

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293146 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.02.20

(51) Int. Cl. A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61P 7/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.04.29

(54) КОМПОЗИЦИИ нРНК ФАКТОРА КОМПЛЕМЕНТА В (CFB) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/017,725; 63/119,009; 63/157,899

(32) 2020.04.30; 2020.11.30; 2021.03.08

(33) US

(86) PCT/US2021/029872

(87) WO 2021/222549 2021.11.04

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

(72) Изобретатель:

Макайнинч Джеймс Д., Касторено
Адам, Шлегель Марк К., Фишилевич
Элейн, Юсиус Кристина, Каиттанис
Чараламбос (US)

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

(57) Изобретение относится к РНКи-агентам, например дцРНК-агентам, нацеленным на ген фактора комплемента В (CFB). Изобретение также относится к способам применения таких РНКи-агентов для ингибирования экспрессии гена CFB и к способам лечения или профилактики заболевания, ассоциированного с CFB, у субъекта.

A1

202293146

202293146

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576137EA/030

КОМПОЗИЦИИ ИРНК ФАКТОРА КОМПЛЕМЕНТА В (CFB) И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патента США № 63/017725, поданной 30 апреля 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/119009, поданной 30 ноября 2020 г., и предварительной заявки на патент США № 63/157899, поданной 8 марта 2021 г. Полное содержание каждой из вышеуказанных заявок включено в настоящий документ 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. Указанная копия ASCII, созданная 23 апреля 2021 г., имеет название 121301_11420_SL.txt и имеет размер 436429 байтов.

Уровень техники

Комплемент был впервые открыт в 1890-х годах, когда было обнаружено, что он способствует или «служит дополнением» в киллинге бактерий термостабильными антителами, находящимися в нормальной сыворотке (Walport M.J. (2001) N. Engl. J. Med., 344:1058). Система комплемента состоит из более, чем 30 белков, которые присутствуют либо в виде растворимых белков в крови, либо в виде связанных с мембраной белков. Активация комплемента приводит к последовательному каскаду ферментативных реакций, известных как пути активации комплемента, приводящих к образованию активных анафилатоксинов C3a и C5a, которые индуцируют множество физиологических реакций, варьирующихся от хемоаттракции до апоптоза. Первоначально полагалось, что комплемент играет важную роль во врожденном иммунитете, когда возникает сильный и быстрый ответ на инвазию патогенов. Однако в последнее время становится все более очевидным, что комплемент также играет важную роль в адаптивном иммунитете с участием Т- и В-клеток, которые помогают в элиминации патогенов (Dunkelberger J.R. and Song W.C. (2010) Cell Res., 20:34; Molina H. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3357), в поддержании иммунологической памяти, предотвращающей повторную инвазию патогенов, и участвует в многочисленных патологических состояниях человека (Qu H. et al. (2009) Mol. Immunol., 47; Wagner E. and Frank M.M. (2010) Nat. Rev. Drug Discov., 9:43).

Известно, что активация комплемента происходит тремя различными путями: альтернативным, классическим и лектиновым (фиг. 1), включая белки, которые в основном находятся в виде неактивных зимогенов, которые затем последовательно расщепляются и активируются.

Классический путь часто активируется комплексами антитело-антиген или С-реактивным белком (CRP), оба которых взаимодействуют с компонентом комплемента C1q. Кроме того, классический путь может активироваться фосфатидилсерином,

присутствующим в апоптотических тельцах в отсутствие иммунных комплексов.

Лектиновый путь инициируется лектинами, связывающими маннозу (MBL), которые связываются со сложными углеводными остатками на поверхности патогенов. Активация классического пути или лектинового пути приводит к активации конвертазы (C4b2b)C3.

Альтернативный путь активируется связыванием C3b, который спонтанно образуется в результате гидролиза C3, на целевых поверхностях. Данный связанный с поверхностью C3b затем распознается фактором В, образуя комплекс C3bВ. Комплекс C3bВ, в свою очередь, расщепляется фактором D с образованием активной формы C3-конвертазы AP (C3bBb). Оба типа C3-конвертаз расщепляют C3, образуя C3b. Затем C3b либо связывается с большим количеством фактора В, усиливая активацию комплемента через AP (так называемая альтернативная или амплификационная петля), либо приводит к образованию активной конвертазы C5 (C3bBbC3b или C4bC2bC3b), которая расщепляет C5 и «запускает» поздние события, которые приводят к образованию мембраноатакующего комплекса (MAC) (C5b-9).

