGAGAACTCTGAAATTATCATCCGACTATAT
GAAATGCCTTATTTTCCAATGGGATTTTGGTCAAGATTAATCAATCGATTACTTGAG
ATTTACCTTACATGCTTTCAGGGAGAGAACGAGCACTTCGCCCAAACAGAATGTAT
TGGCGACAAGGCATTTACTTAAATTGGTCTCCTGAAGCTTATTGTCTGGTAGGATCT
GAAGTCTTAGACAATCATCCAGAGAGTTTCTTAAAAATTACAGTTCCTTCTTGTAGA
AAAGGCTGTATTCTTTTGGGCCAAGTTGTGGACCACATTGATTCTCTCATGGAAGAA
TGGTTTCCTGGGTTGCTGGAGATTGATATTTGTGGTGAAGGAGAACTCTGTTGAAG
AAATGGGCATTATATAGTTTTAATGATGGTGAAGAACATCAAAAAATCTTACTTGAT
GACTTGATGAAGAAAGCAGAGGAAGGAGATCTCTTAGTAAATCCAGATCAACCAAG
GCTCACCATTCCAATATCTCAGATTGCCCCTGACTTGATTTTGGCTGACCTGCCTAGA
AATATTATGTTGAATAATGATGAGTTGGAATTTGAACAAGCTCCAGAGTTTCTCCTA
GGTGATGGCAGTTTTTGGATCAGTTTACCGAGCAGCCTATGAAGGAGAAGAAGTGGC
TGTGAAGATTTTTAATAAACATACATCACTCAGGCTGTAAAGACAAGAGCTTGTGGT
GCTTTGCCACCTCCACCACCCAGTTTGATATCTTTGCTGGCAGCTGGGATTCGTCCC
CGGATGTTGGTGATGGAGTTAGCCTCCAAGGGTTCCTTGGATCGCCTGCTTCAGCAG
GACAAAGCCAGCCTCACTAGAACCCTACAGCACAGGATTGCACTCCACGTAGCTGA
TGGTTTGAGATACCTCCACTCAGCCATGATTATATACCGAGACCTGAAACCCCAAA
TGTGCTGCTTTTCACACTGTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTAC

GGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACATCAGAGGGGCACACCAGG
 GTTTCGTGCACCTGAAGTTGCCAGAGGAAATGTCATTTATAACCAACAGGCTGATGT
 TTATTCATTTGGTTTACTACTCTATGACATTTTGGACAACTGGAGGTAGAATAGTAGA
 GGGTTTGAAGTTTCCAAATGAGTTTGATGAATTAGAAATACAAGGAAAATTACCTG
 ATCCAGTTAAAGAATATGGTTGTGCCCCATGGCCTATGGTTGAGAAATTAATTAAAC
 AGTGTGTTGAAAGAAAATCCTCAAGAAAGGCCTACTTCTGCCCAGGTCTTTGACATTT
 TGAATTCAGCTGAATTAGTCTGTCTGACGAGACGCATTTTATTACCTAAAAACGTAA
 TTGTTGAATGCATGGTTGCTACACATCACAACAGCAGGAATGCAAGCATTGCGCTGG
 GCTGTGGGCACACCGACAGAGGACAGCTCTCATTCTTGAAGTAAATACTGAAGGAT
 ACACTTCTGAGGAAGTTGCTGATAGTAGAATATTGTGCTTAGCCTTGGTGCATCTTC
 CTGTTGAAAAGGAAAGCTGGATTGTGTCTGGGACACAGTCTGGTACTCTCCTGGTCA
 TCAATACCGAAGATGGGAAAAAGAGACATACCCTAGAAAAGATGACTGATTCTGTC
 ACTTGTTTGTATTGCAATTCCTTTTCCAAGCAAAGCAAACAAAAAAATTTTCTTTTGG
 TTGGAACCGCTGATGGCAAGTTAGCAATTTTTGAAGATAAGACTGTAAAGCTTAAAG
 GAGCTGCTCCTTTGAAGATACTAAATATAGGAAATGTCAGTACTCCATTGATGTGTT
 TGAGTGAATCCACAAATTCAACGGAAAGAAATGTAATGTGGGGAGGATGTGGCACA
 AAGATTTTCTCCTTTTCTAATGATTTTACCATTTCAGAACTCATTGAGACAAGAACA
 AGCCAACTGTTTTCTTATGCAGCTTTCAGTGATTCCAACATCATAACAGTGGTGGTA
 GACACTGCTCTCTATATTGCTAAGCAAAATAGCCCTGTTGTGGAAGTGTGGGATAAG
 AAAACTGAAAACTCTGTGGACTAATAGACTGCGTGCACCTTTTTAAGGGAGGTAAT
 GGTAAGAAAGAAAACAAGGAATCAAAACACAAAATGTCTTATTCTGGGAGAGTGAAA
 ACCCTCTGCCTTCAGAAGAACTGCTCTTTGGATAGGAACTGGAGGAGGCCATATT
 TTAATCCTGGATCTTTCACTCGTCGACTTATACGTGTAATTTACAACCTTTTGTAAAT
 CGGTCAGAGTCATGATGACAGCACAGCTAGGAAGCCTTAAAAATGTCATGCTGGTA
 TTGGGCTACAACCGGAAAAATACTGAAGGTACACAAAAGCAGAAAGAGATACAAT
 CTTGCTTGACCGTTTGGGACATCAATCTTCCACATGAAGTGCAAAATTTAGAAAAAC
 ACATTGAAGTGAGAAAAGAATTAGCTGAAAAAATGAGACGAACATCTGTTGAGTAA
 GAGAGAAATAGGAATTGTCTTTGGATAGGAAAATTATTCTCTCCTCTTGTAATATT
 TATTTTAAAAATGTTACATGGAAAGGGTACTCACATTTTTTTGAAATAGCTCGTGTG
 TATGAAGGAATGTTATTATTTTAAATTTAAATATATGTAAAAATACTTACCAGTAAA
 TGTGTATTTTAAAGAACTATTTAAAAACACAATGTTATATTTCTTATAAATACCAGTTA
 CTTTCGTTCAATTAATGAAAATAAATCTGTGAAGTACCTAATTTAAGTACTCAT
 ACTAAAATTTATAAGGCCGATAATTTTTTTGTTTTCTTGTCTGTAATGGAGGTAACTT
 TATTTTAAATTCTGTGCTTAAGACAGGACTATTGCTTGTGCGATTTTTCTAGAAATCTG
 CACGGTATAATGAAAATATTAAGACAGTTTCCCATGTAATGTATTCCTTCTTAGATT
 GCATCGAAATGCACTATCATATATGCTTGTAATATTCAAATGAATTTGCACTAATA
 AAGTCCTTTGTTGGTATGTGAATTCTCTTTGTTGCTGTTGCAAACAGTGCATCTTACA
 CAACTTCACTCAATTCAAAAGAAAACCTCATTAAAAGTACTAATGAAAAAACATGA
 CATACTGTCAAAGTCCTCATATCTAGGAAAGACACAGAACTCTCTTTGTACAGAA
 ACTCTCTGTGTCTTTCCTAGACATAATAGAGTTGTTTTTCAACTCTATGTTTGAATGT

GGATACCCTGAATTTTGTATAATTAGTGTAATAACAGTGTTTCAGTCCTTCAAGTGAT
 ATTTTATTTTTTTTATTCATACCACTAGCTACTTGTTTTCTAATCTGCTTCATTCTAAT
 GCTTATATTCATCTTTTCCCTAAATTTGTGATGCTGCAGATCCTACATCATTGAGATA
 GAAACCTTTTTTTTTTTTCAGAATTATAGAATTCCACAGCTCCTACCAAGACCATGAG
 GATAAATATCTAACACTTTTCAGTTGCTGAAGGAGAAAGGAGCTTTAGTTATGATGG
 AAAAAATATCTGCCACCCTAGGCTTCCAAATTATACTTAAATTGTTTACATAGCTT
 ACCACAATAGGAGTATCAGGGCCAAATACCTATGTAATAATTTGAGGTCATTTCTGC
 TTTAGGAAAAGTACTTTCGGTAAATTTCTTTGGCCCTGACCAGTATTCATTATTTGAGA
 TAATTCCTGTGATAGGACAACCTAGTACATTTAATATTCTCAGAACTTATGGCATT
 ACTATGTGAAAACCTTTAAATTTATTTATATTAAGGGTAATCAAATTCTTAAAGATGA
 AAGATTTTCTGTATTTTAAAGGAAGCTATGCTTTAACTTGTTATGTAATTAACAAAA
 AAATCATATATAATAGAGCTCTTTGTTCCAGTGTTATCTCTTTCATTGTTACTTTGTA
 TTTGCAATTTTTTTTACCAAAGACAAATTAATAAAATGAATACCATATTTAAATGGA
 ATAATAAAGGTTTTTTTAAAAACTTTAAA

SEQ ID NO:2

Обратный комплемент SEQ ID NO:1

TTTAAAGTTTTTAAAAAACCTTTATTATTCCATTTAAATATGGTATTCATTTTT
 TTAATTTGTCTTTGGTAAAAAAAATTGCAAATACAAAGTAACAATGAAAGAGATAA
 CACTGGAACAAAGAGCTCTATTATATATGATTTTTTTTGTTAATTACATAACAAGTTA
 AAGCATAGCTTCCTTTAAAATACAGAAAATCTTTCATCTTTAAGAATTTGATTACCCT
 TAATATAAATAAATTTAAAGTTTTTCACATAGTAAAATGCCATAAGTTCTGAGAATAT
 TAAATGTACTAGTTGTCCTATCACAGGGAATTATCTGAAATAATGAATACTGGTCAG
 GGCCAAAGAATTTACCGAAAGTACTTTTCCTAAAGCAGAAATGACCTCAAATTATTA
 CATAGGTATTTGGCCCTGATACTCCTATTGTGGTAAGCTATGTAAACAATTTAAGTA
 TAATTTGGAAGCCTAGGGTGTCAGATATTTTTATCCATCATAACTAAAGCTCCTTTCT
 CCTTCAGCAACTGAAAAGTGTTAGATATTTATCCTCATGGTCTTGGTAGGAGCTGTG
 GAATTCTATAATTCTGAAAAAAAAAAGGTTTCTATCTGAATGATGTAGGATCTGCA
 GCATCACAATTTAGGGAAAAGATGAATATAAGCATTAGAATGAAGCAGATTAGAA
 AACAAGTAGCTAGTGGTATGAATAAAAAAATAAAAAATATCACTTGAAGGACTGAAC
 ACTGTATTTACACTAATTATACAAAATTCAGGGTATCCACATTCAAACATAGAGTTG
 AAAACAACCTCTATTATGTCTAGGAAAGACACAGAGAGTTTCTGTGACAAAGAGAG
 TTTCTGTGTCTTTCCTAGATATGAGGACTTTGACAGTATGTCATGTTTTTTCATTAGT
 ACTTTTAATGGAGTTTTCTTTTGAATTGAGTGAAGTTGTGTAAGATGCACTGTTTGCA
 ACAGCAACAAAGAGAATTCACATACCAACAAAGGACTTTATTAGTGCAAATTCATT
 TGAATATTTACAAGCATATATGATAGTGCATTTTCGATGCAATCTAAGAAGGAATACA
 TTACATGGGAACTGTCTTAATATTTTCATTATACCGTGCAGATTTCTAGAAAAATC
 GACAAGCAATAGTCCTGTCTTAAGCACAGAATTTAAAATAAAGTTTACCTCCATTAC
 AGACAAGAAAACAAAAAATTATCGGCCTTATAAATTTTAGTATGAGTACTTAAATTA
 GGTACTTCACAGATTTATTTTCATTAATTAATGAACGAAAGTAACTGGTATTTATAA
 GAAATATAACATTGTGTTTTAAATAGTTCTTTAAAATACACATTTACTGGTAAGTATT

TTTACATATATTTAAATTAAAAATAATAACATTCCTTCATACACACGAGCTATTTCA
AAAAATGTGAGTACCCTTTCCATGTGAACATTTTTTAAATAAATATTTACAAGAGGA
GAGAATAATTTTCCTATCCAAAGACAATTCCTATTTCTCTCTTACTCAACAGATGTTCT
GTCTCATTTTTTTCAGCTAATTCTTTTCTCACTTCAATGTGTTTTTCTAAATTTTGCAC
TCATGTGGAAGATTGATGTCCCAAACGGTCAAGCAAGATTGTATCTCTTTCTGCTTTT
GTGTACCTTCAGTATTTTTCCGGTTGTAGCCCAATACCAGCATGACATTTTTTAAGGCT
TCCTAGCTGTGCTGTCATCATGACTCTGACCGAATTACAAAAGTTGTAAATTACACG
TATAAGTCGACGAGTTGAAAGATCCAGGAGTAAAATATGGCCTCCTCCAGTTCCTAT
CCAAAGAGCAGTGTTCTTCTGAAGGCAGAGGGTTTTCACTCTCCAGAATAAGACAT
TTTGTGTTTTGATTCCCTTGTTTTCTTTTACCATTACCTCCCTTAAAAAGTGCACGCAGT
CTATTAGTCCACAGAGTTTTTTCAGTTTTCTTATCCCACACTTCCACAACAGGGCTATT
TTGCTTAGCAATATAGAGAGCAGTGTCTACCACCACTGTTATGATGTTGGAATCACT
GAAAGCTGCATAAGAAAACAGTTGGCTTGTTCTTGTCTCAATGAGTTTTCTGAATGGT
GAAATCATTAGAAAAGGAGAAAATCTTTGTGCCACATCCTCCCCACATTACATTTCT
TTCCGTTGAATTTGTGGATTCACTCAAACACATCAATGGAGTACTGACATTTCTCTAT
ATTTAGTATCTTCAAAGGAGCAGCTCCTTTAAGCTTAACAGTCTTATCTTCAAAAATT
GCTAACTTGCCATCAGCGGTTCCAACCAAAAAGAAAATTTTTTTGTTTGCTTTGCTTGG
AAAAGGAATTGCAATACAAACAAGTGACAGAATCAGTCATCTTTTCTAGGGTATGT
CTCTTTTTTCCCATCTTCGGTATTGATGACCAGGAGAGTACCAGACTGTGTCCCAGAC
ACAATCCAGCTTTCCTTTTCAACAGGAAGATGCACCAAGGCTAAGCACAATATTCTA
CTATCAGCAACTTCCTCAGAAGTGTATCCTTCAGTATTTAAGTCAAGAAATGAGAGC
TGTCCTCTGTTCGGTGTGCCACAGCCCAGCCAAATGCTTGCATTCCTGCTGTTGTGAT
GTGTAGCAACCATGCATTCAACAATTACGTTTTTAGGTAATAAAATGCGTCTCGTCA
GACAGACTAATTCAGCTGAATTCAAAATGTCAAAGACCTGGGCAGAAGTAGGCCTT
TCTTGAGGATTTTCTTTCAAACACTGTTTAATTAATTTCTCAACCATAGGCCATGGGG
CACAACCATATTCTTTAACTGGATCAGGTAATTTTCCTTGTATTTCTAATTCATCAAA
CTCATTTGGAACTTCAAACCCTCTACTATTCTACCTCCAGTTGTCAAATGTCATAG
AGTAGTAAACCAAATGAATAAACATCAGCCTGTTGGTTATAAATGACATTTCTCTG
GCAACTTCAGGTGCACGAAACCCTGGTGTGCCCTCTGATGTTTTTATCCCCATTCTAC
AGCAGTACTGAGCAATGCCGTAGTCAGCAATCTTTGCAATGATGGCAGCATTGGGA
TACAGTGTGAAAAGCAGCACATTGTGGGGTTTCAGGTCTCGGTATATAATCATGGCT
GAGTGGAGGTATCTCAAACCATCAGCTACGTGGAGTGCAATCCTGTGCTGTAGGGTT
CTAGTGAGGCTGGCTTTGTCCTGCTGAAGCAGGCGATCCAAGGAACCCTTGGAGGCT
AACTCCATCACCAACATCCGGGGACGAATCCCAGCTGCCAGCAAAGATATCAAAC
GGGGTGGTGGAGGTGGCAAAGCACCAAGCTCTTGTCTTAACAGCCTGAGTGATG
TATGTTTATTAAAAATCTTCACAGCCACTTCTTCTCCTTCATAGGCTGCTCGGTAAAC
TGATCCAAAACCTGCCATCACCTAGGAGAACTCTGGAGCTTGTTCAAATTCCAAC
ATCATTATTCAACATAATATTTCTAGGCAGGTCAGCCAAAATCAAGTCAGGGGCAAT
CTGAGATATTGGAATGGTGAGCCTTGGTTGATCTGGATTTACTAAGAGATCTCCTTC
CTCTGCTTTCTTCATCAAGTCATCAAGTAAGATTTTTTGATGTTCTTCACCATCATTA

AAACTATATAATGCCCATTTCTTCAACAGAGTTTCTCCTTCACCACAAATATCAATCT
CCAGCAACCCAGGAAACCATTCTTCCATGAGAGAATCAATGTGGTCCACAACCTTGG
CCCAAAAGAATACAGCCTTTTCTACAAGAAGGAAGTGTAAATTTTAAAGAACTCTCT
GGATGATTGTCTAAGACTTCAGATCCTACCAGACAATAAGCTTCAGGAGACCAATTT
AAGTAAATGCCTTGTGCGCAATACATTCTGTTTGGGCGAAGTGCTCGTTCTCTCCCTG
AAAGCATGTAAGGTGAAATCTCAAGTAATCGATTGATTAATCTTGACCAAAATCCCA
TTGGAAAATAAGGCATTTTCATATAGTCGGATGATAATTTTCAGAGTTCTCACAATGGG
GAAGCTCTATCACAGGCCTGTGGTCAGACAAACTGCTTGGAACCAGCAAATATTCTT
CTCCTATTGGCAAAGCAATCTGGAATTTTTTCTAGGAGCTTAAAATACTGTGACATGT
AGTTCTTTGGAAATTTCCCTTTTTTTTGAAGAAATTTTTCCACATCTCTACGCGAAAT
AATGCCCTTAGGGTGTTTTGGACAACCTTCCACTTTTACTGTCAAAATCTGTGCCATG
ATTTTACAAAGCCACTTGGGTTCCACAAAGTACAAGTCACTTAACTGCAGTGCTGGG
TCTTGAAAATGAAGAAGGACTCCTGATTCATTTAGAAAGTGAAGTGCCTGAGGAAG
CTCATTTTCATCTAACTGCAGCTGATTTTCTCTCACTAGTTGTAATAATCGTTTCCGG
TCAATTACGGGAAATTCAATTGGCACATTTTTACGCTCCGATAAAATGATTTTTTCA
AGTTCTACATAGCAGTCTGGAATCAGCTGTCCAACAACAAGCTGATCTCGGATCTTG
AAATTAAGGCTCTCGTTTATGATGGTTTTCCGAAGTTTTGCCAAAGCATCAGATTCCT
CGGTGGCATTACAAAAGTGGTAATCTCGTATGGCAGGGAACCCTCGCTTATTCAGGA
GTTCTTGGTGATTTTACTCATGCAGGCTTTGCGTTGCTTCTCATCAGAAACATCCAA
ATGTGTGCCAACGAGAATCACAGGGGAAGAAGAAGCGCGAGCCTTTATATTGAAGA
GCCAAGGCTTCATGGCATCAACTTCAGCCTGTCCCTTGCTGAGGTCATAGACAGCAA
GGTACAATGCTCGCTGCGTCATAAAATGGGGATGAGTACTATAGAATTCCTCACGAC
CTGCAAAATCCCACACATTTAGGACGAGATCTCTCTTTTCTTTTGTCTCTTATTTGGAT
AGGCCAGTCTTTACATCTATGCCAACTGTGGCACTTTGCATTCCAAGATCTGATTTT
TTGGTTTTTCATTAATTGCTGCAATAAGGTGGTTTTTACCCTCCAGTATTTCCCACAA
TCATAAGTTTTATTTCGTTATAAAGGCACAGCCTTTTTTAAATCGCTGTTGAAGAAACCT
TATGATGTCTTTGGCTTTACATCCTATATGTTTAAATCAAAGTTAAGATGCAGTTCA
TCCAAAGGAAGATCCCATATTTTGCTTAATTTCCCATTTTATTGGGAAAGGATCTT
AGTTCCAAGTTGTAAGTGCATCCAGAGATGTCAGATTTTCAAGACAGCCAATCTCA
GGAGGAATCTCTTTCAGTTTATTGTGAGAAAGATGCAGTTTCTCTACTCTAGACCAT
AAATATGCTTTTTTCACTCAAGTCCAAGATGCTGATCTGATTATGGCTAAATAAGAGT
TCCCTTAAGTTCAAAGATTTCCAGTGTGCGGGACCTGGTAGGTACTGAATATCATTG
CTGCTCATATCTAAAGACCGCAAGTGTGGAAGATTTAAAATTGCTTCTGGAATACAG
GAAAATTTGTTCTGAGATAATTTTAGGATTGTCATAGAAGGAGGCAAGAAAGGCAT
AGCAGCAAGAAAATTCATTCTGGCACTGAAACTCTCCACTTTAGGACAAGCCTCAA
GAAAGTTCTCTGATAGGGATGAAATGTGGTTCTTACTAAGGTTTAAAATCTTCAGTT
CCTTCAGTCTCAAGGGGGAGCATATCCCTGATATTTTATTTTCTTCTAAAATGAGCTG
CTCCAGTTTCTCTACCACATCAGTGAGGTTCTCAGGTACAAAAGACAGCTGGTTATA
TGACAGGTTAAACTGTTTCAGAGTTGGACATTTCACTGTAGGATCTAAAACCACTGA
GGGTCCAATGTCATTTTCGAGAGACATCAAGATTAGCAATACAACCTCATTTTCAACAA

ATAAGAAGGAAATGATGTAAATTTATTACTGTGCAAGTCCAAATGTGTCAAACCTCTT
 CAGAGTTTCACATAGCTGTTGTGGAAAGCTCGTGAGTGCATTCTGGTGAAGCTCCAG
 CTTTTCAAGATGCTCCAAATGAACACTTATACAGCATTCTGGCTTAGGGCATCAAT
 ATCTCTTAGTTTCATTTGCTGAAAGGTCTAGTGATGTAATATATTCTCTCTCAGAAGCC
 AGAGAAGAAATGCTGTCTGAATGCCTCATATGGGATTGAAGTTTTGATGACCTGAGT
 GAATCATCTGAAGATAATATTTTTCTTTTTCTGCTTCAGTAAATCTTCATGATCAAAAA
 TGGGCCCCAAGGAATTGGAATGTCTTTGCAAATTTGGTGAGCAACGCTGTAATACGG
 CATCTCGGTAAAATTCTCCTACACTAATTGAATTAGATTTCTTTTTTACAAGAAATGA
 GCCTTCACTTCCTTCACTATCCAGGTCATCACTTTGAGCAAACACACTGTCCATAGA
 AGAGTCAGGAATAAAGGTCCATTCATCAAATTTAGACAGCACATCTTCAGAAAAAT
 TTCCATCGCTGCCTGAGGCTGTTCTTCTTCCACAGCACTTTTCATCTGATATCTGAT
 CACCATTCTTGCTAGTGTAGATGCTATATTTGTTTGTTTCCTTAAATTAGAAGTCTTA
 TCTGGAAATAAAGGACCAAGCCAAGAAGGTTCAACTTTTCCTATACAAAATCCTCCA
 AGGCAAATGCTATTGTTGGCCACATCCAGGGCCAGCCTCCTTAAGAGCAAGCTGAT
 GATCTGGCTGTCACCTTTCCCAATGCTTATCGTCAACGCTTTTCGTACATCTTGTTCA
 CGAGATCCACTATTCAGTAAGAGTTCCACCAATTTGGGACTGCTCTCTTTCTCACAT
 ACCTGACAAATTAAGAAGATCCCTCCTTTGCTTGATTGGCATCTGCTCCCAATAGA
 AGCAAGCATTCAACCATGATGCTGTTATTCTGATCACACGCTCTCTCTAGCATCACA
 TTTTTTAAGTAATCATCCATAGCTACTTTTGCAAACACTTGCAACAGAGGTTTAGA
 AACTGTTGATCCTTTTGTTCCATGATATTGGAAGACATTTGATGGAATATTACTAAGT
 CAAATGAATGATGCACCAGCAGCTTAGAAAAAGATGCTGACAATTTGAGGATTGCT
 AAGATTGTCTGAAATCCTTTAGTCTGTATTTTCAGCAACATCCTTAAATCGGTATAAG
 CTGGAAACCAGAATTTTTTGCCAGCAGATGTCCAGTTTCCTATGAACACATTCTTCTTT
 GTAATCAAGTATCCTATAAGACTTAAACCCAGACACTGAATTTCTTGGTCATCTGGA
 TACATCTGCAGTGTGTGAAGCACTGAATCCATAGCACCTTCCAGGGATAACATCTCT
 AATGCATCAGGAAAATGTACAATAGAAGAAATTACTTTTAATCCACATTTCTGAATC
 CCAGGATTTCCAATGAACCTGTTCAAAGCTGCTAGGACCAGTTTGTGAATATCATTC
 TTGAAACACTGTTTTTTAACCATATTTAGCTTATGATGAAATTCTGTATCCTCCCTGG
 ATTCTTCTGGCATGCCAGGCACTATAAAATGTAAAATAGCTCGAAGCGCCTCCAGCT
 GCACTGGTAATGATGTCTCATGACGTTTCATAACTGTTAGTATTTTGGGGACCACTG
 CTGCCATTATATCCAGGGAAGTGTTGCTTCCTTCAAAAAGATGATTTAGCATTTTAC
 AGCCACTTTTCAGCCACTTCAGGAGAATGTATATGCTTCTGCATTAACCTCCAAAACAT
 TCAGGTGTATTCCTTTTGATAACAGTATTTTTCTGAAATTAACATTTTGTTCTAAGAG
 AGTTGACAATGCATTCGCAGATGCCTGGAAAACCTTCCTTTGATGAAGAATGCATCAG
 CATGGAGAGCATCACTTCCCTATGAGCTGGGAAATGGCCATCTTCATCTCCAATCTT
 CTCATGTAAACTGTTTTTGGTACATAAGGAGATTATTTAGTGCCAGCATGCGGCCTC
 CTGCACGTGCTTGTTCTTTCTATGCCACGTTAATGCTTTGTAACAGGCTTCCAGCCAA
 AACAATTTATCTTCTTCCCCCTCATCATCATTCTCTTGATTCTCATTCTTTTCCTCTAA
 ATCTTGATTTAAGAAAATAGTCTCAGTGAGGAGGGCCAAACAGCTGAGCGCTGAGA
 TCTGCAATGCTGCATTCTCTGGGTACTGCTGCACAGCTTTCACCACAAACTCATGGA

CTTCGTTTAATACCAGGATATTGAAAAAATTACCTAATGTAAGCCTATGGAGCAAAC
 AGCAACTCACTTCTTGAATTCTTTCACTCATAGGGAATGCTTTCATAGCTTCCACCAC
 AATATTATAACACCTGACATTGCCACTCATGAGGACTTCCACATTATTGCAAGGAAT
 CGCTAGGGAATGTAAACAATGCAGCACATGAAGCACAATTTCTCTTCATCTTTAAA
 ATTTGTTAACGCACTTAACAATATCATATAATCTTTGTTCTCAACAAATTCAGTCAGT
 TGCTCCTCTGAGACTCTCTCAAACAGCACATGTAAAGCTTTGCATCCAAGTTTCTGG
 ACTTCATCATTGGCTGGAAATGAGTGCATGGCATCAAAAATTAACATGAAAATATC
 ACTTTCTTCATCCAATATCAGCAAGGTGATTTTACCTGAAGTTAGGAGGAGATCTAA
 GGTCTTCAGTCCAATCACTGACAAGTTTACACTGGCATTATGAACTGTTAGCATTTT
 AAGAATCAATTGGTGAACACCAAGGACTTCCCAATCATTTCACATCCTGGGGTCC
 CATTAAGCTTTGCATTGTACCTGGACAGACTTCTATTAATTTGCACAGAAGTGACCA
 ACCCACCTGCTGCACACTCGCGACTCTCATATAGGAGTCCAAGACGATCAACAGAG
 GCACATGGATATTTTTGCCTTGAAATAACTTGGAGGCGCGCTCGGAGTACGTGAACA
 CCAGCAGATCCTCCAGGATTTGGACCAGCGTTTCTATCTGTTTTCTTCCTGGACATT
 GTTCAGCCTGACTATCAACTTCTTCAGAGTTTCTCTCGTCTCTTCGCACCCCTGACAG
 CTGCCACTAGCCATGGTGGCACCTGCTTCCAACCCGCCGCCCTCCCAGCATGAACGT
 CCGCTGCTCAGGGAACCGGCAGGGGCGCCGCCACAGCTCCCCGGGGGCGAGCTCA
 GCTCACCGCCCGCAGCCAGCGCTCCCCGCGGGCCCC

SEQ ID NO:3

>XM_015151449.2 Прогнозированная последовательность: мРНК богатой лейциновыми повторами киназы 2 (LRRK2) *Macaca mulatta*, вариант транскрипта X1

ACGGGCACGGTCATCCCGGCCAGGCCCGGCTCCAGCAGCCCCACGGCCGCCG
 CCGAAGTTCTGCGCGGCCCGTCGCCCCGGCGGAGCCTCTGGCAGGCCCTGAGCTG
 GTTTTTTGGGGCCTGGCTGGGGGAGGAGGAAGCCGAGCAGGAGGGCTCTGGAGAGG
 GAGGGCAACGCGGGGCGGGGAGCCACCGCCTTCTCATAAACAGGCGGGCGTGGGC
 GCCGACGGGGCCCCCGGGGAGCCCTGGCTGAGGGCGGTGAGCTGAGCTAGATCCCG
 GGGAGCTGTGGCCGGCGCCCCCTGCCGGTTCCTGAGCAGCGGACGTTCTGTGCTGGG
 AGGGCGGCGGGTTGGAAGCAGGGGCCACCATGGCTAGTGGCAGCTGTCAGGGGTGC
 GAGGAGGACGAGGAACTCTGAAGAAGTTGATAGTCAGGCTGAACAATGTCCAGG
 AAGGTAAACAGATAGAAACGCTGGTCCAAATCCTGGAGGATCTGCTGGTGTTCACG
 TACTCCGAGCACGCCTCCAAGTTATTTCAAGGCAAAAATATCCATGTGCCTCTGTTG
 ATCGTCTTGGACTCGTATATGAGAGTCGCGAGTGTGCAGCAGGTGGGTTGGTCACTT
 CTGTGCAAATTAATAGAAATCTGCCCGGGTACAATGCAAAGCTTAATGGGACCCCA
 GGATGTTGGAAATGATTGGGAAGTCCTTGGTGTTCACCAATTGATTCTTAAAATGCT
 AACAGTTCATAATGCCAGTGTAACCTTGTCATGATTGGACTGAAGACCTTAGATCT
 CCTCCTAACTTCAGGTAAAATCACCTTACTGATATTGGATGAAGAAAGTGATATTTT
 CATGTTAATTTTTGATGCCATGCACTCATTTCCAGCCAATGATGAAATCCAGAACT
 TGGATGCAAAGCTTTACATGTGCTGTTTGAAAGAGTCTCAGAGGAGCAACTAACTG
 AATTTGTTGAGAACAAGATTATATGATATTGTAAAGTGCGTTAACAATTTTAAAG
 ATGAAGAGGAAATTGTGCTTCATGTACTGCATTGTTTACATTCCCTAGCAATTCCTTG

CAATAATGTGGAAGTCCTCATGAGTGGCAATGTCAGGTGTTATAATATTGTGGTGGA
AGCTATGAAAGCATTCCCTATCAGTGAAAAAATTCAAGAAGTGAGTTGCTGTTTGCT
CCATAGGCTTACATTAGGTAATTTTTTTAATATCCTGGTATTAAACGAAGTCCATGA
ATTTGTGGTGAAAGCTGTGCAGCGGTACCCAGAGAACGCAGCATTACAGATCTCAG
CGCTCAGCTGTTTGGCCCTCCTCACTGAGACCATTTTCTTAAATCAAGATTTAGAGG
AAAAGAATGAGAATCAAGAGAATGATGATGAGGGGGAAGAAGTTAAATTGTTTTGG
CTGGAAGCCTGTTACAAAGCGTTAACGTGGCATAGAAAGAACAAGCACGTGCAGGA
GGCTGCATGCTGGGCACTAAATAATCTCCTTATGTACCAAAACAGTTTACATGAGAA
GATTGGAGATGAAGATGGCCATTTCCCAGCTCATAGGGAAGTGATGCTGTCCATGCT
GATGCATTCATCATCAAAGGAAGTTTTCCAGGCATCTGCTAATGCATTGTCAACTCT
TTTAGAACAAAATGTTAATTTTCAGAAAAATCCTGTTATCAAAAGGAATATACCTGAA
TGTTTTGGAGTTAATGCAGAAGCATATACATTCTCCTGAAGTGGCTGAAAGTGGCTG
TAAATGCTAAATCATCTTTTTGAAGGAAGCAACACATCCCTGGATACAATGGCAGC
AGTGCTCCCCAAAATAATAACAGTTATGAAAAGTCATGAGACATCATTACCAGTGC
AGCTGGAGGCGCTTCGAGCTATTTTACATTTTATAGTGCCAGGCATGCCAGAAGAAT
CCAGAGAGGATGCAGAATCTCATCGTAAGCTAAATATGGTTAAAAAACAGTGTTTC
AAGAATGATATTCACAACTGGTCCTAGCAGCTTTGAACAGGTTTCATTGGAAATCCT
GGGATTCAGAAATGTGGATTAAAAGTAATTTCTTTTATTGCACATTTTACTGATGCA
TTAGGGGTGTTATCCCTGGAAGGTGCTGTGGATTCAGTGCTTCACACACTGCAGATG
TATCCAGATGACCAAGAAATTCAGTGTCTGGGTTTAAGTCTTATAGGATGCTTGATT
ACAAAGAAGAATTTATGCATAGGAACTGGACATCTGCTGGCAAAAATTCTGGCTTC
CAGCTTATACCGATTTAAGGATGTTGCTGAAGTACAGACTGAAGGATTTTCAGACAAT
CTTAGCAATCCTCAAATTGTCAGCATCTTTTTCTAAGCTGCTGGTGCATCATTTCGTTT
GACTTAGTAATATTCATCAAATGTCTTCCAGTATCATGGAACAAAAGGATCAACAG
TTTCTAAACCTCTGTTGCAAGTGTTTTGCAAAAGTAGCTATGGATGATGACTTAAAA
AATATGATGCTAGAGAGAGCGTGTGATCAGAATAACAGCATCATGGTTGAATGCTT
GCTTCTATTAGGAGCAGATGCCAATCAAGCAAAGGAGGGAAGTTCTTTAATTTGTCA
GGTATGTGAGAAAGAGAGCAGTCCCAAATTGGTGGAAGTCTTATTGAATAGTGGAT
CTCGTGAACAAGATGTACGAAAAGCGCTGACAATAAGCATTGGGAAAGGCGACAGC
CAGATCATCAGCTTGCTCTTAAGGAGGCTGGCCCTGGACATGGCCAACAATAGCATT
TGCCTTGGAGGGTTTTGTATAGGAAAAGTTGAACCTTCTTGGCTTGGTCCTTTATTTT
CAGATAAGACTTCTAATTTAAGGAAACAAACAAATATAGCATCTACACTAGCAAGA
ATGGTGATCAGATATCAGATGAAAAGTGCCATGGAAGAAGGAGCAGCCTCAGGCAG
TGATGGAAATTTTTCTGAAGATGTGCTGTCTAAATTTGATGAATGGACCTTTATTCCT
GACTCTTCTATGGACAGTGTCTTTGCTCAAAGTGATGATCTAGATAGTGAAGGAAGT
GAAGGCTCATTCTTGTGAAAAAGAAATCAAATTCAATTAGTGTAGGAGAATTTTAC
CGAGATGCCGTATTACAACGTTGCTCACCAAATTTGCAAAGGCATTCCAGTTCCTTG
GGGCCCATTTTTGATCATGAAGATTTACTGAGAAGAAAAAGAAAAATATTATCTTCA
GATGATTCACTCAGGTCATCAAACCTTCAATCCCATATGAGGCATTTCAGACAGCATT
TCTTCTCTGGCTTCTGAGAGAGAATATATTACATCACTAGACCTTTCAGCAAATGAA

CTAAGAGATATTGATGCCCTAAGCCAGAAATCCTGTATAAGTGGTCATTTGGAGCAT
CTTGAAAAGCTGGAGCTTCACCAGAATGCACTCACGAGCTTTCCACAACAGCTATGT
GAAACTCTGAAGAGTTTGACACATTTGGACTTGCACAGTAATAAATTTACATCATTT
CCTTCTTACTTGTTGAAAATGAGTTGTGTTGCTAACCTTGATGTCTCTCGAAATGACA
TTGGACCCTCAGTGGTTTTAGATCCTGCAGTGAAATGTCCAACCTCTGAAACAGTTTA
ACCTGTCATATAACCAGCTGTCTTCTGTTCTGAGAACCTTGCTGATGGGATAGAGA
AACTGGAGCAGCTCATTTTAGAAGGAAATAAAATATCAGGGATATGCTCCCCCTTG
AGACTGAAGGAACTGAAGATTTTAAACCTTAGTAAAAACCACATTTTCATCCCTATCA
GAGAACTTTCTTGAGGCTTGTCTTAAAGTGGAGAGTTTCAGTGCCAGAATGAATTTT
CTTGCTGCTATGCCTTTCTTGCCTCCTTCCATGACAAGCCTAAAATTATCTCAAAACA
AATTTACATGTATTCCAGAAGCAATTTTAAATCTTCCACACTTGCGGTCTTTAGATAT
GAGCAGCAATGATATTCAATATCTACCAGGTCCTGCACACTGGAAATCTTTGAACTT
AAGGGAACCTTTATTTAGCCATAATCAGATCAGCATCTTGGACTTGAGTGAAAAAGC
GTATTTATGGTCTAGAGTAGAGAACTGCATCTTTCTCACAATAAACTGAAAGAGAT
TCCTCCTGAGATTGGCTGTCTTGAAAATCTGACATCTCTGGATGTCAGTTACAACCTG
GAACTAAGATCCTTTCCCAATGAAATGGGGAAATTAAGCAAAATATGGGATCTTCCT
TTGGATGAACTGCGTCTTAACTTTGATTTTAAACATATAGGATGTAAAGCCAAAGAC
ATCATAAGGTTTCTTCAGCAGCGGTTAAAAAAGGCTGTGCCCTATAACCGAATGAA
ACTTATGGTTGTTGGAAATACTGGGAGTGGTAAAACCACCTTGTTGCAGCAATTAAT
GAAAACCAAGAAATCAGATCTTGGAATGCAAAGTGCCACAGTTGGCATAGATGTGA
AAGACTGGCCTATCCAAATAAGAGGGCAAAGAGAAAGAGAGATCTCGTTCTGAATGTG
TGGGATTTTGCAGGTCGTGAGGAATTCTATAGCACTCATCCTCATTTTATGACGCAG
CGAGCATTGTACCTTGCTGTCTATGACCTTAGCAAAGGACAGGCTGAAGTTGATGCC
ATGAAGCCTTGGCTCTTCAATATAAAGGCTCGCGCTTCTTCTTCCCCTGTGATTCTCG
TTGGCACACATTTGGATGTTTCTGATGAGAGGCAGCGCAAAGCCTGCATAGGTAAA
ATCACCAAGGAACTCCTGAATAAGCGAGGGTTCCCTGCTATACGAGATTACCACTTT
GTGAATGCCACCGAGGAATCTGATGCTTTGGCAAACCTTCGGAAAACCATCATAAA
CGAGAGCCTTAATTTCAAGATCCGAGATCAGCCTGTTGTTGGACAGCTGATTCCAGA
CTGCTATGTAGAACTTGAGAAAATCATTTTATCGGAGCGTAAAAATGTGCCAATTGA
ATTTCTGTGAATTGACCAGAAACGATTATTACAACCTAGTGAGAGAAAATCAGTTGCA
GTTAGATGAAAATGAGCTTCCTCACGCAGTTCACTTTCTAAATGAATCAGGAGTCCT
TCTTCATTTTCAAGACCCAGCACTGCAGTTAAGTGACTTGTATTTTGTGGAACCCAA
GTGGCTTTGTAAAATCATGGCACAGATTTTGACAGTGAAAGTGGAAGGTTGTCCAA
AACACCCTAAGGGAATTATTTACGTAGAGATGTGGAAAAATTTCTTTTGAAGAAA
AGGAGATTTCCAAAGAACTACATGTCACAGTATTTTAAGCTCCTAGAAAAATTCCAG
ATTGCTTTGCCAATAGGAGAAGAATATTTGCTGGTTCCAAGCAGTTTGTCTGACCAC
AGGCCTGTGATAGAGCTTCCCCATTGTGAGAACTCTGAAATTATCATCCGACTATAT
GAAATGCCTTATTTTCCAATGGGATTTTGGTCGAGGTTAATCAATCGATTACTTGAG
ATTTACCTTACATGCTTTCAGGGAGAGAACGAGCACTTCGCCCAAACAGAATGTAT
TGGCGACAAGGCATCTACTTAAATTGGTCTCCTGAAGCTTATTGTCTGGTAGGATCT