Неадекватная активация системы комплемента ответственна за распространение или инициацию патологии при многих различных заболеваниях, включая, например, гломерулопатию C3, системную красную волчанку (SLE), например, волчаночный нефрит, IgA-нефропатию, диабетическую нефропатию, поликистозную болезнь почек, мембранозную нефропатию, возрастную макулярную дегенерацию, атипичный гемолитико-уремический синдром, тромботическую микроангиопатию, миастению гравис, ишемию и реперфузионное повреждение, пароксизмальную ночную гемоглобинурию и ревматоидный артрит.

На сегодняшний день для лечения заболеваний, ассоциированных с компонентами комплемента, доступно только одно терапевтическое средство, нацеленное на альтернативный путь, например, ось C5-C5a, анти-C5 антитело, экулизумаб (Солирис®). Несмотря на то, что было показано, что экулизумаб эффективен для лечения пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS) и миастении гравис, и в настоящее время он проходит оценку в клинических испытаниях для других заболеваний, ассоциированных с компонентом комплемента, для терапии экулизумабом требуются еженедельные инфузии в высоких дозах с последующими поддерживающими инфузиями раз в две недели, что приводит к высокой стоимости лечения. Кроме того, примерно у 50% пациентов с PNH, получавших лечение экулизумабом, наблюдается низкий уровень гемолиза, и им требуются резидуальные переливания крови (Hill A. et al. (2010) Haematologica, 95(4):567-73).

Следовательно, в данной области существует потребность в композициях и способах лечения заболеваний, нарушений и патологических состояний, ассоциированных с активацией комплемента, например, активацией активности фактора комплемента В.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям иРНК, которые воздействуют на

опосредованное РНК-индуцированным сайленсинговым комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, кодирующего фактор комплемента В (CFB). Фактор комплемента В (CFB) может находиться в клетке, например, в клетке субъекта, такого как человек.

Соответственно, в одном аспекте изобретение относится к агенту на основе двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, 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 0, 1, 2 или 3 нуклеотида, из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 1, 2 или 3 нуклеотида, из нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:8. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:8.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности к мРНК, кодирующей фактор комплемента В (CFB), и где область комплементарности включает, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности включает, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности включает, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности содержит, по

меньшей мере, 20 последовательных нуклеотидов любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20. В некоторых вариантах осуществления область комплементарности включает, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей 633-665, 1133-1185, 1133-1173, 1133-1167, 1143-1173, 1540-1563, 1976-2002, 2386-2438, 2386-2418, 2386-2413 и 2389-1418 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8, где замещение Т на U либо в SEQ ID NO: 1, либо в SEQ ID NO: 8 не рассматривается в качестве различия.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, по меньшей мере, 17 нуклеотидов, по меньшей мере, 19 нуклеотидов или, по меньшей мере, 20 нуклеотидов из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 633-655, 643-665, 928-950, 1133-1155, 1140-1162, 1141-1163, 1143-1165, 1145-1167, 1148-1170, 1150-1172, 1151-1173, 1185-1207, 1306-1328, 1534-1556, 1540-1562, 1541-1563, 1976-1998, 1979-2001, 1980-2002, 2078-2100, 2386-2408, 2388-2410, 2389-2411, 2391-2413, 2393-2415, 2395-2417, 2396-2418, 2438-2460, 2602-2624 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, по меньшей мере, 17 нуклеотидов, по меньшей мере, 19 нуклеотидов или, по меньшей мере, 20 нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8, где замена Т на U в любой из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8 не рассматривается в качестве различия.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов дуплекса антисмысловой цепи, выбранного из группы, состоящей из AD-560018, AD-559375, AD-559160, AD-559374, AD-559060, AD-559721, AD-559026, AD-558225, AD-557069, AD-558068, AD-557422, AD-558063, AD-558066, AD-556701, AD-558657, AD-559020, AD-559023, AD-558860, AD-560019, AD-560016, AD-559008, AD-559717, AD-557072, AD-558097, AD-557774, AD-