GAAGTCTTAGACAATCACCCAGAGAGTTTCTTAAAAATTACAGTTCCTTCTTGTAGA
AAAGGCTGTATTCTTTTGGGCCAAGTTGTGGACCACATTGATTCTCTCATGGAGGAA
TGGTTTCCTGGGTTGCTGGAGATTGATATTTGTGGTGAAGGAGAACTCTGTTGAAG
AAATGGGCATTATATAGTTTTAATGATGGTGAAGAGCATCAAAAAATCTTACTTGAT
GACTTGATGAAGAAAGCAGAGGAAGGAGATCTCTTAGTAAATCCAGATCAACCAAG
GCTCACCATTCCAATATCTCAGATTGCCCCTGACTIONGATTTTGGCTGACCTGCCTAGA
AATATTATGTTGAATAATGATGAGCTGGAATTTGAACAAGCTCCAGAGTTTCTCCTA
GGTGATGGCAGTTTTTGGATCAGTTTATCGAGCAGCCTATGAAGGAGAAGAAGTGGC
TGTGAAGATTTTTAATAAACACACATCACTTAGGCTGTAAAGACAAGAGCTGGTGGT
GCTTTGCCACCTCCACCACCCAGTTTGATATCTTTGCTGGCAGCTGGTATTCGTCCC
CGGATGTTGGTGATGGAGTTAGCCTCCAAGGGTTCCTTGGATCGCCTGCTTCAGCAG
GACAAAGCCAGCCTCACTAGAACCCTACAGCACAGGATTGCACTCCATGTGGCTGA
TGGTTTGAGATACCTCCATTGAGCCATGATTATATACCGAGACTTGAAGCCCCACAA
TGTGCTGCTTTTCACACTGTATCCCAATGCTGCCATCATTGCAAAGATTGCTGACTAC
GGCATTGCTCAGTACTGCTGTAGAATGGGGATAAAAAACGTCAGAGGGCACACCAGG
GTTTCGTGCACCTGAAGTTGCCAGAGGAAATGTCATTTATAATCAACAAGCTGATGT
TTATTCATTTGGTTTGCTACTCTATGACATTTTGACAACCTGGAGGTAGAATAGTAGA
GGGTTTGAAGTTTCCAAATGAGTTTGATGAATTAGCAATACAAGGAAAATTACCTGA
TCCAGTTAAAGAATATGGTTGTGCCCCATGGCCTATGGTTGAGAAATTAATTACAAA
GTGTTTGAAAGAAAATCCTCAAGAAAGGCCTACTTCTGCCCAGGTCTTTGACATTTT
GAATTCAGCTGAATTAGTCTGTCTGACGAGACACATTTTATTACCTAAAAACGTAAT
TGTTGACTGCATGGTTGCTACACATCACAACAGCAGGAATGCAAGCATTGCTGGG
CTGTGGGCACACCAACAGAGGACAGCTCTCATTCTTACTTAAATACTGAAGGATA
CACTTCTGAGGAGGTGCTGATAGTAGAATATTGTGCTTAGCCTTGGTGCATCTTCCT
GTTCAAAAAGAAAGCTGGATTGTGTCCGGGACACAGTCTGGTACTCTCCTGGTCATC
AATACCGAAGATGGGAAAAAGAGACATACCCTAGAAAAGATGACTGATTCCATCAC
TTGTTTGTATTGCAATTCCTTTTCCAAGCAAAGCAAACAAAAAAATTTTCTTTTGGTT
GGAACCGCTGATGGCAATTTAGCAATTTTGAAGATAAACTGTAAAGCTTGAAGG
AGCTGCTCCTTTGAAGATACTAAATATAGGAAATGTCAGTACTCCATTGATGTGTTT
GAGTGAATCCACAAATTCAACAGAAAGAAATGTAATGTGGGGAGGATGTGGCACAA
AGATTTTCTCCTTTTCTAATGATTTACCATTCAGAACTCATTGAGACAAGAACAA
GCCAACTGTTCTCAAGTGATTCTAAAGTATATTGAGGTTAAGATATACTGCAGACT
GCAATGTATTGTTTTCTTACGCAGCTTTCAGTGATTCCAACATCGTAACAGTGGTGGT
AGACACTGTTCTCTATATTGCTAAGAAAAATAGCCCTGTTGTGGAAGTGTGGGATAA
GAAAACTGAAAACTCTGCGAACTAATAGACTGTGTGCATTTTTTAAAGGGAGGTAA
TGGTAAAAGTAAACAAGGAATCAAAACACAAAATGTCTTATTCTGGGAGAGTGAAA
GCTCTCTGCCTTCAGAAGAACTGCTCTTTGGATAGGAACTGGAGGAGGCCATATT
TACTCCTGGATCTTCAACTCGTCGAGTTATACGTATAATTTACAACCTTTTGTGATT
CGGTCAGAGTCATGATGACAGCACAGCTAGGGAGCCTTAAAAATGTCATGCTGGTA
TTGGGCTATAACCGGAAAAGTACTGAAGGTACACAACAGCAGAAAGAGATACAATC

TTGCTTGACTGTTTGGGACATCAATCTTCCACATGAAGTGCAAAATTTAGAAAAACA
 CATTGAAGTGAGAAAAGAATTAGCTGAAAAAATGAGAGGAACATCTATTGAATAAG
 AGAGAAACAGGAATTGTCTTTGGATAGGAAAATTATTCTCTTGTAATATTTATTTA
 AAAATGTTACATGAAAAGGGTACTCACATTTTTTTGAAATAGCTCATGTGTATATGA
 AGGAATGTTATATTTTTAATTTAAATATATGTAAAAATACTTACCAGTAAACATATA
 TTTTAAAGAACTATTTAAAACACAATGTTGTATTTCTTATGAATACCAGTTACTTTTG
 TGCATTAATTAATGAAAATAAATCTGTGAAATACCTAATTTAAGTACTCATACTAAA
 ATTTATAAGGCCGATAATTTTTTGTCTTGTCTGTAATGAAGATAAACTTTATTTT
 AAATTCTATGCTTAAGACAAGACTATTGCTTGTTGATTTTTCTAGAAATCCGCAAGG
 TAGAATGAAAATATTAAGACAGTTTCCCGTGTAATGTATTCCCTCTTAGATTGCTTTG
 AAATGCACTATCATATATGCTTGCAAATATTCAAATGAATTTGCACTAATAAATTCC
 TTTGTTGGTATGTGAATTCTCTTTGTTGCTGTTGCAGACAGTGCATCTTACACAACCT
 CACTCAATCCAAAAGAAAACCTCCATTAATAAGTACTAA

SEQ ID NO:4

Обратный комплемент SEQ ID NO:3

TTAGTACTTTTAATGGAGTTTTCTTTTGGATTGAGTGAAGTTGTGTAAGATGC
 ACTGTCTGCAACAGCAACAAAGAGAATTCACATACCAACAAAGGAATTTATTAGTG
 CAAATTCATTTGAATATTTGCAAGCATATATGATAGTGCATTTCAAAGCAATCTAAG
 AGGGAATACATTACACGGGAACTGTCTTAATATTTTCATTCTACCTTGCGGATTTCT
 AGAAAAATCAACAAGCAATAGTCTTGTCTTAAGCATAGAATTTAAAATAAAGTTTAT
 CTTCAATTACAGACAAGAAAACAAAAAATTATCGGCCTTATAAATTTTAGTATGAGTA
 CTTAAATTAGGTATTTACAGATTTATTTTCATTAATTAATGCACAAAAGTAACTGGT
 ATTCATAAGAAATACAACATTGTGTTTTAAATAGTTCTTTAAATATATGTTTACTGG
 TAAGTATTTTTACATATATTTAAATTAAAAATATAACATTCCTTCATATACACATGAG
 CTATTTCAAAAAATGTGAGTACCCTTTTCATGTGAACATTTTTAAATAAATATTTACA
 AGAGAATAATTTTCCTATCCAAAGACAATTCCTGTTTCTCTCTTATTCAATAGATGTT
 CCTCTCATTTTTTTCAGCTAATTCTTTTCTCACTTCAATGTGTTTTTCTAAATTTTGCAC
 TTCATGTGGAAGATTGATGTCCCAAACAGTCAAGCAAGATTGTATCTCTTTCTGCTG
 TTGTGTACCTTCAGTACTTTTCCGGTTATAGCCCAATACCAGCATGACATTTTTAAGG
 CTCCCTAGCTGTGCTGTCATCATGACTCTGACCGAATCACAAAAGTTGTAAATTATA
 CGTATAACTCGACGAGTTGAAAGATCCAGGAGTAAAATATGGCCTCCTCCAGTTCCT
 ATCCAAAGAGCAGTGTTCTTCTGAAGGCAGAGAGCTTTCCTCTCCCAGAATAAGAC
 ATTTTGTGTTTTGATTCCTTGTTTACTTTTACCATTACCTCCCTTAAAAAATGCACAC
 AGTCTATTAGTTCGCAGAGTTTTTTCAGTTTTCTTATCCCACACTTCCACAACAGGGCT
 ATTTTTCTTAGCAATATAGAGAACAGTGTCTACCACCACTGTTACGATGTTGGAATC
 ACTGAAAGCTGCGTAAGAAAACAATACATTGCAGTCTGCAGTATATCTTAACCTCGA
 ATATACTTTAGAATCACTTGAGAACAGTTGGCTTGTTCTTGTCTCAATGAGTTTCTGA
 ATGGTGAAATCATTAGAAAAGGAGAAAATCTTTGTGCCACATCCTCCCCACATTACA
 TTTCTTTCTGTTGAATTTGTGGATTCACTCAAACACATCAATGGAGTACTGACATTTT
 CTATATTTAGTATCTTCAAAGGAGCAGCTCCTTCAAGCTTAACAGTTTTATCTTCAAA

AATTGCTAAATTGCCATCAGCGGTTCCAACCAAAAGAAAATTTTTTTGTTTGCTTTGC
 TTGGAAGGAATTGCAATACAAACAAGTGATGGAATCAGTCATCTTTTCTAGGGT
 ATGTCTCTTTTTCCCATCTTCGGTATTGATGACCAGGAGAGTACCAGACTGTGTCCCG
 GACACAATCCAGCTTTCTTTTTGAACAGGAAGATGCACCAAGGCTAAGCACAATATT
 CTACTATCAGCAACCTCCTCAGAAGTGTATCCTTCAGTATTTAAGTCAAGAAATGAG
 AGCTGTCCTCTGTTGGTGTGCCCACAGCCCAGCCAAATGCTTGCATTCTGCTGTTGT
 GATGTGTAGCAACCATGCAGTCAACAATTACGTTTTTAGGTAATAAAATGTGTCTCG
 TCAGACAGACTAATTCAGCTGAATTCAAAATGTCAAAGACCTGGGCAGAAGTAGGC
 CTTTCTTGAGGATTTTCTTTCAAACACTTTGTAATTAATTTCTCAACCATAGGCCATG
 GGGCACAACCATATTCTTTAACTGGATCAGGTAATTTTCCTTGTATTGCTAATTCATC
 AAATCATTTGGAACTTCAAACCCTCTACTATTCTACCTCCAGTTGTCAAATGTC
 ATAGAGTAGCAAACCAAATGAATAAACATCAGCTTGTTGATTATAAATGACATTTCC
 TCTGGCAACTTCAGGTGCACGAAACCCTGGTGTGCCCTCTGACGTTTTTATCCCCATT
 CTACAGCAGTACTGAGCAATGCCGTAGTCAGCAATCTTTGCAATGATGGCAGCATTG
 GGATACAGTGTGAAAAGCAGCACATTGTGGGGCTTCAAGTCTCGGTATATAATCAT
 GGCTGAATGGAGGTATCTCAAACCATCAGCCACATGGAGTGCAATCCTGTGCTGTA
 GGGTTCTAGTGAGGCTGGCTTTGTCCTGCTGAAGCAGGCGATCCAAGGAACCCTTGG
 AGGCTAACTCCATCACCAACATCCGGGGACGAATACCAGCTGCCAGCAAAGATATC
 AAATGGGGTGGTGGAGGTGGCAAAGCACCACCAGCTCTTGTCTTAACAGCCTAAG
 TGATGTGTGTTTATTAATAATCTTCACAGCCACTTCTTCTCCTTCATAGGCTGCTCGA
 TAACTGATCCAAAATGCCATCACCTAGGAGAACTCTGGAGCTTGTTCAAATTCC
 AGCTCATCATTATTCAACATAATATTTCTAGGCAGGTGAGCCAAAATCAAGTCAGGG
 GCAATCTGAGATATTGGAATGGTGAGCCTTGGTTGATCTGGATTTACTAAGAGATCT
 CCTTCCTCTGCTTTCTTCATCAAGTCATCAAGTAAGATTTTTTGATGCTCTTCACCAT
 CATTAAACTATATAATGCCATTTCTTCAACAGAGTTTCTCCTTCACCACAAATATC
 AATCTCCAGCAACCCAGGAAACCATTCCTCCATGAGAGAATCAATGTGGTCCACAA
 CTTGGCCCAAAAGAATACAGCCTTTTCTACAAGAAGGAACTGTAATTTTTTAAGAAAC
 TCTCTGGGTGATTGTCTAAGACTTCAGATCCTACCAGACAATAAGCTTCAGGAGACC
 AATTTAAGTAGATGCCTTGTGCAATAACATTCTGTTTGGGCGAAGTGCTCGTTCTCT
 CCCTGAAAGCATGTAAGGTGAAATCTCAAGTAATCGATTGATTAACTCGACCAA
 ATCCCATTTGGAAAATAAGGCATTTTCATATAGTCGGATGATAATTTTCAGAGTTCTCAC
 AATGGGGAAGCTCTATCACAGGCCTGTGGTCAGACAACTGCTTGGAACCAGCAA
 TATTCTTCTCCTATTGGCAAAGCAATCTGGAATTTTTCTAGGAGCTTAAATACTGTG
 ACATGTAGTTCTTTGGAAATCTCCTTTTCTTCGAAAGAAATTTTTCCACATCTCTACG
 TGAAATAATTCCTTAGGGTGTGTTTGGACAACCTTCCACTTTCACTGTCAAATCTGT
 GCCATGATTTTACAAAGCCACTTGGGTTCACAAAATACAAGTCACTTAACTGCAGT
 GCTGGGTCTTGAAAATGAAGAAGGACTCCTGATTCATTTAGAAAGTGAAGTGCCTG
 AGGAAGCTCATTTTCATCTAACTGCAACTGATTTTCTCTCACTAGTTGTAATAATCGT
 TTCTGGTCAATTACAGGAAATTCAATTGGCACATTTTACGCTCCGATAAAATGATT
 TTCTCAAGTTCTACATAGCAGTCTGGAATCAGCTGTCCAACAACAGGCTGATCTCGG

ATCTTGAAATTAAGGCTCTCGTTTATGATGGTTTTCCGAAGTTTTGCCAAAGCATCA
GATTCCTCGGTGGCATTACAAAAGTGGTAATCTCGTATAGCAGGGAACCTCGCTTA
TTCAGGAGTTCCTTGGTGATTTTACCTATGCAGGCTTTGCGCTGCCTCTCATCAGAAA
CATCCAAATGTGTGCCAACGAGAATCACAGGGGAAGAAGAAGCGCGAGCCTTTATA
TTGAAGAGCCAAGGCTTCATGGCATCAACTTCAGCCTGTCCTTTGCTAAGGTCATAG
ACAGCAAGGTACAATGCTCGCTGCGTCATAAAATGAGGATGAGTGCTATAGAATTC
CTCACGACCTGCAAAAATCCCACACATTCAGAACGAGATCTCTCTTTCTTTTGCCTCTT
ATTTGGATAGGCCAGTCTTTCACATCTATGCCAACTGTGGCACTTTGCATTCCAAGA
TCTGATTTCTTGGTTTTTCATTAATTGCTGCAACAAGGTGGTTTTTACCACTCCCAGTAT
TTCCAACAACCATAAGTTTCATTTCGGTTATAGGGCACAGCCTTTTTTTAACCGCTGCTG
AAGAAACCTTATGATGTCTTTGGCTTTACATCCTATATGTTTAAAATCAAAGTTAAG
ACGCAGTTCATCCAAAGGAAGATCCCATATTTTGCTTAATTTCCCCATTTTCATTGGG
AAAGGATCTTAGTTCCAAGTTGTAAGTACATCCAGAGATGTCAGATTTTCAAGACA
GCCAATCTCAGGAGGAATCTCTTTCAGTTTATTGTGAGAAAGATGCAGTTTCTCTAC
TCTAGACCATAAATACGCTTTTTTCACTCAAGTCCAAGATGCTGATCTGATTATGGCT
AAATAAGAGTTCCCTTAAGTTCAAAGATTTCCAGTGTGCAGGACCTGGTAGATATTG
AATATCATTGCTGCTCATATCTAAAGACCGCAAGTGTGGAAGATTTAAAATTGCTTC
TGGAATACATGTAAATTTGTTTTGAGATAATTTTAGGCTTGTCATGGAAGGAGGCAA
GAAAGGCATAGCAGCAAGAAAATTCATTCTGGCACTGAAACTCTCCACTTTAGGAC
AAGCCTCAAGAAAGTTCTCTGATAGGGATGAAATGTGGTTTTTACTAAGGTTTAAAA
TCTTCAGTTCCTTCAGTCTCAAGGGGGAGCATATCCCTGATATTTTATTTCTTCTAA
AATGAGCTGCTCCAGTTTCTCTATCCCATCAGCAAGGTTCAGGAACAGAAGACAG
CTGGTTATATGACAGGTAAACTGTTTCAGAGTTGGACATTTCACTGCAGGATCTAA
AACCCTGAGGGTCCAATGTCATTTTCGAGAGACATCAAGGTAGCAACACAACCTCA
TTTTCAACAAGTAAGAAGGAAATGATGTAAATTTATTACTGTGCAAGTCCAATGTG
TCAAACCTCTTCAGAGTTTCACATAGCTGTTGTGGAAAGCTCGTGAGTGCATTCTGGT
GAAGCTCCAGCTTTTCAAGATGCTCCAAATGACCACTTATACAGGATTTCTGGCTTA
GGGCATCAATATCTCTTAGTTTCAATTTGCTGAAAGGTCTAGTGATGTAATATATTCTCT
CTCAGAAGCCAGAGAAGAAATGCTGTCTGAATGCCTCATATGGGATTGAAGTTTTG
ATGACCTGAGTGAATCATCTGAAGATAATATTTTTCTTTTTCTTCTCAGTAAATCTTC
ATGATCAAAAATGGGCCCAAGGAACTGGAATGCCTTTGCAAATTTGGTGAGCAAC
GTTGTAATACGGCATCTCGGTAAAATTCTCCTACACTAATTGAATTTGATTTCTTTTT
CACAAGAAATGAGCCTTCACTTCCTTCACTATCTAGATCATCACTTTGAGCAAAGAC
ACTGTCCATAGAAGAGTCAGGAATAAAGGTCCATTCATCAAATTTAGACAGCACAT
CTTCAGAAAAATTTCCATCACTGCCTGAGGCTGCTCCTTCTTCCATGGCACTTTTCAT
CTGATATCTGATCACCATTCTTGCTAGTGTAGATGCTATATTTGTTTGTTTCCTTAAA
TTAGAAGTCTTATCTGGAAATAAAGGACCAAGCCAAGAAGGTTCAACTTTTCCTATA
CAAAACCCTCCAAGGCAAATGCTATTGTTGGCCATGTCCAGGGCCAGCCTCCTTAAG
AGCAAGCTGATGATCTGGCTGTCGCCTTTCCCAATGCTTATTGTCAGCGCTTTTCGTA
CATCTTGTTACAGAGATCCACTATTCAATAAGAGTTCCACCAATTTGGGACTGCTCT

CTTTCTCACATACCTGACAAATTAAGAAGTTCCCTCCTTTGCTTGATTGGCATCTGC
TCCTAATAGAAGCAAGCATTCAACCATGATGCTGTTATTCTGATCACACGCTCTCTC
TAGCATCATATTTTTTAAGTCATCATCCATAGCTACTTTTGCAAAACACTTGCAACAG
AGGTTTAGAACTGTTGATCCTTTTGTTCATGATACTGGAAGACATTTGATGGAAT
ATTACTAAGTCAAACGAATGATGCACCAGCAGCTTAGAAAAAGATGCTGACAATTT
GAGGATTGCTAAGATTGTCTGAAATCCTTCAGTCTGTACTTCAGCAACATCCTTAAA
TCGGTATAAGCTGGAAGCCAGAATTTTTGCCAGCAGATGTCCAGTTCCTATGCATAA
ATTCTTCTTTGTAATCAAGCATCCTATAAGACTTAAACCCAGACACTGAATTTCTTGG
TCATCTGGATACATCTGCAGTGTGTGAAGCACTGAATCCACAGCACCTTCCAGGGAT
AACACCCCTAATGCATCAGTAAAATGTGCAATAAAAGAAATTACTTTTAATCCACAT
TTCTGAATCCCAGGATTTCCAATGAACCTGTTCAAAGCTGCTAGGACCAGTTTGTGA
ATATCATTCTTGAAACACTGTTTTTTAACCATATTTAGCTTACGATGAGATTCTGCAT
CCTCTCTGGATTCTTCTGGCATGCCTGGCACTATAAAATGTAAAATAGCTCGAAGCG
CCTCCAGCTGCACTGGTAATGATGTCTCATGACTTTTCATAACTGTTATTATTTGGG
GAGCACTGCTGCCATTGTATCCAGGGATGTGTTGCTTCCTTCAAAAAGATGATTTAG
CATTTTACAGCCACTTTCAGCCACTTCAGGAGAATGTATATGCTTCTGCATTAACTCC
AAAACATTTCAGGTATATTCCTTTTGATAACAGGATTTTTCTGAAATTAACATTTTGT
CTAAAAGAGTTGACAATGCATTAGCAGATGCCTGGAAAACCTTCCTTTGATGATGAAT
GCATCAGCATGGACAGCATCACTTCCCTATGAGCTGGGAAATGGCCATCTTCATCTC
CAATCTTCTCATGTAAACTGTTTTGGTACATAAGGAGATTATTTAGTGCCCAGCATG
CAGCCTCCTGCACGTGCTTGTCTTTCTATGCCACGTAAACGCTTTGTAACAGGCTTC
CAGCCAAAACAATTTAACTTCTTCCCCCTCATCATCATTCTCTTGATTCTCATTCTTT
CCTCTAAATCTTGATTTAAGAAAATGGTCTCAGTGAGGAGGGCCAAACAGCTGAGC
GCTGAGATCTGTAATGCTGCGTTCTCTGGGTACCGCTGCACAGCTTTCACCACAAAT
TCATGGACTTCGTTTAATACCAGGATATTAATAAATAATTACCTAATGTAAGCCTATGG
AGCAAACAGCAACTCACTTCTTGAATTTTTTCACTGATAGGGAATGCTTTCATAGCT
TCCACCACAATATTATAACACCTGACATTGCCACTCATGAGGACTTCCACATTATTG
CAAGGAATTGCTAGGGAATGTAAACAATGCAGTACATGAAGCACAATTCCTCTTC
ATCTTTAAAATTTGTTAACGCACTTAACAATATCATATAATCTTTGTTCTCAACAAAT
TCAGTTAGTTGCTCCTCTGAGACTCTTTCAAACAGCACATGTAAAGCTTTGCATCCA
AGTTTCTGGATTTTCATCATTGGCTGGAAATGAGTGCATGGCATCAAAAATTAACATG
AAAATATCACTTTCTTCATCCAATATCAGTAAGGTGATTTTACCTGAAGTTAGGAGG
AGATCTAAGGTCTTCAGTCCAATCATTGACAAGTTTACACTGGCATTATGAACTGTT
AGCATTTTAAGAATCAATTGGTGAACACCAAGGACTTCCCAATCATTTCCAACATCC
TGGGGTCCCATTAAGCTTTGCATTGTACCCGGGCAGATTTCTATTAATTTGCACAGA
AGTGACCAACCCACCTGCTGCACACTCGCGACTCTCATATACGAGTCCAAGACGATC
AACAGAGGCACATGGATATTTTTGCCTTGAAATAACTTGAGGGCGTGCTCGGAGTAC
GTGAACACCAGCAGATCCTCCAGGATTTGGACCAGCGTTTCTATCTGTTTACCTTCCT
GGACATTGTTTCAGCCTGACTATCAACTTCTTCAGAGTTTCCTCGTCCTCCTCGCACCC
CTGACAGCTGCCACTAGCCATGGTGGCCCCTGCTTCCAACCCGCCGCCCTCCCAGCA

CGAACGTCCGCTGCTCAGGGAACCGGCAGGGGCGCCGGCCACAGCTCCCCGGGATC
 TAGCTCAGCTCACCGCCCTCAGCCAGGGCTCCCCGGGGGGCCCCGTCGGCGCCCCACGC
 CCGCCTGTTTATGAGGAAGGCGGTGGCTCCCCGCCCCGCGTTGCCCTCCCTCTCCAG
 AGCCCTCCTGCTCGGCTTCCTCCTCCCCCAGCCAGGCCCAAAAAACCAGCTCAGGG
 GCCTGCCAGAGGCTCCGCCGGGGCGACGGGCGCGCAGAACTTCGGCGGGCGGCCGT
 GGGGCTGCTGGAGCCGGGCCTGGCCGGGATGACCGTGCCCGT

SEQ ID NO: 5

>NM_025730.3 мРНК богатой лейциновыми повторами киназы 2(Lrrk2) *Mus musculus*

GAGCAGCTCTGAGAGCAGGAGCCGTCCCAGCTCGCCGCAGTCCCCGCCGGCT
 GCACCATGGCCAGTGGCGCCTGTCAGGGCTGCGAAGAGGAAGAGGAGGAGGAGGC
 TCTGAAGAAGTTGATAGTCAGGCTGAATAATGTCCAGGAAGGCAAGCAGATCGAGA
 CGTTGCTTCAGCTCCTGGAGGACATGCTGGTGTTCACCTACTCGGACCGCGCCTCCA
 AGTTATTTGAAGATAAAAAATTTCCACGTGCCTCTGTTGATTGTCCTGGACTCCTACAT
 GAGAGTTGCCAGTGTACAGCAGGCGGGGTGGTCACTTCTGTGCAAATTAATAGAAG
 TCTGTCCAGGGACATTGCAAAGCTTAATAGGACCCCAGGATATTGGAAATGATTGG
 GAAGTCCTTGGTATTACCGGCTGATTCTTAAAATGTAACTGTTTCATCACGCCAAT
 GTAAACCTGTCAATAGTTGGACTAAAAGCCTTGGATCTCCTCCTAGATTCAGGTAAA
 CTCACCTTGCTGATACTGGATGAAGAATGTGATATTTTCTTGTTAATTTTTTGATGCCA
 TGCACAGATATTCAGCCAATGATGAAGTCCAAAAACTGGGATGCAAAGCTTTACAC
 GTGCTTTTTGAGAGAGTTTCCGAGGAACAGCTGACTGAGTTTGTGGAGAACAAGA
 TTACACGATACTGCTGAGTACGTTTCGGCAGCTTCAGAAGGGACAAGGAGATTGTGT
 ACCACGTACTTTGCTGCTTGCATTCCCTGGCGGTTACATGCAGCAATGTAGAGGTCC
 TCATGAGTGGGAATGTCCGGTGCTACAATCTTGTGGTGGAGGCCATGAAAGCCTTCC
 CCACCAATGAAAACATCCAAGAGGTGAGCTGCTCCTTGTTCCAGAAGCTTACATTAG
 GTAACTTTTTCAACATCCTGGTGTGTAACGAAGTGCATGTCTTTGTGGTGAAAGCGG
 TCCGACAGTATCCTGAGAACGCAGCCTTACAGATCTCTGCACTCAGCTGTTTAGCAC
 TCCTCACTGAGACTATTTTCTTAAACCAAGACTTGGAGGAAAGAAGTGAGACTCAA
 GAGCAGAGCGAAGAGGAAGACAGTGAGAAGCTTTTCTGGCTGGAACCCTGCTATAA
 AGCCCTGGTGCGCCATCGAAAGGACAAACACGTGCAGGAGGCTGCCTGCTGGGCAC
 TAAATAACCTCCTTATGTACCAGAACAGTTTGCATGAGAAGATCGGAGATGAAGAT
 GGCCAGTTCCTTGCACAGGGAAGTGATGCTGTCTATGCTGATGCACTCTTCTTCC
 AAAGATGTCTTCCAAGCAGCTGCACATGCTCTGTCCACTCTCTTGAACAAAATGTT
 AATTTCAAGGAAAATCCTGCTGGCAAAAGGAGTATACCTGAATGTCTTGGAATTGATG
 CAGAAGCATGCCCATGCGCCTGAGGTGGCAGAGAGTGGCTGCAAGATGCTGAGTCA
 CCTGTTTGAAGGAAGTAACCCTTCTCTGGATACAATGGCAGCAGTGGTCCCTAAAAT
 ACTAACAGTGATGAAAGCCCACGGAACGTCTCTGTCACTCAGCTGGAGGCGCTGC
 GAGCTATCTTGCATTTTCGTTGTGCCAGGACTATTGGAAGAATCCAGGGAGGACTCTC
 AATGCAGACCAAATGTGCTCAGAAAACAGTGTTTCAGGACTGACATCCACAAGCTG
 GTTCTAGTCGCTCTGAACAGGTTTATTGGGAATCCTGGGATTCAGAAATGTGGATTG

AAAGTAATCTCTTCTCTCGCGCACCTTCCTGATGCCACAGAGACATTGTCCCTGCAA
GGAGCAGTTGACTCAGTCCTCCACACCTTACAGATGTATCCAGATGACCAAGAAATT
CAGTGTCTGGGCTTACACCTTATGGGATGCTTGATGACAAAGAAGAATTTCTGCATA
GGGACAGGGCACCTCCTGGCAAAAATTCTGGCTTCCACTTTGCAGCGCTTTAAAGAT
GTTGCTGAGGTGCAGACTACAGGATTACAGACAACCCTGTCAATACTTGAGCTGTCA
GTATCTTTCTCCAAGCTGCTAGTGCCTATTCTTTGATGTGGTGATATTTTCATCAGA
TGTCTTCCAGTGTGTAGAACAAAAGGATGAGCAGTTCCTCAATCTATGTTGCAAAT
GCTTTGCAAAAAGTGGCCGTGGATGATGAGCTGAAAAACACCATGCTAGAGAGAGCC
TGCGATCAGAATAACAGCATCATGGTTGAATGTTTGCTCCTCTTGGGAGCTGATGCC
AACCAAGTGAAGGGGGCAACTTCTTTAATCTATCAGGTATGTGAGAAAGAGAGCAG
TCCTAAATTGGTGGAAGTGTGCTTAATGGTGGTTGTCGTGAACAAGATGTACGGAA
GGCCCTGACCGTAAGCATCCAAAAGGGCGACAGCCAGGTCATCAGCTTGCTCCTCA
GGAACTTGCCCTGGACCTGGCCAACAACAGCATTTGCCTTGAGAGATTGTCATAG
GAAAAATTGATCCTTCTTGGCTTGGTCCTTTATTTCCAGATAAGTCATCCAATTTAAG
GAAGCAAACAAACACAGGATCTGTCCTAGCGAGGAAAGTGCTCCGGTATCAGATGA
GAAACACCCTTCAAGAAGGCGTGGCCTCAGGCAGTGACGGCAAGTTTTCTGAAGAC
GCGCTGGCGAAATTTGGAGAATGGACCTTTATTCCCGACTCTTCTATGGACAGTGTG
TTTGGCCAGAGCGATGATCTGGATAGCGAAGGCAGCGAGAGCTCATTCTCGTGAA
GAGGAAGTCCAACCTCAATTAGTGTAGGGGAAGTTTACAGAGATCTAGCTCTGCAGC
GCTGCTCACCAAATGCTCAGAGGCATTCCAATTCGCTGGGTCTGTTTTTGACCATG
AAGACTTACTGAGACGAAAAAGAAAAATACTGTCTTCAGATGAGTCTCTCAGGTCC
TCAAGGCTGCCGTCCCATATGAGGCAATCAGATAGCTCTTCTTCCCTGGCTTCTGAG
AGAGAACACATCACGTCGTTAGACCTATCTGCCAACGAACCTCAAAGATATTGATGCT
CTGAGCCAGAAGTGTTGCCTCAGTAGCCACCTGGAACATCTCACCAAACCTGGAACCT
CACCAGAATTCATCAGGAGCTTCCACAGCAGCTGTGTGAGACTCTGAAGTGTTTG
ATACACTTGGATTTGCACAGTAACAAATTCACCTCATTTCCTCTTTCTGTGTTGAAAA
TGCCACGTATACCAACCTAGATGCCTCTCGAAATGACATCGGGCCAACAGTAGTTT
TAGACCCTGCGATGAAGTGTCCAAGCCTCAAACAGTTGAATCTGTCCTATAACCAGC
TCTCTTCAATCCCAGAGAATCTTGCCCAAGTGGTGGAGAACTTGAGCAGCTCCTAC
TGGAAGGAAATAAAATATCCGGGATTTGCTCTCCCCTGAGCCTGAAGGAACTGAAG
ATTTTAAATCTTAGTAAAAATCACATTCCATCCCTACCTGGAGATTTTCTTGAGGCTT
GTTCAAAAGTCGAGAGTTTCAGTGCTCGCATGAATTTTCTTGCTGCAATGCCTGCCTT
ACCTTCTTCCATAACGAGCTTAAAATTGTCTCAGAACTCTTTCACGTGCATTCCAGA
AGCGATTTTTCAGTCTTCCGCACTTGCGGTCTTGGATATGAGCCACAACAACATTGA
ATGTCTGCCGGGACCTGCACATTGGAAGTCTCTGAACTTAAGGGAACTCATTTTTAG
CAAGAATCAGATCAGCACCTTAGACTTTAGTGAGAACCCACACGTGTGGTCAAGAG
TAGAGAACTGCATCTCTCTCATAATAAACTGAAAGAGATTCTCCTCCAGAAATTGGCT
GCCTTGAAAATCTGACGTCTCTCGACGTCAGTTACAACCTTGGAACCTGAGGTCTTCC
CAAATGAAATGGGGAAAGTTGAGCAAGATATGGGATCTTCCCTTGAGCGGACTGCAT
CTGAATTTTGACTTTAAGCACGTAGGATGCAAGGCCAAAGACATCATAAGGTTTCTA

CAACAACGTCTGAAAAAGGCTGTACCCTACAACCGAATGAAGCTCATGATTGTGGG
AAATACGGGGAGCGGTAAGACCACTTTACTGCAACAACATCATGAAAATGAAGAAAC
CAGAACTTGGCATGCAGGGTGCCACAGTCGGCATAGACGTGCGAGACTGGTCCATC
CAAATACGGGGCAAAGGAGAAAGGACCTGGTTCTAAACGTGTGGGATTTTGCAGG
TCGTGAGGAATTCTACAGCACTCACCCCCACTTCATGACCCAGAGAGCCCTCTACCT
GGCTGTCTATGATCTCAGCAAGGGGCAGGCAGAGGTGGACGCCATGAAGCCCTGGC
TCTTCAATATCAAGGCTCGTGCCTCTTCTTCCCCGGTGATTCTGGTGGGCACACATTT
GGATGTTTCTGATGAGAAGCAGCGGAAAGCGTGCATAAGCAAAATCACGAAGGAAC
TCCTAAATAAGCGAGGATTCCCCACCATCCGGGACTACCACTTTGTGAATGCCACCG
AGGAGTCAGATGCGCTGGCAAAGCTTCGGAAAACCATCATAAATGAGAGCCTTAAT
TTCAAGATCCGAGATCAGCCTGTGGTTGGGCAGCTAATTCCAGATTGCTACGTAGAA
CTGGAGAAAATCATTTTATCAGAGCGGAAAGCTGTGCCGACTGAGTTTCCTGTGATT
AACCGGAAACACCTGTTACAGCTCGTGAACGAACATCAGCTGCAGCTGGATGAGAA
CGAGCTCCCACACGCCGTTCACTTCCTAAATGAGTCGGGAGTTCTTCTGCATTTTCA
AGACCCTGCCCTGCAGCTAAGTGACCTGTACTTTGTGGAACCCAAGTGCTTTGTAA
AGTCATGGCACAGATCTTGACAGTGAAGGTAGACGGCTGTCTGAAACATCCTAAGG
GCATCATTTCCCGGAGAGATGTGGAAAAATTCCTTTCAAAGAAGAAGCGATTCCCG
AAGAACTATATGATGCAATACTTTAAACTATTAGAAAAATTTTCAGATCGCATTGCCA
ATAGGGGAAGAATATCTTCTGGTTCCAAGCAGCTTGTCTGACCACAGGCCAGTGATA
GAGCTCCCCCACTGTGAGAACTCTGAGATCATCATCCGGCTGTACGAAATGCCGTAC
TTTCCCATGGGATTTTGGTCAAGATTGATTAACCGATTACTTGAAATCTCACCCCTCA
TGCTTTCTGGCAGAGAGAGAGCACTACGCCCTAACAGGATGTATTGGCGGCAAGGC
ATCTACTTGAATTGGTCTCCAGAAGCATACTGTCTGGTAGGCTCTGAAGTCTTAGAC
AATCGACCTGAGAGTTTCTTGAAAATCACAGTTCCGTCTTGTAGAAAAGGTTGTATT
CTTCTGGGCCGAGTTGTGGATCATATTGACTCACTCATGGAAGAATGGTTTCCCGGG
TTACTGGAGATTGACATTTGTGGGGAAGGAGAACTCTGTTGAAGAAATGGGCATT
GTACAGTTTTAATGATGGTGAAGAACATCAGAAGATCTTGCTTGATGAGTTGATGAA
GAAGGCTGAAGAAGGAGACCTGTTAATAAATCCAGACCAACCAAGGCTCACTATTC
CAATATCCCAGATTGCTCCGGACTTGATCTTGGCTGACCTGCCTAGAAATATCATGT
TGAACAATGATGAGTTGGAATTTGAGGAAGCACCAGAGTTTCTCTTAGGCGATGGA
AGTTTTGGATCCGTTTATCGAGCTGCCTACGAAGGAGAGGAAGTGCTGTGAAGATT
TTTAATAAGCACACATCTCTTAGGCTGTTAAGACAAGAGTTGGTGGTCCTTTGTCAC
CTTCACCACCCCAGCCTGATATCCTTGCTGGCGGCTGGTATTCGTCCTCGGATGTTGG
TAATGGAGTTGGCCTCCAAAGGTTCTTGGATCGCCTGCTGCAGCAGGACAAAGCC
AGCCTCACCAGAACCCTCCAGCACAGGATCGCGTTGCATGTGGCCGACGGCCTGAG
GTATCTCCACTCAGCCATGATTATTTACCGTGACCTGAAGCCCCACAATGTGCTGCT
TTTTACCCTGTATCCCAATGCTGCCATCATTGCGAAGATTGCGGACTACGGGATCGC
ACAGTACTGCTGCAGGATGGGAATAAAGACATCAGAGGGCACCCCAGGGTTCCGGG
CACCTGAAGTTGCCAGGGGGAATGTCATTTATAACCAACAGGCCGATGTTTATTCTT
TTGGCTTACTACTTCACGATATTTGGACAACCTGGGAGTAGGATTATGGAGGGTTTGA

GGTTCCCAAATGAGTTTGATGAGTTAGCCATACAAGGGAAGTTGCCAGATCCAGTTA
 AAGAATATGGCTGTGCCCCATGGCCTATGGTTGAGAAGTTAATTACAAAGTGTTTGA
 AAGAAAATCCTCAAGAAAGACCCACTTCTGCCCAGGTCTTTGACATTTTGAATTCGG
 CTGAATTAATTTGCCTCATGCGACACATTTTAATACCTAAGAACATCATTGTTGAAT
 GCATGGTTGCCACGAATCTCAATAGCAAGAGTGCGACTCTCTGGTTGGGATGTGGG
 AACACAGAAAAAGGACAGCTTTCCTTATTTGACTTAAACACGGAAAGATACAGCTA
 TGAGGAAGTTGCTGATAGTAGAATACTGTGCTTGGCTTTGGTGCATCTCGCTGCTGA
 GAAAGAGAGCTGGGTTGTGTGCGGGACACAGTCTGGGGCTCTCCTGGTCATCAATG
 TTGAAGAGGAGACAAAGAGACACACCCTGGAAAAGATGACTGATTCTGTCACTTGT
 TTGCATTGCAATTCCTTGCCAAGCAGAGCAAGCAAAGTAACTTTCTTTTGGTGGGA
 ACTGCTGATGGTAACTTAATGATATTTGAAGATAAAGCCGTTAAGTGTAAGGAGCT
 GCCCCCTTGAAGACACTACACATAGGCGATGTCAGTACGCCCTGATGTGCCTGAGC
 GAGTCCCTGAATTCATCTGAAAGACACATCACATGGGGAGGGTGTGGCACAAGGT
 CTTCTCCTTTTCCAATGATTTTACCATTTCAGAACTCATCGAGACAAAAACCAACCA
 GCTGTTTTTCTTACGCAGCTTTCAGCGATTCTAACATCATAGCGCTGGCAGTAGACAC
 AGCCCTGTATATTGCCAAGAAAAACAGCCCTGTCGTAGAGGTGTGGGACAAGAAAA
 CAGAAAAGCTCTGTGAATTAATAGACTGTGTGCACTTCTTAAAGGAGGTGATGGTA
 AAATAAACAAGGAATCGAAACATCAGCTGTCCTACTCTGGGAGGGTGAAGGCCCT
 CTGCCTGCAGAAGAACACGGCTCTCTGGATCGGAACTGGAGGAGGCCACATCTTAC
 TCCTGGATCTTTCTACTCGGCGAGTTATCCGCACCATTACAATTTCTGTGATTCTGT
 GAGAGCCATGGCCACAGCACAAATTAGGAAGCCTTAAGAATGTCATGCTGGTTTTGG
 GGTACAAGCGGAAGAGTACAGAGGGTATCCAAGAACAAAAAGAGATACAATCTTG
 TTTGTCTATTTGGGACCTCAATCTTCCACACGAGGTGCAAAATTTAGAAAAACACAT
 TGAAGTAAGAACAGAATTAGCTGATAAAATGAGGAAAACATCTGTTGAATAGAAAG
 ACATCAGGCAGTCTCGATGTTATATTGAATAAGACATCAGACATCCTCGTCACTATA
 TTGAAAAGGACATCAGACATCCTCGCCAATATGTTAGAAAATGTACTCTTCTTTTA
 AAATATATTTTTTAAATGTTTACATTGAAAAGAGTATGCCTATTCTTTACAAAGTTC
 ATATGTATATGAAGGAATGTGTATGTCTTATGTTTAATTTAATATATGTAAAAATATT
 TATCAGTAAATATGTTTTTAAAAAACTATTTAATTTAGCATTATATTTTCTATACTCCT
 TAACTAATTTGAAGGGATAAACAAAAGAAATCTACAAAGCATTTAATTTCACTATT
 ATACTAAAATTAATAAAAAATATCATGTTTGTGTTTGTCTATGTATTGTGATGATAAAGC
 CTATTTTAAATTGTTGATTAAGACACAGATGTTGCTTGATTATCTATGGACTCAGCG
 GAGTAGAATAAAATATCTGGTCAATTTCCAAGTAAGAGACTCTTTCATATCTTGTTT
 TCAAGTGAATTATCATCATTAATGTAAACTGTCATATTTTCACTAATAAAGATTTTTG
 TTAGCTCAGGAAA

SEQ ID NO:6

Обратный комплемент SEQ ID NO:5

TTTCCTGAGCTAACAAAAATCTTTATTAGTGAAAATATGACAGTTTACATTAA
 TGATGATAATTCACCTTGAAAACAAGATATGAAAGAGTCTCTTACTTGGAATTGACC
 AGATATTTTATTCTACTCCGCTGAGTCCATAGATAATCAAGCAACATCTGTGTCTTA

ATCAACAATTTAAAATAGGCTTTATCATCACAATACATAGCAAAACAAACATGATAT
TTTTATTAATTTTAGTATAAATACTGAAATTAATGCTTTGTAGATTTCTTTTGTTTAT
CCCTTCAAATTAGTTAAGGAGTATAGAAAATATAATGCTAAATTAATAGTTTTTTA
AAACATATTTACTGATAAATATTTTTACATATATTAAATTAACATAAGACATACAC
ATTCCTTCATATACATATGAACTTTGTAAAGAATAGGCATACTCTTTTCAATGTAAA
CATTTTAAAAATATATTTTAAAAAGAAGAGTACATTTTCTAACATATTGGCGAGGAT
GTCTGATGTCCTTTTCAATATAGTGACGAGGATGTCTGATGTCTTATTCAATATAACA
TCGAGACTGCCTGATGTCTTTCTATTCAACAGATGTTTTCTCATTTTATCAGCTAAT
TCTGTTCTTACTTCAATGTGTTTTTCTAAATTTTGCACCTCGTGTGGAAGATTGAGGT
CCCAAATAGACAAACAAGATTGTATCTCTTTTTGTTCTTGGATACCCTCTGTACTCTT
CCGCTTGTACCCCAAAACCAGCATGACATTCTTAAGGCTTCCTAATTGTGCTGTGGC
CATGGCTCTCACAGAATCACAGAAATTGTGAATGGTGCGGATAACTCGCCGAGTAG
AAAGATCCAGGAGTAAGATGTGGCCTCCTCCAGTTCCGATCCAGAGAGCCGTGTTCT
TCTGCAGGCAGAGGGCCTTCACCCTCCCAGAGTAGGACAGCTGATGTTTCGATTCT
TGTTTAGTTTTTACCATCACCTCCTTTAAGAAGTGCACACAGTCTATTAATTCACAGAG
CTTTTCTGTTTTCTTGTCCACACCTCTACGACAGGGCTGTTTTTCTTGGCAATATAC
AGGGCTGTGTCTACTGCCAGCGCTATGATGTTAGAATCGCTGAAAGCTGCGTAAGA
AAACAGCTGGTTGGTTTTTGTCTCGATGAGTTTCTGAATGGTGAAATCATTGGAAAA
GGAGAAGACCTTTGTGCCACACCCTCCCCATGTGATGTGTCTTTCAGATGAATTCAG
GGACTCGCTCAGGCACATCAGGGGCGTACTGACATCGCCTATGTGTAGTGTCTTCAA
GGGGGCAGCTCCTTTACACTTAACGGCTTTATCTTCAAATATCATTAAAGTTACCATC
AGCAGTTCCCACCAAAAGAAAGTTACTTTGCTTGCTCTGCTTGGCAAGGGAATTGCA
ATGCAAACAAGTGACAGAATCAGTCATCTTTTCCAGGGTGTGTCTCTTTGTCTCCTCT
TCAACATTGATGACCAGGAGAGCCCCAGACTGTGTCCCGCACACAACCCAGCTCTCT
TTCTCAGCAGCGAGATGCACCAAAGCCAAGCACAGTATTCTACTATCAGCAACTTCC
TCATAGCTGTATCTTTCCGTGTTTAAGTCAAATAAGGAAAGCTGTCCTTTTTCTGTGT
TCCCACATCCCAACCAGAGAGTCGCACTCTTGCTATTGAGATTCGTGGCAACCATGC
ATTCAACAATGATGTTCTTAGGTATTAATATGTGTGCGCATGAGGCAAATTAATTCAG
CCGAATTCAAATGTCAAAGACCTGGGCAGAAGTGGGTCTTTCTTGAGGATTTTCTT
TCAAACACTTTGTAATTAACCTTCTCAACCATAGGCCATGGGGCACAGCCATATTCTT
TAACTGGATCTGGCAACTTCCCTTGTATGGCTAACTCATCAAACCTATTTGGGAACC
TCAAACCCTCCATAATCCTACTCCCAGTTGTCCAAATATCGTGAAGTAGTAAGCCAA
AAGAATAAACATCGGCCTGTTGGTTATAAATGACATTCCCCCTGGCAACTTCAGGTG
CCCGGAACCCTGGGGTGCCCTCTGATGTCTTTATTCCCATCCTGCAGCAGTACTGTG
CGATCCCGTAGTCCGCAATCTTCGCAATGATGGCAGCATTGGGATACAGGGTAAAA
AGCAGCACATTGTGGGGCTTCAGGTCACGGTAAATAATCATGGCTGAGTGGAGATA
CCTCAGGCCGTCGGCCACATGCAACGCGATCCTGTGCTGGAGGGTTCTGGTGAGGCT
GGCTTTGTCCTGCTGCAGCAGGCGATCCAAGGAACCTTTGGAGGCCAACTCCATTAC
CAACATCCGAGGACGAATACCAGCCGCCAGCAAGGATATCAGGCTGGGGTGGTGAA
GGTGACAAAGGACCACCAACTCTTGTCTTAACAGCCTAAGAGATGTGTGCTTATTAA

AAATCTTCACAGCCACTTCCTCTCCTTCGTAGGCAGCTCGATAAACGGATCCAAAAC
TTCCATCGCCTAAGAGAAACTCTGGTGCTTCCTCAAATTCCAACATCATATTGTTCAA
CATGATATTTCTAGGCAGGTCAGCCAAGATCAAGTCCGGAGCAATCTGGGATATTG
GAATAGTGAGCCTTGGTTGGTCTGGATTTATTAACAGGTCTCCTTCTTCAGCCTTCTT
CATCAACTCATCAAGCAAGATCTTCTGATGTTCTTCACCATCATTA AAAACTGTACAA
TGCCCATTTCTTCAACAGAGTTTCTCCTTCCCCACAAATGTCAATCTCCAGTAACCCG
GGAAACCATTCTTCCATGAGTGAGTCAATATGATCCACAACCTCGGCCCAGAAGAAT
ACAACCTTTTCTACAAGACGGAACCTGTGATTTTCAAGAAACTCTCAGGTCTGATTGTC
TAAGACTTCAGAGCCTACCAGACAGTATGCTTCTGGAGACCAATTCAAGTAGATGCC
TTGCCGCCAATACATCCTGTTAGGGCGTAGTGCTCTCTCTCTGCCAGAAAGCATGAA
GGGTGAGATTTCAAGTAATCGGTAAATCAATCTTGACCAAAATCCCATGGGAAAGT
ACGGCATTTCGTACAGCCGGATGATGATCTCAGAGTTCTCACAGTGGGGGAGCTCTA
TCACTGGCCTGTGGTCAGACAAGCTGCTTGAACCAGAAGATATTCTTCCCCTATTG
GCAATGCGATCTGAAATTTTTTCTAATAGTTTAAAGTATTGCATCATATAGTTCTTCGG
GAATCGCTTCTTCTTTGAAAGGAATTTTTCCACATCTCTCCGGGAAATGATGCCCTTA
GGATGTTTCAGACAGCCGTCTACCTTCACTGTCAAGATCTGTGCCATGACTTTACAA
AGCCACTTGGGTTCCACAAAGTACAGGTCACTTAGCTGCAGGGCAGGGTCTTGAAA
ATGCAGAAGAACTCCCGACTCATTTAGGAAGTGAACGGCGTGTGGGAGCTCGTTCT
CATCCAGCTGCAGCTGATGTTTCGTTACGAGCTGTAACAGGTGTTTCCGGTTAATCA
CAGGAAACTCAGTCGGCACAGCTTTCCGCTCTGATAAAATGATTTTCTCCAGTTCTA
CGTAGCAATCTGGAATTAGCTGCCCAACCACAGGCTGATCTCGGATCTTGAAATTAA
GGCTCTCATTTATGATGGTTTTCCGAAGCTTTGCCAGCGCATCTGACTCCTCGGTGGC
ATTCACAAAGTGGTAGTCCCGGATGGTGGGGAATCCTCGCTTATTTAGGAGTTCCTT
CGTGATTTTGCTTATGCACGCTTTCCGCTGCTTCTCATCAGAAACATCCAAATGTGTG
CCCACCAGAATCACCGGGGAAGAAGAGGACAGAGCCTTGATATTGAAGAGCCAGG
GCTTCATGGCGTCCACCTCTGCCTGCCCCTTGCTGAGATCATAGACAGCCAGGTAGA
GGGCTCTCTGGGTCATGAAGTGGGGGTGAGTGCTGTAGAATTCCTCACGACCTGCAA
AATCCACACGTTTAGAACCAGGTCCTTTCTCCTTTTGCCCCGTATTTGGATGGACCA
GTCTCGCACGTCTATGCCGACTGTGGCACCCCTGCATGCCAAGTTCCTGGTTTCTTCATT
TTCATGAGTTGTTGCAGTAAAGTGGTCTTACCGCTCCCCGTATTTCCACAATCATGA
GCTTCATTTCGGTTGTAGGGTACAGCCTTTTTTCAGACGTTGTTGTAGAAACCTTATGAT
GTCTTTGGCCTTGCATCCTACGTGCTTAAAGTCAAAATTCAGATGCAGTCCGTCCAA
GGGAAGATCCCATATCTTGCTCAACTTCCCCATTTCAATTTGGGAAGGACCTCAGTTC
CAAGTTGTAACCTGACGTCGAGAGACGTCAGATTTTCAAGGCAGCCAATTTCTGGAG
GAATCTCTTTCAGTTTATTATGAGAGAGATGCAGTTTCTCTACTCTTGACCACACGTG
TGGGTTCTCACTAAAGTCTAAGGTGCTGATCTGATTCTTGCTAAAAATGAGTTCCCTT
AAGTTCAGAGACTTCCAATGTGCAGGTCCCGGCAGACATTCAATGTTGTTGTGGCTC
ATATCCAAGGACCGCAAGTGCGGAAGACTGAAAATCGCTTCTGGAATGCACGTGAA
AGAGTTCTGAGACAATTTTAAGCTCGTTATGGAAGAAGGTAAGGCAGGCATTGCAG
CAAGAAAATTCATGCGAGCACTGAAACTCTCGACTTTTGAACAAGCCTCAAGAAAA

TCTCCAGGTAGGGATGGAATGTGATTTTTACTAAGATTTAAAATCTTCAGTTCCTTCA
GGCTCAGGGGAGAGCAAATCCCGGATATTTTATTTCCCTTCCAGTAGGAGCTGCTCAA
GTTTCTCCACCACTTGGGCAAGATTCTCTGGGATTGAAGAGAGCTGGTTATAGGACA
GATTCAACTGTTTGAGGCTTGGACACTTCATCGCAGGGTCTAAAACTACTGTTGGCC
CGATGTCATTTTCGAGAGGCATCTAGGTTGGTGATACGTGGCATTTTCAACACGAAAG
AGGGAAATGAGGTGAATTTGTTACTGTGCAAATCCAAGTGTATCAAACACTTCAGA
GTCTCACACAGCTGCTGTGGGAAGCTCGTGAGTGAATTCTGGTGAAGTTCAGTTTG
GTGAGATGTTCCAGGTGGCTACTGAGGCAACACTTCTGGCTCAGAGCATCAATATCT
TTGAGTTCGTTGGCAGATAGGTCTAACGACGTGATGTGTTCTCTCTCAGAAGCCAGG
GAAGAAGAGCTATCTGATTGCCTCATATGGGACGGCAGCCTTGAGGACCTGAGAGA
CTCATCTGAAGACAGTATTTTTCTTTTTCTGCTCTCAGTAAGTCTTCATGGTCAAAAACA
GGACCCAGCGAATTGGAATGCCTCTGAGCATTGTTGGTGAGCAGCGCTGCAGAGCTAG
ATCTCTGTAACTTCCCCTACACTAATTGAGTTGGACTTCCTCTTCACGAGAAATGA
GCTCTCGCTGCCTTCGCTATCCAGATCATCGCTCTGGCCAAACACACTGTCCATAGA
AGAGTCGGGAATAAAGGTCCATTCTCCAAATTTTCGCCAGCGCGTCTTCAGAAAACCT
GCCGTCCTGCCTGAGGCCACGCCTTCTTGAAGGGTGTTTCTCATCTGATACCGGAG
CACTTTCCTCGCTAGGACAGATCCTGTGTTTGTGTTGCTTCCTTAAATTGGATGACTTA
TCTGGAAATAAAGGACCAAGCCAAGAAGGATCAATTTTTCTATGCCAAATCCTCCA
AGGCAAATGCTGTTGTTGGCCAGGTCCAGGGCAAGTTTCCTGAGGAGCAAGCTGAT
GACCTGGCTGTCGCCCTTTTGGATGCTTACGGTCAGGGCCTTCGGTACATCTTGTTCA
CGACAACCACCATTAAGCAACAGTTCCACCAATTTAGGACTGCTCTCTTCTCACAT
ACCTGATAGATTAAAGAAGTTGCCCCCTTCACTTGGTTGGCATCAGCTCCCAAGAGG
AGCAAACATTCAACCATGATGCTGTTATTCTGATCGCAGGCTCTCTCTAGCATGGTG
TTTTTCAGCTCATCATCCACGGCCACTTTTGCAAAGCATTGCAACATAGATTGAGG
AACTGCTCATCCTTTTGTCTACAACACTGGAAGACATCTGATGAAATATCACCACA
TCAAAGGAATAGTGCACTAGCAGCTTGGAGAAAGATACTGACAGCTCAAGTATTGA
CAGGGTTGTCTGTAATCCTGTAGTCTGCACCTCAGCAACATCTTTAAAGCGCTGCAA
AGTGGAAGCCAGAATTTTTGCCAGGAGGTGCCCTGTCCCTATGCAGAAATTCTTCTT
TGTCATCAAGCATCCCATAAAGGTGTAAGCCCAGACACTGAATTTCTTGGTCATCTGG
ATACATCTGTAAGGTGTGGAGGACTGAGTCAACTGCTCCTTGCAGGGACAATGTCTC
TGTGGCATCAGGAAGGTGCGCGAGAGAAGAGATTACTTTCAATCCACATTTCTGAAT
CCCAGGATTCCCAATGAACCTGTTTCAGAGCGACTAGAACCAGCTTGTGGATGTCAGT
CCTGAAACACTGTTTTCTGAGCACATTTGGTCTGCATTGAGAGTCCTCCCTGGATTCT
TCCAATAGTCCTGGCACAACGAAATGCAAGATAGCTCGCAGCGCCTCCAGCTGGAC
TGACAGAGACGTTCCGTGGGCTTTCATCACTGTTAGTATTTTAGGGACCACTGCTGC
CATTGTATCCAGAGAAGGGTACTTCCTTCAAACAGGTGACTCAGCATCTTGCAGCC
ACTCTCTGCCACCTCAGGCGCATGGGCATGCTTCTGCATCAATTCCAAGACATTTCAG
GTATACTCCTTTTGCCAGCAGGATTTTCCTGAAATTAACATTTTGTTCGAAGAGAGTG
GACAGAGCATGTGCAGCTGCTTGGGAAGACATCTTTGGAAGAAGAGTGCATCAGCAT
AGACAGCATCACTTCCCTGTGCGCAGGGAAGTGGCCATCTTCATCTCCGATCTTCTC

ATGCAAACCTGTTCTGGTACATAAGGAGGTTATTTAGTGCCAGCAGGCAGCCTCCTG
CACGTGTTTGTCTTTTCGATGGCGCACCAGGGCTTTATAGCAGGGTTCCAGCCAGAA
AAGCTTCTCACTGTCTTCCTCTTCGCTCTGCTCTTGAGTCTCACTTCTTTCTCCAAGT
CTTGGTTTAAGAAAATAGTCTCAGTGAGGAGTGCTAAACAGCTGAGTGCAGAGATC
TGTAAGGCTGCGTTCTCAGGATACTGTCGGACCGCTTTCACCACAAAGACATGCACT
TCGTTCAACACCAGGATGTTGAAAAAGTTACCTAATGTAAGCTTCTGGAACAAGGA
GCAGCTCACCTCTTGGATGTTTTTCATTGGTGGGGAAGGCTTTCATGGCCTCCACCAC
AAGATTGTAGCACCGGACATTCCCCTCATGAGGACCTCTACATTGCTGCATGTAAC
CGCCAGGGAATGCAAGCAGCAAAGTACGTGGTACACAATCTCCTTGTCCCTTCTGAA
GCTGCCGAACGTACTCAGCAGTATCGTGTAATCTTTGTTCTCCACAACTCAGTCAG
CTGTTCTCTCGGAACTCTCTCAAAAAGCACGTGTAAAGCTTTGCATCCCAGTTTTTGT
GACTTCATCATTGGCTGAATATCTGTGCATGGCATCAAAAATTAACAAGAAAATATC
ACATTCTTCATCCAGTATCAGCAAGGTGAGTTTACCTGAATCTAGGAGGAGATCCAA
GGCTTTTAGTCCAACCTATTGACAGGTTTACATTGGCGTGATGAACAGTTAACATTTT
AAGAATCAGCCGGTGAATACCAAGGACTTCCCAATCATTTCCAATATCCTGGGGTCC
TATTAAGCTTTGCAATGTCCCTGGACAGACTTCTATTAATTTGCACAGAAGTGACCA
CCCCGCCTGCTGTACACTGGCAACTCTCATGTAGGAGTCCAGGACAATCAACAGAG
GCACGTGGAAATTTTTATCTTCAAATAACTTGGAGGCGCGGTCCGAGTAGGTGAACA
CCAGCATGTCCTCCAGGAGCTGAAGCAACGTCTCGATCTGCTTGCCTTCTGGACAT
TATTCAGCCTGACTATCAACTTCTTCAGAGCCTCCTCCTCCTCTTCTCTTCGCAGCC
CTGACAGGCGCCACTGGCCATGGTGCAGCCGGCGGGGACTGCGGCGAGCTGGGACG
GCTCCTGCTCTCAGAGCTGCTC

SEQ ID NO: 7

>NM_001191789.1 мРНК богатой лейциновыми повторами киназы 2 (Lrrk2) *Rattus norvegicus*

ATGGCCAGTGGCGCCTGTCAGGGCTGCGACGAGGAAGAGGAGGAGGAGGCT
CTGAAGAAGTTGATAGTCAGGCTGAATAATGTCCAGGAAGGCAAGCAGATCGAGAC
GTTGCTCCAGCTCCTGGAGGACATTCTGGTGTTCACCTACTCCGACCGCGCCTCCAA
GTTATTTGAAGGCAAAAATGTCCACGTGCCTCTGTTGATAGTCCTGGACTCCTACAT
GAGAGTCGCCAGTGTGCAGCAGGTGGGGTGGTCACTTCTGTGCAAATTAATAGAAG
TCTGTCCAGGGACATTGCAAAGCTTAATAGGACCCCAGGATATTGGGAATGATTGG
GAAGTCCTTGGTATTCACCGACTGATTCTTAAAATGTAACTGTTTCATCATGCCAAC
GTAAACCTGTCAATAGTTGGACTAAAAGCCTTAGATCTCCTCCTAGATTACGGTAAA
ATTACTCTGCTGATACTGGATGAAGAATGTGATGTTTTCTGTTAATTTTTGATGCCA
TGCACAGATATTCAGCCAACGAGGAAGTCCAGAAGCTTGCGTGCAAGGCTTTACAT
GTGCTGTTTCGAGAGAGTGTCCGAGGAGCAACTGACTGAGTTTGTGGAGAACAAGA
TTACATGACCCTGCTGAGTACGTTCCGCAGCTTCAAGAGGGACGAGGAGATTGTGC
ACCATGTAATCTGCTGCCTGCATTCTCTGGCCGTCACTTGCAGCAATGTGGAGGTCC
TCATGAGTGGGAATGTCAGGTGTTACAATATTGTGGTGGGAAGCCATGAAAACATTCC
CCACCAGTGAAAACATTCAAGAGGTGAGCTGCTCCTTGCTCCACAAGCTTACATTAG

GTAATTTTTTCAACATCCTGGTGTTGAACGAAGTCCATGTCTTTGTGGTGAAAGCCG
TCCAGCGGTATCCCGAGAACGTAGCCTTACAGATCTCTGCACTCAGCTGCTTAGCCC
TCCTCACCGAGACTATTTTCTTAAACCAAGACCTGGAAGAAAGAAGTGAGACTCAG
GAAAACAGCGATGAGGACAGTGAGAAGCCTTTCTGGTTGGAACCCTGCTATAAAGC
CCTGATGCGCCATCGAAAGAACAAACACGTGCAGGAGGCCGCCTGCTGGGCCCTAA
ATAATCTCCTCATGTACCAGAGCAGTTTGCACGAGAAGATTGGAGATGAAGATGGC
CAGTTCCCGGCGCACAGGGAAGTGATGCTGTCTATGCTGATGCACTCTTCTTCCAAA
GACGTCTTCCAAGCAGCTGCGCATGCTCTGTCCACTCTCTTGGAACAAAACGTTAAT
TTCAGGAAAATCCTGCTTGCAAAAGGAGTGACCTGAATGTCTTGAGATTGATGCAG
CGGCACGCCCAGGTTCTGAGGTGGCAGAGAGTGGCTGCAAGATGCTGAGTCATCT
GTTTGAAGGAAGCAACCCTTCTTTGGATACAGTGGCGGCAGTGATCCCCAAAATACT
AACAGTGATGAGAACCCATGGAACGTCTCTGTCAGTCCAGCTGGAGGCACTGCGAG
CTCTTCTGCATTTTGTGGTGCCGGGAGTATCAGAAGATTCCAGGGATGACTCGCGAT
GCCAACCAAACGTGCTCAGAACACAGTGCTTCAGGACTGACATCCACAAGCTGGTT
CTAGCCGCTCTGAACAGGTTTATTGGGAATCCCGGGATTTCAGAAATGTGGATTGAA
AGTCATCTCTTCTTTCGCACATCTTCCCGATGCCTTAGAGATGTTATCCCTGCATGGA
GCAGTTGACTCAGTCCTCCATACCTTACAGATGTATCCAGATGACCAAGAAATTCAG
TGTCTGGGCTTACACCTTATGGGATGCCTGATGACAAAGAAGAATTTCTGCATAGGG
ACAGGGCACCTCCTGGCAAAAATTCTGGCTTCCACCTTGACGCGATTTAAAGATGTT
GCTGAAGTACAGACTACAGGATTACAGACGGTCTTGTCAATGCTTGACCTGTCCGTA
TCTTTCTCCAAGCTGCTAGTGCATATTCAATTTGATGTGGTGATGTTTCATCAGATGT
CTTCCGGTGTCTGGAACAAAAGGATGAGCAGTTTCTCAACTTATGCTGCAAATGCT
TTGCAAAAGTGGCTGTGGATGATGAGCTGAAAAGCAAGATGCTAGAGAGAGCCTGC
GATCAGAACAAACAGCATCATGGTCGAATGTTTGCTCCTCTTGGGAGCCGATGCCAAT
CAAGCGAAGGGGGCAACTTCTTTAATCTATCAGGTATGTGAGAAAGAGAGCAGCCC
TAAATTGGTGGAACCTATTGCTTAACAGTGGGTGCCGTGAACAAGATGTACGGAAAG
CCCTGACAGTAAGCATCCAAAAGGGCGACAACCAGGTCATCAGCTTACTCCTGAGG
AGACTTGCCCTGGACCTGGCCAACAACAGCATTTGCCTTGAGGATTTTGCATAGGA
AACTTGATCCTTCTTGGCTAGGCCCTTTATTTCCAGATAAGTCATCTAATTTGAGGA
AACAAACAAATGCGGGGTCTGTCCTAGCGAGGAAAGTGCTCCGGTATCAGATGAGA
AACACTCTTCAAGAAGGCGTGGCCTCAGGCAGTGAGGGCAACTTCTCTGAGGATGC
GCTGGCGAAATTTGGCGAATGGACCTTATTCCCGACTCTTCTATGGACAGTGTGTT
TGGCCAGAGTGACGATCTGGATAGCGAAGGCAGCGAGAGCTCCTTTCTGGTGAAGA
AGAAGTCCAACCTCAGTTAGTGTAGGAGAAGTTTACAGGGACCTAGCTCTGCAGCGC
TGCTCACCAAATGCTCAGAGGCACTCCAGTTCCTTGGGTCTGTTTTTGATCACGAA
GATCTACTGAGACGAAAAAGAAAAATACTGTCCTCAGATGAGTCTCTCAGATCCTC
AAGGCTGCAGTCCCATACGAGACAATCAGATAGCTCTTCTTCTCTGGCTTCTGAGAG
AGAACACATCACGTCTTTAGACCTTTCTGCCAACGAACTGAAAGATATTGATGCTCT
GGGCCAGAAGTGTTGCCTCAGTAGCCACCTGGAGCATCTCACCAAGCTGGAACCTC
ACCAGAATTCCTCACGAGCTTCCCACAACAGCTGTGTGAGACTCTGAAGTGCTTGA

CACATCTGGATTTGCACAGTAACAAATTGCGCACCTTTCCCTCCTTCATGTTGAAAAT
GCCAAGTGTTATCCACCTAGACGCCTCTCGAAATGACATCGGACCAACAGTTGTTTT
AGACCCTGTGGTGAAGTGTCCAAGCCTCAAACAGTTTAACTGTCTACAACCAGCT
CTCTTCCATCCCAGAGAACCTGGACCAAGTGGTGGAGAACTGGAGCAGCTCCTAC
TGGAAGGAAACAAAATATCCGGGATTTGTTCTCCCTTGAGCCTGAAGGAACTGAAG
ATTTTAAACCTTAGTAAAAACCATTCATCCCTACCTGAAGACTTTCTCGAGGCT
TGCCCGAAAGTGGAGAGCTTCAGTGCCCGCATGAATTTTCTCGCTGCAATGCCTGCC
TTACCGTCTTCCATAACTAGCTTAAAATTGTCTCAAACTCTTTCACGTGCATTCCAG
AAGCGATCTTCAGTCTTCCACACTTGCGGTCCTTGGATATGAGTCACAACAACATTG
AACACCTGCCGGGACCTGCACATTGGAAGTCTCTGAACTTAAGGGAACTCATTTTTA
GCAAGAATCAGATCAGCACCTTAGACTTGAGCGAAAACCCACACATATGGTCAAGA
GTAGAGAAGCTGCATCTCTCTCATAATAAACTGAAAGAGATTCTCCAGAAATTGGC
CGTCTTGAAAACCTGACATCTCTTGATGTCAGTTACAACCTGGAAGTGAAGGTCCTTT
CCAAACGAAATGGGGAAGTTAAGCAAAATATGGGATCTTCCCTTGGATGGACTGCA
CCTCAACTTTGACTTTAAGCACATAGGATGCAAAGCCAAAGACATCATAAGGTTTCT
ACAACAACGTCTGAAAAAGGCCGTGCCCTACAACCGAATGAAGCTCATGATTGTGG
GCAATACGGGGAGTGGTAAGACCACTCTACTGCAGCAGCTCATGAAAATGAAGAAA
TCAGAACTCGGCATGCAGGGCGCCACGGTTGGCATAGACGTGCGAGACTGGCCCAT
CCAAATACGAGGCAAAAGGAAAAAGGACCTTGTTCTAAACGTGTGGGACTTTGCAG
GCCGTGAGGAATTCTACAGCACTCACCCCCACTTCATGACCCAGAGAGCCCTGTACC
TGGCTGTCTACGACCTCAGCAAGGGGGCAGGCGGAGGTGGATGCCATGAAGCCCTGG
CTCTTCAACATCAAGGCTCGTGCCCTTTCTTCCCCGGTGATTCTGGTGGGCACACATT
TGGATGTTTCTGATGAGAAGCAGCGCAAAGCCTGCATAGGCAAAATCACGAAGGAA
CTCCTTAATAAGCGAGGATTCCCCACCATCCGGGACTACCACTTCGTGAATGCCACT
GAGGAGTCGGATGCGCTGGCAAAGCTCCGGAAAACCATCATAAATGAGAGTCTTAA
TTTCAAGATCCGAGATCAGCCCGTGGTTGGGCAGCTAATTCCAGATTGCTACGTAGA
ACTGGAGAAAATAATCTTATCGGAGCGTAAAGCTGTACCAACGGAGTTTCTGTAAAT
TAACCGGAAACACTTACTCCAGCTGGTGAAGGAACACCAGCTGCAGCTGGATGAGA
ACGAGCTCCCCCACGCTGTTCACTTCTGAATGAGTCAGGAGTTCTTCTGCATTTTCA
AGACCCCGCATTGCAGCTGAGTGACCTGTACTTTGTGGAACCCAAGTGGCTTTGTAA
AGTCATGGCACAGATTTTGACCGTGAAAGTGGACGGCTGCCTGAAGCATCCTAAGG
GCATCATTTACGGAGAGATGTGGAAAAATTCCTTTCCAAGAAAAAGCGATTCCCTA
AGAACTACATGGCGCAGTACTTCAAACCTTTTAGAAAAATTTAGATCGCATTACCAA
TAGGGGAAGAATATCTGCTGGTTCCAAGCAGCTTATCTGACCACAGGCCAGTGATA
GAGCTCCCCCACTGTGAGAACTCTGAGATCATCATCCGGCTGTATGAAATGCCATAC
TTTCCAATGGGATTTTGGTCAAGATTGATTAACCGATTACTTGAAATCTCACCTTTCA
TGCTTTCTGGAAGAGAGAGAGCACTACGCCCAAACCGAATGTACTGGCGCCAAGGC
ATCTACTTGAATTGGTCTCCAGAAGCCTACTGTCTGGTGGGCTCTGAAGTCTTAGAC
AGTCGCCCAGAGAGTTTCTTGAAAATCACAGTTCCATCTTGTAGAAAAGGTTGTATT
CTTTTGGGCCGAGTTGTGGATCATATTGACTCACTCATGGAAGAATGGTTTCCTGGA

TTGCTGGAGATTGACATTTGTGGGGAAGGAGAACTTTGTTGAAAAAATGGGCATT
GTATAGTTTTAATGATGGCGAAGAACATCAGAAGATCTTGCTTGATGAGTTGATGAA
GAAGGCTGAAGAAGGAGACCTGTTAATAAAATCCAGATCAACCAAGGCTCACCATT
CAATATCCCAGATTGCTCCGGACTTGATCTTGGCTGACCTGCCTAGAAATATTATGT
TGAACAATGACGAACTGGAATTTGAGGAAGCACCCGAGTTTCTCTTAGGTGATGGA
AGTTTCGGATCAGTTTATCGAGCTGCCTACGAAGGAGAGGAAGTGGCTGTGAAGAT
TTTTAATAAGCACACATCGCTTAGGCTGTTAAGACAAGAGTTGGTGGTACTCTGTCA
TCTCCACCATCCCAGCTTGATCTCCCTGTTGGCGGCTGGGATTCGTCTCGGATGCTG
GTAATGGAGTTGGCCTCCAAGGGTTCCTTGATCGCTGCTGCAGCAGGACAAAGC
CAGCCTCACCCGGACCCTCCAGCACAGAATCGCATTGCATGTGGCCGATGGCCTGA
GATATCTGCACTCGGCCATGATTATTTACCGTGATCTGAAGCCCCACAACGTGCTAC
TCTTCACCCTGTATCCCAATGCCGCCATCATTGCGAAGATTGCGGACTACGGGATTG
CACAGTACTGCTGTAGGATGGGAATAAAGACCTCAGAGGGCACCCAGGGTTCCGA
GCACCTGAAGTTGCCAGAGGAAATGTCATTTATAACCAACAGGCTGATGTTTATTCT
TTTGGCTTACTACTTCATGATATCTGGACAACTGGGAATAGAATCATGGAGGGTTTG
AGGTTTCCAAATGAGTTTGATGAACTGGCCATACAAGGGAAATTGCCAGACCCAGT
TAAAGAATATGGCTGTGCCCCGTGGCCTATGGTTGAGAAGTTAATTACAAAATGTTT
GAAAGAAAATCCTCAAGAAAGACCCACTTCTGCCCAGGTCTTTGACATTTTGAATTC
AGCTGAGTTAATTTGCCTCATGCGACACATTTTCATACCTAAGGACATCACTGTTGA
ATGCATAGCTGCTACAAACCTCAATAGCAAGCGAGCGACTCTCTGGTTGGGCTGTGG
GAACACAGAAAAAGGGCAGCTTTCCTTACTTGACTTGAACACGGAAAGATACAGCT
ATGAGGAAGTTACTGATAGTAGAATACTGTGCCTGGCTTTGGTGCATCTTGCTGCTG
AGAAAGAGAGCTGGGTTGTGTGTGGGACACAGTCCGGAGCTCTCCTGGTCATCAAT
GCTGAAGATGAGACAAGGAGACACACCCTCGACAAGATGACTGATTCTGTTACTTG
CTTGTATTGCAATTCCTTTGCCAAGCAGAGCAAGCAAAGTCACTTCCTTTTGGTGGG
AACTGCTGATGGCAACTTAATGATATTTGAAGATAAGACCATTAAGTGTAAGGAG
CTGCCCCATTGAAGACACTACACATAGGCGATGTCAGTACGCCCTGATGTGCCTGA
GCGAGTCCATGAATTCATCTGAAAGACACATCACATGGGGAGGGTGTGGCACAAAG
ATCTTCTCCTTTTCCAATGATTTACCATTTCAGAACTCATCGAGACAAGAACCAAC
CAGCTGTTTTCTTACTCAGCGTTCAGCGATTCTAACATCATAGCGGTGGCAGTGGAC
ACAGCGCTTTATATTGCCAAGAAAAACAGCCCTGTCGTAGAGGTGTGGGACAAGAA
GACAGAAAAACTCTGTGAACTAATAGACTGTGTGCACTTCTTAAAGGAGGTGATGG
TGAAAATAAACAAAGGACTCGAAGCACAAGCTGTCCTACTCTGGGAGGGTGAAGGCA
CTCTGCCTGCAGAAGAACACAGCTCTCTGGATCGGAACTGGAGGAGGCCACATCTT
ACTCCTGGATCTTTCTACACGGCGAGTCATCCGCACCATCCACAATTTCTGTGATTCC
GTGAGAGCCATGGCCACAGCTCAGTTAGGCAACCTTAAAAATGTCATGCTGGTTTTG
GGGTACAAGCGGAAGAGTACAGAAGGAACCCAAGAACAAAAAGAGATACAATCTT
GTTTGTCTATTTGGGACCTCAATCTTCCACATGAAGTGCAAACTTAGAAAAACACA
TTGAAGTAAGAACAGAACTGGCTGATAAAATGAGGAAAACATCTGTCTGAATAG

Обратный комплемент SEQ ID NO:7

CTATTCGACAGATGTTTTCTCATTTTATCAGCCAGTTCTGTTCTTACTTCAAT
GTGTTTTTCTAAGTTTTGCACTTCATGTGGAAGATTGAGGTCCCAAATAGACAAACA
AGATTGTATCTCTTTTTGTTCTTGGGTTCTTCTGTACTCTTCCGCTTGTACCCCAAAA
CCAGCATGACATTTTTAAGGTTGCCTAACTGAGCTGTGGCCATGGCTCTCACGGAAT
CACAGAAATTGTGGATGGTGC GGATGACTCGCCGTGTAGAAAGATCCAGGAGTAAG
ATGTGGCCTCCTCCAGTTCCGATCCAGAGAGCTGTGTTCTTCTGCAGGCAGAGTGCC
TTCACCCTCCCAGAGTAGGACAGCTTGTGCTTCGAGTCCTTGTTTATTTTCACCATCA
CCTCCTTTAAGAAGTGCACACAGTCTATTAGTTCACAGAGTTTTTCTGTCTTCTTGTC
CCACACCTCTACGACAGGGCTGTTTTTCTTGGAATATAAAGCGCTGTGTCCACTGC
CACCGCTATGATGTTAGAATCGCTGAACGCTGAGTAAGAAAACAGCTGGTTGGTTCT
TGTCTCGATGAGTTTCTGAATGGTGAAATCATTGGAAAAGGAGAAGATCTTTGTGCC
ACACCCTCCCCATGTGATGTGTCTTTCAGATGAATTCATGGACTCGCTCAGGCACAT
CAGGGGCGTACTGACATCGCCTATGTGTAGTGTCTTCAATGGGGCAGCTCCTTTACA
CTTAATGGTCTTATCTTCAAATATCATTAAGTTGCCATCAGCAGTTCCACCAAAAAG
GAAGTGACTTTGCTTGCTCTGCTTGGCAAAGGAATTGCAATACAAGCAAGTAACAG
AATCAGTCATCTTGTCGAGGGTGTGTCTCCTTGTCATCTTCAGCATTGATGACCAG
GAGAGCTCCGGACTGTGTCCCACACACAACCCAGCTCTCTTTCTCAGCAGCAAGATG
CACCAAAGCCAGGCACAGTATTCTACTATCAGTAACCTTCCTCATAGCTGTATCTTTC
CGTGTTCAAGTCAAGTAAGGAAAGCTGCCCTTTTTCTGTGTTCCACAGCCCAACCA
GAGAGTCGCTCGCTTGCTATTGAGGTTTGTAGCAGCTATGCATTCAACAGTGATGTC
CTTAGGTATGAAAATGTGTCGCATGAGGCAAATTAACCTCAGCTGAATTCAAAATGTC
AAAGACCTGGGCAGAAGTGGGTCTTTCTTGAGGATTTTCTTTCAAACATTTTGTAAT
TAACTTCTCAACCATAGGCCACGGGGCACAGCCATATTCTTTAACTGGGTCTGGCAA
TTTCCCTTGATGGCCAGTTCATCAAACCTCATTTGGAAACCTCAAACCCTCCATGATT
CTATTCCCAGTTGTCCAGATATCATGAAGTAGTAAGCCAAAAGAATAAACATCAGC
CTGTTGGTTATAAATGACATTTCTCTGGCAACTTCAGGTGCTCGGAACCCTGGGGT
GCCCTCTGAGGTCTTTATTCCCATCCTACAGCAGTACTGTGCAATCCCGTAGTCCGC
AATCTTCGCAATGATGGCGGCATTGGGATACAGGGTGAAGAGTAGCACGTTGTGGG
GCTTCAGATCACGGTAAATAATCATGGCCGAGTGCAGATATCTCAGGCCATCGGCC
ACATGCAATGCGATTCTGTGCTGGAGGGTCCGGGTGAGGCTGGCTTTGTCTGCTGC
AGCAGGCGATCCAAGGAACCCTTGAGGCCAACTCCATTACCAGCATCCGAGGACG
AATCCCAGCCGCCAACAGGGAGATCAAGCTGGGATGGTGGAGATGACAGAGTACCA
CCAACTCTTGTCTTAACAGCCTAAGCGATGTGTGCTTATTA AAAATCTTCACAGCCA
CTTCTCTCCTTCGTAGGCAGCTCGATAAACTGATCCGAACTTCATCACCTAAGA
GAAACTCGGGTGCTTCCTCAAATTCCAGTTCGTCATTGTTCAACATAATTTCTAGG
CAGGTCAGCCAAGATCAAGTCCGGAGCAATCTGGGATATTGGAATGGTGAGCCTTG
GTTGATCTGGATTTATTAACAGGTCTCCTTCTTCAGCCTTCTTCATCAACTCATCAAG
CAAGATCTTCTGATGTTCTTCGCCATCATTA AAACTATACAATGCCCATTTTTTCAAC
AAAGTTTCTCCTTCCCCACAAATGTCAATCTCCAGCAATCCAGGAAACCATTCTTCC

ATGAGTGAGTCAATATGATCCACAACCTCGGCCCAAAGAATACAACCTTTTCTACAA
 GATGGAACCTGTGATTTTCAAGAACTCTCTGGGCGACTGTCTAAGACTTCAGAGCCC
 ACCAGACAGTAGGCTTCTGGAGACCAATTCAAGTAGATGCCTTGGCGCCAGTACATT
 CGGTTTGGGCGTAGTGCTCTCTCTCTCCAGAAAGCATGAAAGGTGAGATTTCAAGT
 AATCGGTAAATCAATCTTGACCAAAATCCCATTTGGAAAGTATGGCATTTCATACAGC
 CGGATGATGATCTCAGAGTTCTCACAGTGGGGGAGCTCTATCACTGGCCTGTGGTCA
 GATAAGCTGCTTGAACCAGCAGATATTCTTCCCCTATTGGTAATGCGATCTGAAAT
 TTTTCTAAAAGTTTGAAGTACTGCGCCATGTAGTTCTTAGGGAATCGCTTTTTCTTGG
 AAAGGAATTTTTCCACATCTCTCCGTGAAATGATGCCCTTAGGATGCTTCAGGCAGC
 CGTCCACTTTACGGTCAAAATCTGTGCCATGACTTTACAAAGCCACTTGGGTTCCA
 CAAAGTACAGGTCACTCAGCTGCAATGCGGGGTCTTGAAAATGCAGAAGAACTCCT
 GACTCATTACAGGAAGTGAACAGCGTGGGGGAGCTCGTTCTCATCCAGCTGCAGCTG
 GTGTTCTTACCAGCTGGAGTAAGTGTTTCCGGTTAATTACAGGAACTCCGTTGG
 TACAGCTTTACGCTCCGATAAGATTATTTTCTCCAGTTCTACGTAGCAATCTGGAATT
 AGCTGCCCAACCACGGGCTGATCTCGGATCTTGAAATTAAGACTCTCATTTATGATG
 GTTTTCCGGAGCTTTGCCAGCGCATCCGACTCCTCAGTGGCATTACGAAGTGGTAG
 TCCCGGATGGTGGGGAATCCTCGCTTATTAAGGAGTTCCTTCGTGATTTTGCCTATGC
 AGGCTTTGCGCTGCTTCTCATCAGAAACATCCAAATGTGTGCCACCAGAATCACCG
 GGGAAGAAGAGGCACGAGCCTTGATGTTGAAGAGCCAGGGCTTCATGGCATCCACC
 TCCGCCTGCCCCTTGCTGAGGTCGTAGACAGCCAGGTACAGGGCTCTCTGGGTCATG
 AAGTGGGGGTGAGTGCTGTAGAATTCCTCACGGCCTGCAAAGTCCCACACGTTTAG
 AACAAGGTCCTTTTTCTTTTGCCTCGTATTTGGATGGGCCAGTCTCGCACGTCTATG
 CCAACCGTGGCGCCCTGCATGCCGAGTTCTGATTTCTTCATTTTCATGAGCTGCTGCA
 GTAGAGTGGTCTTACCACTCCCCGTATTGCCCAACAATCATGAGCTTCATTCCGGTTGT
 AGGGCACGGCCTTTTTTCAGACGTTGTTGTAGAAACCTTATGATGTCTTTGGCTTTGCA
 TCCTATGTGCTTAAAGTCAAAGTTGAGGTGCAGTCCATCCAAGGGAAGATCCCATAT
 TTTGCTTAACTTCCCCATTTCTGTTTGGAAAGGACCTCAGTTCCAGGTTGTAAGTACA
 TCAAGAGATGTCAGGTTTTCAAGACGGCCAATTTCTGGAGGAATCTCTTTTCAGTTTA
 TTATGAGAGAGATGCAGCTTCTCTACTCTTGACCATATGTGTGGGTTTTCTGCTCAAGT
 CTAAGGTGCTGATCTGATTCTTGCTAAAAATGAGTTCCTTAAGTTCAGAGACTTCC
 AATGTGCAGGTCCCGGCAGGTGTTCAATGTTGTTGTGACTCATATCCAAGGACCGCA
 AGTGTGGAAGACTGAAGATCGCTTCTGGAATGCACGTGAAAGAGTTTTGAGACAAT
 TTTAAGCTAGTTATGGAAGACGGTAAGGCAGGCATTGCAGCGAGAAAATTCATGCG
 GGCCTGAAGCTCTCCACTTTCGGGCAAGCCTCGAGAAAGTCTTCAGGTAGGGATG
 GAATGTGGTTTTTACTAAGGTTTAAAATCTTCAGTTCCTTCAGGCTCAAGGGAGAAC
 AAATCCCGGATATTTTGTTCCTTCCAGTAGGAGCTGCTCCAGTTTCTCCACCACTTG
 GTCCAGGTTCTCTGGGATGGAAGAGAGCTGGTTGTAGGACAGGTTAAACTGTTTGA
 GGCTTGGACACTTCACCACAGGGTCTAAAACAACCTGTTGGTCCGATGTCATTTTCGAG
 AGGCGTCTAGGTGGATAACACTTGGCATTTTCAACATGAAGGAGGGAAAGGTGGCG
 AATTTGTTACTGTGCAAATCCAGATGTGTCAAGCACTTCAGAGTCTCACACAGCTGT

TGTGGGAAGCTCGTGAGTGAATTCTGGTGAAGTTCCAGCTTGGTGAGATGCTCCAGG
TGGCTACTGAGGCAACACTTCTGGCCCAGAGCATCAATATCTTTTCAGTTCGTTGGCA
GAAAGGTCTAAAGACGTGATGTGTTCTCTCTCAGAAGCCAGAGAAGAAGAGCTATC
TGATTGTCTCGTATGGGACTGCAGCCTTGAGGATCTGAGAGACTCATCTGAGGACAG
TATTTTTCTTTTTCTGTCTCAGTAGATCTTCGTGATCAAAAACAGGACCCAAGGA
GGAGTGCCTCTGAGCATTGTTGGTGAGCAGCGCTGCAGAGCTAGGTCCCTGTAACTTC
TCCTACACTAACTGAGTTGGACTTCTTCTTCACCAGAAAGGAGCTCTCGCTGCCTTC
GCTATCCAGATCGTCACTCTGGCCAAACACACTGTCCATAGAAGAGTCGGGAATGA
AGGTCCATTCGCCAAATTTCCGCCAGCGCATCCTCAGAGAAGTTGCCCTCACTGCCTG
AGGCCACGCCTTCTTGAAGAGTGTTTCTCATCTGATACCGGAGCACTTTCCTCGCTA
GGACAGACCCCGCATTTGTTTGTTCCTCAAATTAGATGACTTATCTGGAAATAAAG
GGCCTAGCCAAGAAGGATCAAGTTTTCTATGCAAAATCCTCCAAGGCAAATGCTGT
TGTTGGCCAGGTCCAGGGCAAGTCTCCTCAGGAGTAAGCTGATGACCTGGTTGTGCG
CCTTTTGGATGCTTACTGTCAGGGCTTTCCGTACATCTTGTTACGGCACCCACTGTT
AAGCAATAGTTCCACCAATTTAGGGCTGCTCTCTTCTCACATACCTGATAGATTAA
AGAAGTTGCCCCCTTCGCTTGATTGGCATCGGCTCCCAAGAGGAGCAAACATTCGAC
CATGATGCTGTTGTTCTGATCGCAGGCTCTCTCTAGCATCTTGCTTTTCAGCTCATCA
TCCACAGCCACTTTTGCAAAGCATTTGCAGCATAAGTTGAGAACTGCTCATCCTTT
TGTTCCAGGACACCGGAAGACATCTGATGAAACATCACCACATCAAATGAATAGTG
CACTAGCAGCTTGGAGAAAGATACGGACAGGTCAAGCATTGACAAGACCGTCTGTA
ATCCTGTAGTCTGTACTTCAGCAACATCTTTAAATCGCTGCAAGGTGGAAGCCAGAA
TTTTTGCCAGGAGGTGCCCTGTCCCTATGCAGAAATTCTTCTTTGTCATCAGGCATCC
CATAAGGTGTAAGCCCAGACACTGAATTTCTTGGTCATCTGGATACATCTGTAAGGT
ATGGAGGACTGAGTCAACTGCTCCATGCAGGGATAACATCTCTAAGGCATCGGGAA
GATGTGCGAAAGAAGAGATGACTTTCAATCCACATTTCTGAATCCCGGGATTCCCAA
TGAACCTGTTTCAGAGCGGCTAGAACCAGCTTGTGGATGTCAGTCCTGAAGCACTGTG
TTCTGAGCACGTTTGGTTGGCATCGCGAGTCATCCCTGGAATCTTCTGATACTCCCG
GCACCACAAAATGCAGAAGAGCTCGCAGTGCCTCCAGCTGGACTGACAGAGACGTT
CCATGGGTTCTCATCACTGTTAGTATTTTGGGGATCACTGCCGCCACTGTATCCAAA
GAAGGGTTGCTTCCTTCAAACAGATGACTCAGCATCTTGCAGCCACTCTCTGCCACC
TCAGGAACCTGGGCGTGCCGCTGCATCAACTCCAAGACATTCAGGTACACTCCTTTT
GCAAGCAGGATTTTCCTGAAATTAACGTTTTTGTTCOAAGAGAGTGGACAGAGCATGC
GCAGCTGCTTGAAGACGTCTTTGGAAGAAGAGTGCATCAGCATAGACAGCATCAC
TTCCCTGTGCGCCGGGAAGTGGCCATCTTCATCTCCAATCTTCTCGTGCAAACCTGCTC
TGGTACATGAGGAGATTATTTAGGGCCCAGCAGGCGGCCTCCTGCACGTGTTTGTTC
TTTCGATGGCGCATCAGGGCTTTATAGCAGGGTTCCAACCAGAAAGGCTTCTCACTG
TCCTCATCGCTGTTTTCTGAGTCTCACTTCTTTCTTCCAGGTCTTGGTTTAAGAAAA
TAGTCTCGGTGAGGAGGGCTAAGCAGCTGAGTGCAGAGATCTGTAAGGCTACGTTTC
TCGGGATACCGCTGGACGGCTTTCACCACAAAGACATGGACTTCGTTCAACACCAG
GATGTTGAAAAAATTACCTAATGTAAGCTTGTGGAGCAAGGAGCAGCTCACCTCTTG

AATGTTTTCACTGGTGGGGAATGTTTTTCATGGCTTCCACCACAATATTGTAACACCT
GACATTCCCACCTCATGAGGACCTCCACATTGCTGCAAGTGACGGCCAGAGAATGCA
GGCAGCAGAGTACATGGTGCACAATCTCCTCGTCCCTCTTGAAGCTGCGGAACGTAC
TCAGCAGGGTCATGTAATCTTTGTTCTCCACAAACTCAGTCAGTTGCTCCTCGGACA
CTCTCTCGAACAGCACATGTAAAGCCTTGACACGCAAGCTTCTGGACTTCCTCGTTGG
CTGAATATCTGTGCATGGCATCAAAAATTAACAGGAAAACATCACATTCTTCATCCA
GTATCAGCAGAGTAATTTTACCTGAATCTAGGAGGAGATCTAAGGCTTTTAGTCCAA
CTATTGACAGGTTTACGTTGGCATGATGAACAGTTAACATTTTAAGAATCAGTCGGT
GAATACCAAGGACTTCCCAATCATTCCCAATATCCTGGGGTCCTATTAAGCTTTGCA
ATGTCCCTGGACAGACTTCTATTAATTTGCACAGAAGTGACCACCCACCTGCTGCA
CACTGGCGACTCTCATGTAGGAGTCCAGGACTATCAACAGAGGCACGTGGACATTTT
TGCCTTCAAATAACTTGGAGGCGCGGTTCGGAGTAGGTGAACACCAGAATGTCCTCC
AGGAGCTGGAGCAACGTCTCGATCTGCTTGCCTTCCTGGACATTATTCAGCCTGACT
ATCAACTTCTTCAGAGCCTCCTCCTCCTCCTCCTCGTCGCAGCCCTGACAGGCGCCAC
TGGCCAT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии LRRK2, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

2. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии LRRK2, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где антисмысловая цепь содержит область комплементарности с мРНК, кодирующей LRRK2, и где область комплементарности содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:2.

3. Агент на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии LRRK2, где дцРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область,

где антисмысловая цепь содержит область комплементарности с мРНК, кодирующей LRRK2, и где область комплементарности содержит по меньшей мере 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида от любой из антисмысловых нуклеотидных последовательностей, представленных в любой из таблиц 3, 4, 6 или 7.

4. дцРНК-агент по любому из пп. 1-3, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 3383-3403, 2105-2125, 2356-2376, 5413-5433, 2603-2623, 3563-3583, 2192-2212, 3088-3108, 3105-3125, 2203-2223, 7348-7368, 7097-7117, 6319-6339, 3886-1906, 55106, 51006 3964-3984, 5138-5158, 1254-1274, 7098-7118, 7048-7068, 7050-7070, 2764-2784, 3087-3107, 7526-7546, 4849-4869, 5272-5292, 8, 468-48 7540, 3720-3740, 4016-4036, 7792-7812, 2515-2535, 2286-2306, 4014-4034, 3721-3741, 2284-2304, 1896-1916, 3876-3896, 7788-40338,4 1275-1295, 7527-7547, 3606-3626, 7525-7545, 468-488, 1254-1274, 2105-2125, 2192-2212, 2203-2223, 2603-2623, 2764-2784, 3087,3087-3188 3108, 3383-3403, 3563-3583, 3876-3896, 3886-3906, 3964-3984, 4849-4869, 5138-5158, 5190-5210, 5272-5292, 6319-6339, 7097-70917, 7097-7018 и 7348-7368 из SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 2.

5. дцРНК-агент по любому из пп.1-4, где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида от любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи дуплекса, выбранного

из группы, состоящей из AD-601140.1, AD-599927.1, AD-612673.1, AD-615420.1, AD-600406.1, AD-601294.1, AD-600013.1, AD-600853.1, AD-613382.1, AD-600024.1, AD-604701.1, AD-604452.1, AD-603747.1, AD-601616.1, AD-602766.1, AD-601694.1, AD-602734.1, AD-599139.1, AD-604453.1, AD-616783.1, AD-616785.1, AD-600566.1, AD-600852.1, AD-617239.1, AD-602466.1, AD-602848.1, AD-598424.1, AD-617233.1, AD-613965.1, AD-614239.1, AD-617466.1, AD-612820.1, AD-612611.1, AD-614237.1, AD-613966.1, AD-612609.1, AD-612246.1, AD-601606.1, AD-617462.1, AD-614236.1, AD-611650.1, AD-617240.1, AD-613851.1, AD-617238.1, AD-1335323.1, AD-1335325.1, AD-1335324.1, AD-1508169, AD-1508884, AD-1509672, AD-1509758, AD-1509769, AD-1510151, AD-1510311, AD-1510597, AD-1510598, AD-1510885, AD-1511039, AD-1511351, AD-1511361, AD-1511439, AD-1512211, AD-1512479, AD-1512511, AD-1512593, AD-1513492, AD-1514197, AD-1514198 и AD-1514446.

6. дцРНК-агент по пп.1 или 2, где нуклеотидная последовательность смысловой и антисмысловой цепи содержит любую из нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепи, представленной в любой из таблиц 3, 4, 6 или 7.

7. дцРНК-агент по любому из пп.1-6, где смысловая цепь, антисмысловая цепь или как смысловая цепь, так и антисмысловая цепь, конъюгированы с одной или более липофильными группами.

8. дцРНК-агент по п.7, где липофильная группа конъюгирована с одним или более внутренними положениями в двухцепочечной области дцРНК-агента.

9. дцРНК-агент по пп.7 или 8, где липофильная группа конъюгирована через линкер или носитель.

10. дцРНК-агент по любому из пп.7-9, где липофильность липофильной группы, измеренная по значению $\log K_{ow}$, превышает 0.

11. дцРНК-агент по любому из пп.1-10, где гидрофобность двухцепочечного РНК-агента, измеренная по несвязанной фракции в анализе связывания с белками плазмы двухцепочечного РНК-агента, превышает 0,2.

12. дцРНК-агент по п.11, где анализ связывания с белками плазмы представляет собой анализ сдвига электрофоретической подвижности с использованием сывороточного белка альбумина человека.

13. дцРНК-агент по любому из пп.1-12, где дцРНК-агент содержит, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид.

14. дцРНК-агент по п.13, где не более пяти нуклеотидов смысловой цепи и не более пяти нуклеотидов антисмысловой цепи представляют собой немодифицированные нуклеотиды.

15. дцРНК-агент по п.13, где все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи представляют собой модифицированные нуклеотиды.

16. дцРНК-агент по любому из пп.13-15, где, по меньшей мере, один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 3'-концевого нуклеотида дезокситимидина(dT), 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида,

2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, заблокированного нуклеотида, разблокированного нуклеотида, конформационно ограниченного нуклеотида, конформационно ограниченного этилом нуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-О-аллил-модифицированного нуклеотида, 2'-С-алкил-модифицированного нуклеотида, 2'-гидроксид-модифицированного нуклеотида, 2'-метоксиэтил-модифицированного нуклеотида, 2'-О-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата, нуклеотида, содержащего неприродное основание, тетрагидропиран-модифицированного нуклеотида, 1,5-ангидрогекситол-модифицированного нуклеотида, циклогексенил-модифицированного нуклеотида, нуклеотида, содержащего 5'-фосфотиоатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего винилфосфонат, нуклеотида, содержащего аденозингликолевую нуклеиновую кислоту (GNA), нуклеотида, содержащего S-изомер тимидингликолевой нуклеиновой кислоты (GNA), нуклеотида, содержащего 2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезокситимидин-3'-фосфат, нуклеотида, содержащего 2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат, и концевой нуклеотида, связанного с производным холестерина и бисдециламидной группой додекановой кислоты; и их комбинаций.

17. дцРНК-агент по п.16, где модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-дезоксид-2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, 3'-концевых нуклеотидов дезокситимидинов (dT), заблокированного нуклеотида, абазического нуклеотида, 2'-амино-модифицированного нуклеотида, 2'-алкил-модифицированного нуклеотида, морфолино-нуклеотида, фосфорамидата и нуклеотида, содержащего неприродное основание.

18. дцРНК-агент по п.16, где модифицированный нуклеотид содержит короткую последовательность 3'-концевых нуклеотидов дезокситимидинов (dT).

19. дцРНК-агент по п.16, где модификации нуклеотидов представляют собой 2'-О-метил-модификацию, GNA и 2'-фтор-модификацию.

20. дцРНК-агент по любому из пп.1-19, дополнительно содержащий, по меньшей мере, одну фосфотиоатную межнауклеотидную связь.

21. дцРНК-агент по п.20, где дцРНК-агент содержит 6-8 фосфотиоатных межнауклеотидных связей.

22. дцРНК-агент по любому из пп.1-21, где каждая цепь имеет не более 30 нуклеотидов в длину.

23. дцРНК-агент по любому из пп. 1-22, где, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 1 нуклеотида.

24. дцРНК-агент по любому из пп.1-23, где, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов.

25. дцРНК-агент по любому из пп.1-24, где длина двухцепочечной области составляет 15-30 пар нуклеотидов.

26. дцРНК-агент по п. 25, где длина двухцепочечной области составляет 17-23 пары нуклеотидов.

27. дцРНК-агент по п.25, где длина двухцепочечной области составляет 17-25 пар нуклеотидов.

28. дцРНК-агент по п. 25, где длина двухцепочечной области составляет 23-27 пар нуклеотидов.

29. дцРНК-агент по п.25, где длина двухцепочечной области составляет 19-21 пару нуклеотидов.

30. дцРНК-агент по п.25, где длина двухцепочечной области составляет 21-23 пары нуклеотидов.

31. дцРНК-агент по любому из пп.1-30, где каждая цепь имеет 19-30 нуклеотидов.

32. дцРНК-агент по любому из пп.1-30, где каждая цепь имеет 19-23 нуклеотида.

33. дцРНК-агент по любому из пп.1-30, где каждая цепь имеет 21-23 нуклеотида.

34. дцРНК-агент по любому из пп.8-33, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, по меньшей мере, в одной цепи.

35. дцРНК-агент по п.34, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, по меньшей мере, в одной цепи через линкер или носитель.

36. дцРНК-агент по п.35, где внутренние положения включают все положения, кроме двух концевых положений от каждого конца, по меньшей мере, в одной цепи.

37. дцРНК-агент по п.35, где внутренние положения включают все положения, кроме трех концевых положений от каждого конца, по меньшей мере, в одной цепи.

38. дцРНК-агент по пп.35-37, где внутренние положения не включают область сайта расщепления смысловой цепи.

39. дцРНК-агент по п.38, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 9-12, где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи.

40. дцРНК-агент по п.38, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 11-13, где нумерация начинается от 3'-конца смысловой цепи.

41. дцРНК-агент по пп.35-37, где внутренние положения не включают область сайта расщепления антисмысловой цепи.

42. дцРНК-агент по п.41, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 12-14, где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи.

43. дцРНК-агент по пп.35-37, где внутренние положения включают все положения, кроме положений 11-13 в смысловой цепи, где нумерация начинается от 3'-конца, и положений 12-14 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца.

44. дцРНК-агент по любому из пп.8-43, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 4-8 и 13-18 в смысловой цепи, и положений 6-10 и 15-18 в антисмысловой нити, где нумерация начинается от 5'-конца каждой цепи.

45. дцРНК-агент по п.44, где одна или более липофильных групп конъюгированы с одним или более внутренними положениями, выбранными из группы, состоящей из положений 5, 6, 7, 15 и 17 в смысловой цепи и положений 15 и 17 в антисмысловой цепи, где нумерация начинается от 5'-конца каждой цепи.

46. дцРНК-агент по п.8, где внутренние положения в двухцепочечной области не включают область сайта расщепления смысловой цепи.

47. дцРНК-агент по любому из пп.7-46, где длина смысловой цепи составляет 21 нуклеотид, длина антисмысловой цепи составляет 23 нуклеотида, и липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1, положением 7, положением 6 или положением 2 смысловой цепи или положением 16 антисмысловой цепи.

48. дцРНК-агент по п.47, где липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20, положением 15, положением 1 или положением 7 смысловой цепи.

49. дцРНК-агент по п.47, где липофильная группа конъюгирована с положением 21, положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

50. дцРНК-агент по п.47, где липофильная группа конъюгирована с положением 20 или положением 15 смысловой цепи.

51. дцРНК-агент по п.47, где липофильная группа конъюгирована с положением 16 антисмысловой цепи.

52. дцРНК-агент по любому из пп.7-51, где липофильная группа представляет собой алифатическое, алициклическое или полиалициклическое соединение.

53. дцРНК-агент по п.52, где липофильная группа выбрана из группы, состоящей из липида, холестерина, ретиновой кислоты, холевой кислоты, адамантануксусной кислоты, 1-пиренмасляной кислоты, дигидротестостерона, 1,3-бис-О(гексадецил)глицерина, геранилоксигексанола, гексадецилглицерина, борнеола, ментола, 1,3-пропандиола, гептадецильной группы, пальмитиновой кислоты, миристиновой кислоты, О-3-(олеоил)литохолевой кислоты, О-3-(олеоил)холевой кислоты, диметокситритила или феноксазина.

54. дцРНК-агент по п.52, где липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C4-C30 углеводородную цепь и необязательную функциональную группу, выбранную из группы, состоящей из гидроксила, амина, карбоновой кислоты, сульфоната, фосфата, тиола, азида и алкина.

55. дцРНК-агент по п.54, где липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C6-C18 углеводородную цепь.

56. дцРНК-агент по п.54, где липофильная группа содержит насыщенную или ненасыщенную C16 углеводородную цепь.

57. дцРНК-агент по п.56, где насыщенная или ненасыщенная C16 углеводородная цепь конъюгирована в положении 6, где нумерация начинается от 5'-конца цепи.

58. дцРНК-агент по любому из пп.7-57, где липофильная группа конъюгирована через носитель, который заменяет один или более нуклеотидов во внутреннем

положении(ях) или двухцепочечной области.

59. дцРНК-агент по п.58, где носитель представляет собой циклическую группу, выбранную из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила; или представляет собой ациклическую группу, основанную на осто́ве серинола или осто́ве диэтанолamina.

60. дцРНК-агент по любому из пп.7-57, где липофильная группа конъюгирована с двухцепочечным РНКи-агентом через линкер, содержащий эфирную, тиоэфирную, карбамидную, карбонатную связь, аминосвязь, амидную, малеимидтиоэфирную, дисульфидную, фосфодиэфирную, сульфонамидную связь, продукт клик-реакции или карбамат.

61. Двухцепочечный иРНК-агент по любому из пп.7-60, где липофильная группа конъюгирована с азотистым основанием, группой сахара или межнуклеотидной связью.

62. дцРНК-агент по любому из пп.7-61, где липофильная группа или нацеливающий лиганд конъюгированы через биорасщепляемый линкер, выбранный из группы, состоящей из ДНК, РНК, дисульфида, амида, функционализированных моносахаридов или олигосахаридов галактозамина, глюкозамина, глюкозы, галактозы, маннозы и их комбинации.

63. дцРНК-агент по любому из пп.7-62, где 3'-конец смысловой цепи защищен концевым кэпом, который представляет собой циклическую группу, содержащую амин, где указанная циклическая группа выбрана из группы, состоящей из пирролидинила, пиразолинила, пиразолидинила, имидазолинила, имидазолидинила, пиперидинила, пиперазинила, [1,3]диоксоланила, оксазолидинила, изоксазолидинила, морфолинила, тиазолидинила, изотиазолидинила, хиноксалинила, пиридазинонила, тетрагидрофуранила и декалинила.

64. дцРНК-агент по любому из пп.7-61, дополнительно содержащий нацеливающий лиганд, который нацелен на ткань печени.

65. дцРНК-агент по любому из пп.7-61, дополнительно содержащий нацеливающий лиганд, который нацелен на нервную клетку.

66. дцРНК-агент по любому из пп.7-61, дополнительно содержащий нацеливающий лиганд, который нацелен на любую клетку глаза.

67. дцРНК-агент по п.64, где нацеливающий лиганд представляет собой GalNAc-конъюгат.

68. дцРНК-агент по любому из пп. 1-67, дополнительно содержащий:
концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-

конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

69. дцРНК-агент по любому из пп.1-67, дополнительно содержащий:

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

70. дцРНК-агент по любому из пп.1-67, дополнительно содержащий:

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой, второй и третьей межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

71. дцРНК-агент по любому из пп.1-67, дополнительно содержащий:

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в третьих межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

72. дцРНК-агент по любому из пп.1-67, дополнительно содержащий:

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 3'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом

фосфора в Sp-конфигурации,

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой и второй межнуклеотидных связях на 5'-конце антисмысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора в Rp-конфигурации, и

концевую хиральную модификацию, находящуюся в первой межнуклеотидной связи на 5'-конце смысловой цепи, имеющей связывающий атом фосфора либо в Rp-конфигурации, либо в Sp-конфигурации.

73. дцРНК-агент по любому из пп.1-72, дополнительно содержащий фосфат или миметик фосфата на 5'-конце антисмысловой цепи.

74. дцРНК-агент по п.73, где миметик фосфата представляет собой 5'-винилфосфонат (VP).

75. дцРНК-агент по любому из пп.1-72, где пара оснований в положении 1 от 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

76. дцРНК-агент по любому из пп.1-72, где смысловая цепь имеет в общей сложности 21 нуклеотид, и антисмысловая цепь имеет в общей сложности 23 нуклеотида.

77. Клетка, содержащая дцРНК-агент по любому из пп.1-76.

78. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего LRRK2, содержащая дцРНК-агент по любому из пп. 1-76.

79. Фармацевтическая композиция, содержащая дцРНК-агент по любому из пп.1-76 и липидный состав.

80. Фармацевтическая композиция по пп.78 или 79, где дцРНК-агент находится в незабуференном растворе.

81. Фармацевтическая композиция по п.80, где незабуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

82. Фармацевтическая композиция по пп.78 или 79, где указанный дцРНК-агент находится в буферном растворе.

83. Фармацевтическая композиция по п.82, где буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

84. Фармацевтическая композиция по п.82, где буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

85. Способ ингибирования экспрессии гена LRRK2 в клетке, включающий приведение клетки в контакт с дцРНК-агентом по любому из пп.1-76 или фармацевтической композицией по любому из пп.78-84, тем самым ингибируя экспрессию гена LRRK2 в клетке.

86. Способ по п.85, где клетка находится внутри организма субъекта.

87. Способ по п.86, где субъектом является человек.

88. Способ по п.87, где у субъекта имеется расстройство, ассоциированное с LRRK2.

89. Способ по п.88, где расстройство, ассоциированное с LRRK2, представляет собой нейродегенеративное заболевание.

90. Способ по п.89, где нейродегенеративное расстройство представляет собой

семейное расстройство.

91. Способ по п.89, где нейродегенеративное заболевание представляет собой спорадическое заболевание.

92. Способ по пп.90 или 91, где нейродегенеративное расстройство представляет собой болезнь Паркинсона.

93. Способ по п.88, где заболевание, ассоциированное с LRRK2, представляет собой болезнь глаз.

94. Способ по любому из пп.85-93, где контактирование клетки с дцРНК-агентом ингибирует экспрессию LRRK2, по меньшей мере, примерно на 25%.

95. Способ по любому из пп.85-94, где ингибирование экспрессии LRRK2 снижает уровень белка LRRK2 в сыворотке субъекта, по меньшей мере, примерно на 25%.

96. Способ лечения субъекта, имеющего расстройство, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента по любому из пп.1-76 или фармацевтической композиции по любому из пп.78-84, тем самым обеспечивая лечение субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2.

97. Способ профилактики, по меньшей мере, одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества дцРНК-агента по любому из пп.1-76 или фармацевтической композиции по любому из пп.78-84, тем самым обеспечивая профилактику, по меньшей мере, одного симптома у субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно снижение экспрессии LRRK2.

98. Способ по пп.96 или 97, где расстройство представляет собой расстройство, ассоциированное с LRRK2.

99. Способ по п.98, где расстройство, ассоциированное с LRRK2, выбрано из группы, состоящей из болезни Паркинсона и глазных болезней.

100. Способ по любому из пп.97-99, где субъектом является человек.

101. Способ по п. 100, где введение агента субъекту вызывает снижение накопления белка LRRK2.

102. Способ по любому из пп.96-101, где дцРНК-агент вводят субъекту в дозе примерно от 0,01 мг/кг до примерно 50 мг/кг.

103. Способ по любому из пп.96-102, где дцРНК-агент вводят субъекту интратекально.

104. Способ по любому из пп.96-103, дополнительно включающий определение уровня LRRK2 в образце(ах) субъекта.

105. Способ по п.104, где уровень LRRK2 в образце(ах) субъекта представляет собой уровень белка Lrrk2 в образце(ах) крови, сыворотки или спинномозговой жидкости.

106. Способ по любому из пп.96-105, дополнительно включающий введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

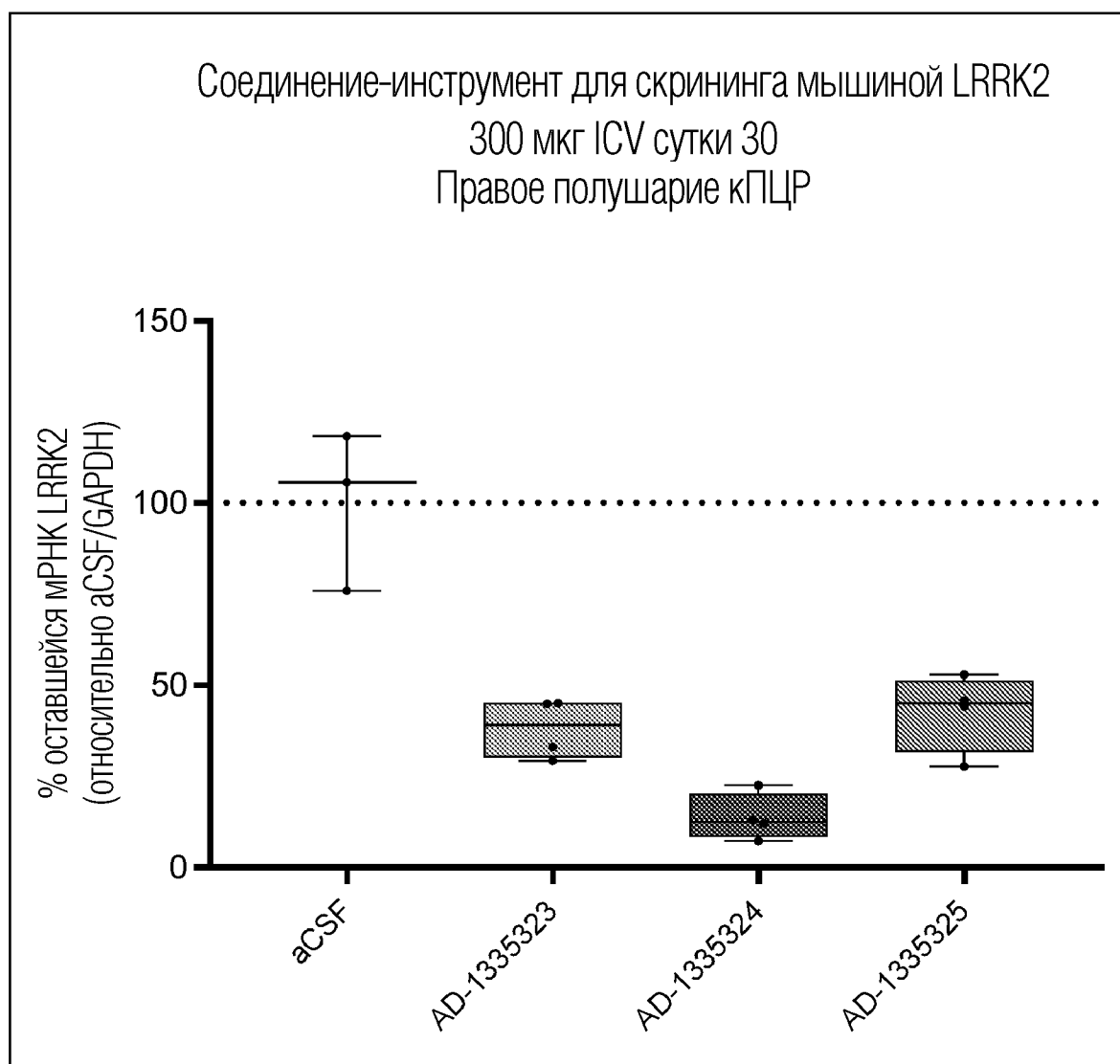
107. Набор, содержащий дцРНК-агент по любому из пп.1-76 или фармацевтическую

композицию по любому из пп.78-84.

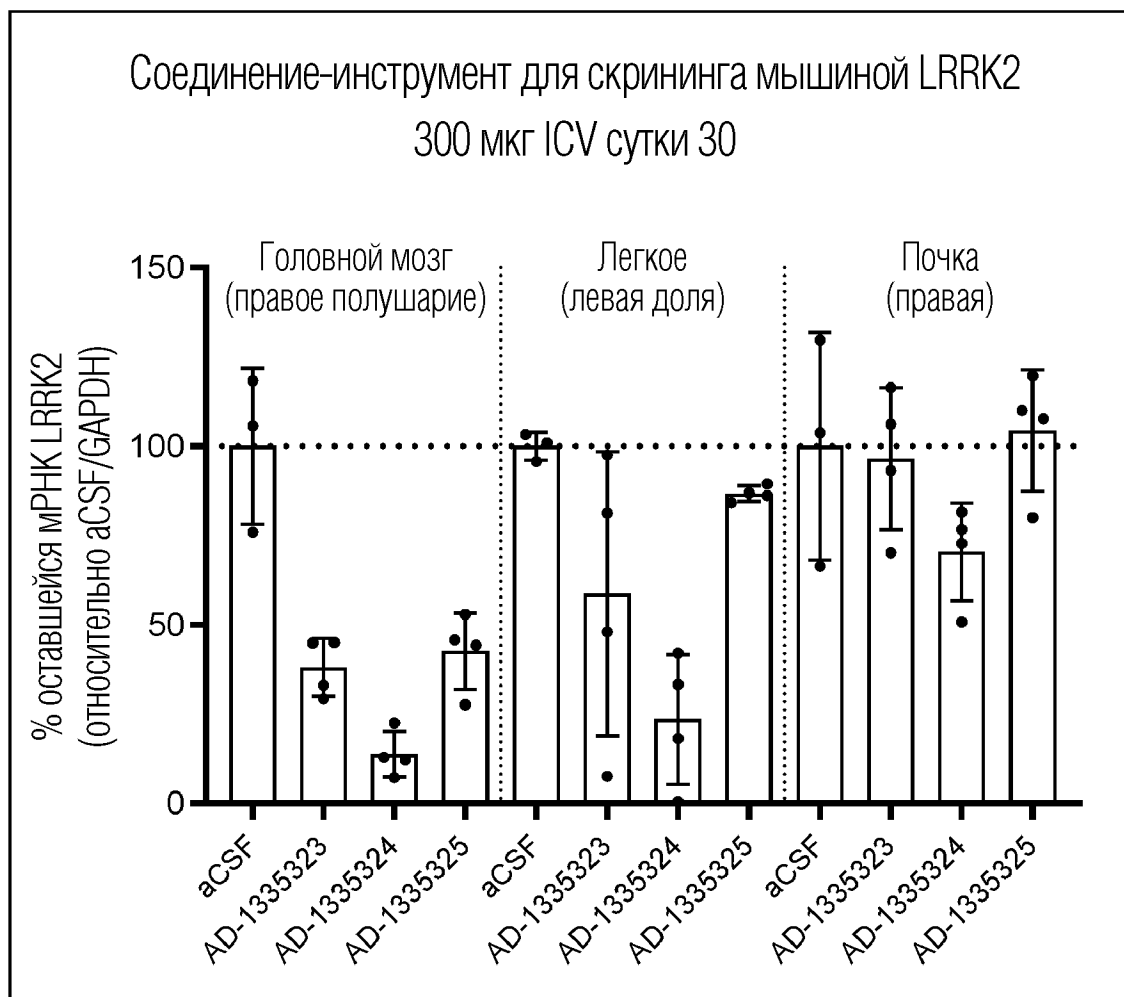
108. Флакон, содержащий дцРНК-агент по любому из пп.1-76 или фармацевтическую композицию по любому из пп.78-84.

109. Шприц, содержащий дцРНК-агент по любому из пп.1-76 или фармацевтическую композицию по любому из пп.78-84.

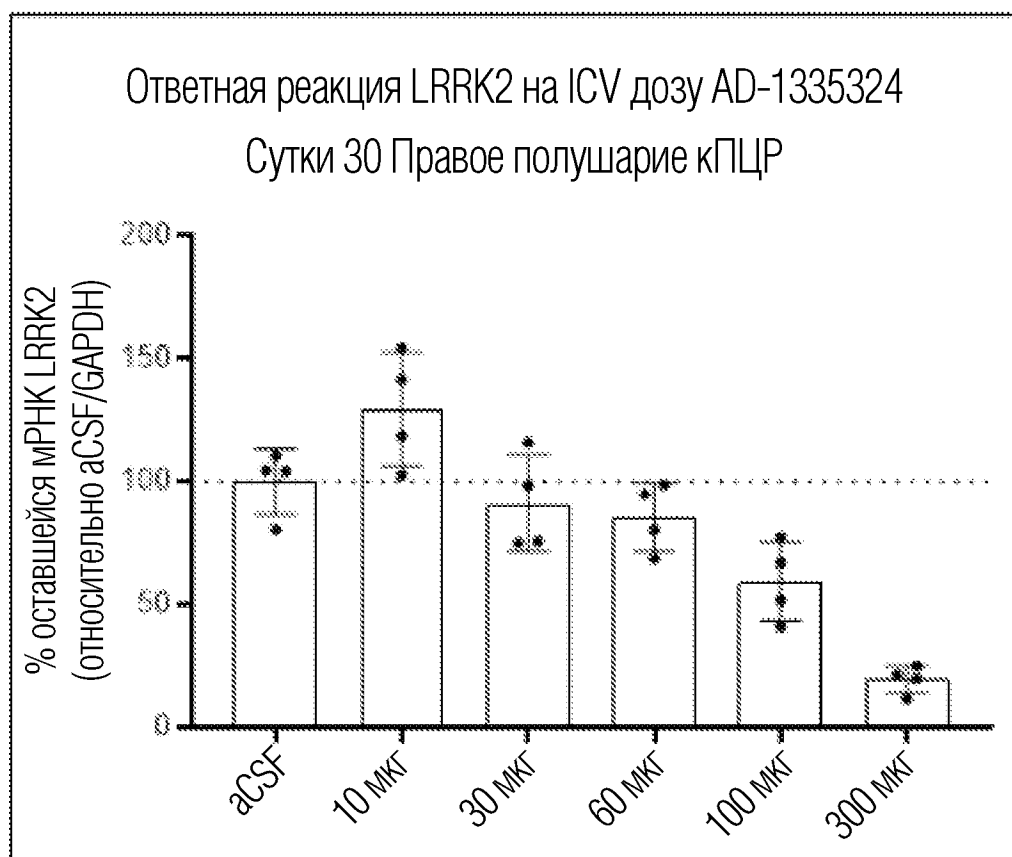
110. Интратекальный насос, содержащий дцРНК-агент по любому из пп.1-76 или фармацевтическую композицию по любому из пп.78-84.



ФИГ. 1

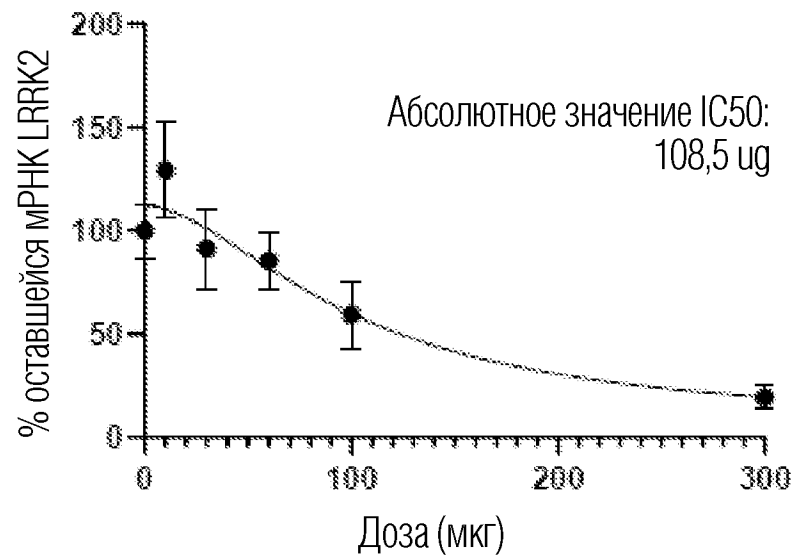


ФИГ. 2



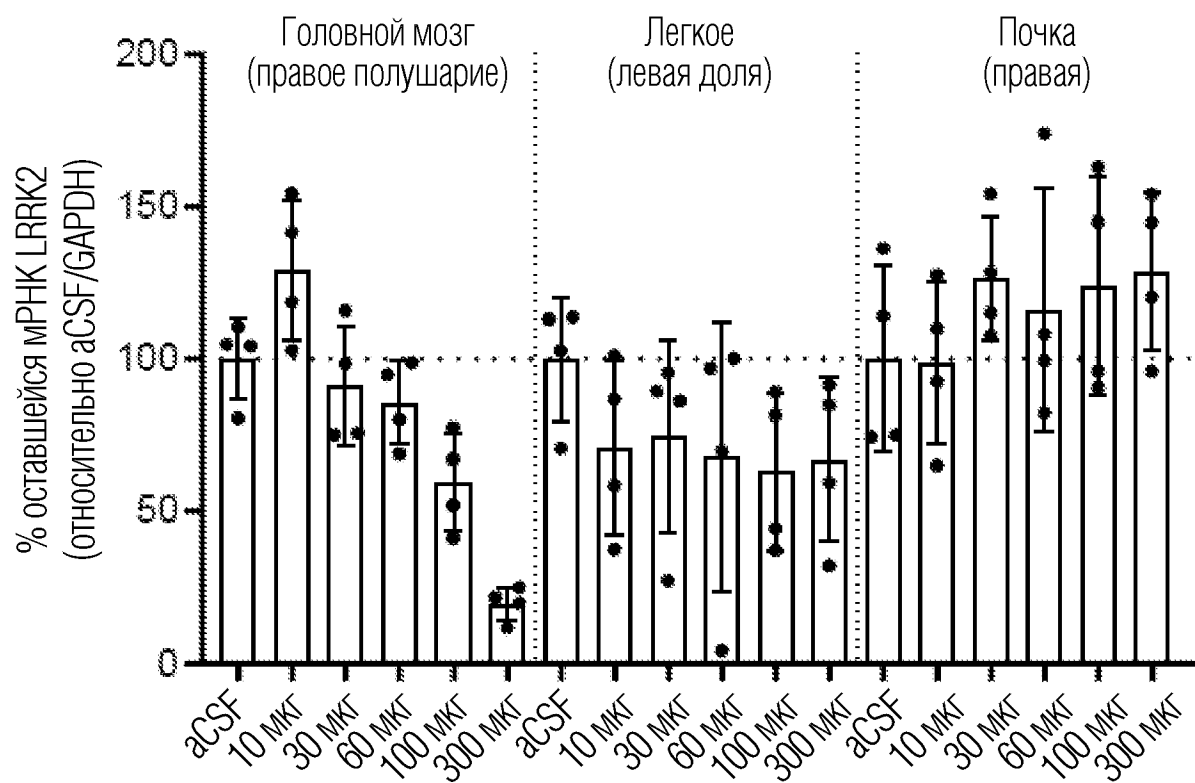
ФИГ. 3А

LRRK2 сутки 30 правое полушарие
Значение IC50 AD-1335324 in vivo



ФИГ. 3В

AD-1335324 ICV сутки 30 кПЦР



ФИГ. 4