557070, AD-558065, AD-557853 и AD-557079. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 20 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид любого из выбранных дуплексов.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов дуплекса антисмысловой цепи, выбранного из группы, состоящей из AD-560018, AD-559375, AD-559160, AD-559374, AD-559060, AD-559721, AD-559026, AD-558225, AD-557069, AD-558068, AD-557422, AD-558063, AD-558066, AD-556701, AD-558657, AD-559020, AD-559023, AD-558860, AD-560019, AD-560016, AD-559008, AD-559717, AD-557072, AD-558097, AD-557774, AD-557070, AD-558065, AD-557853 и AD-557079. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 20 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид любого из выбранных дуплексов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к двухцепочечной рибонуклеиновой кислоте (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, по меньшей мере, 17 нуклеотидов, по меньшей мере, 19 нуклеотидов или, по меньшей мере, 20 нуклеотидов из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 153-175; 202-224; 219-241; 254-276; 304-326; 321-343; 347-369; 402-424; 418-440; 447-469; 491-513; 528-550; 549-571; 566-588; 591-613; 792-814; 819-841; 967-989; 1042-1064; 1234-1256; 1250-1272; 1269-1291; 1335-1357; 1354-1376; 1372-1394; 1422-1444; 1496-1518; 1670-1692; 1716-1738; 1757-1779; 1774-1796; 1793-1815; 1844-1866; 1871-1893; 1909-1931; 1924-1947; 1947-1969; 2161-2183; 2310-2332; 2330-2352; 2355-2377; 2494-2516 и 2527-2549 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь

содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 0, 1, 2 или 3 нуклеотида, например, по меньшей мере, 15 нуклеотидов, по меньшей мере, 17 нуклеотидов, по меньшей мере, 19 нуклеотидов или, по меньшей мере, 20 нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8, где замещение Т на U либо в SEQ ID NO: 1, либо в SEQ ID NO: 8 не рассматривается в качестве различия.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов дуплекса антисмысловой цепи, выбранного из группы, состоящей из AD-560132.1; AD-560099.1; AD-559998.1; AD-559993.1; AD-559973.1; AD-559882.1; AD-559706.1; AD-559704.1; AD-559688.1; AD-559668.1; AD-559641.1; AD-559609.1; AD-559590.1; AD-559573.1; AD-559532.1; AD-559486.1; AD-559330.1; AD-559274.1; AD-559226.1; AD-559208.1; AD-559189.1; AD-559124.1; AD-559105.1; AD-559089.1; AD-558935.1; AD-558879.1; AD-558777.1; AD-558750.1; AD-558637.1; AD-558612.1; AD-558595.1; AD-558574.1; AD-558555.1; AD-558511.1; AD-558482.1; AD-558466.1; AD-558450.1; AD-558424.1; AD-558407.1; AD-558393.1; AD-558378.1; AD-558361.1; AD-558312.1. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 20 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид любого из выбранных дуплексов.

В одном варианте осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов дуплекса антисмысловой цепи, выбранного из группы, состоящей из AD-560132.1; AD-560099.1; AD-559998.1; AD-559993.1; AD-559973.1; AD-559882.1; AD-559706.1; AD-559704.1; AD-559688.1; AD-559668.1; AD-559641.1; AD-559609.1; AD-559590.1; AD-559573.1; AD-559532.1; AD-559486.1; AD-559330.1; AD-559274.1; AD-559226.1; AD-559208.1; AD-559189.1; AD-559124.1; AD-559105.1; AD-559089.1; AD-558935.1; AD-558879.1; AD-558777.1; AD-558750.1; AD-558637.1; AD-558612.1; AD-558595.1; AD-558574.1; AD-558555.1; AD-558511.1; AD-558482.1; AD-558466.1; AD-558450.1; AD-558424.1; AD-558407.1; AD-558393.1; AD-558378.1; AD-558361.1; AD-558312.1. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 17 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В

некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 19 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 20 последовательных нуклеотидов любого из выбранных дуплексов. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 21 последовательный нуклеотид любого из выбранных дуплексов.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент содержит, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид.

В одном варианте осуществления по существу все нуклеотиды смысловой цепи; по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

В одном варианте осуществления все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию; все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

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, блокированного 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'-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 фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат, нуклеотида, содержащего миметик 5'-фосфата, нуклеотида, содержащего 2'-фосфатную группу, например, цитидин-2'-фосфат (C2p); гуанозин-2'-фосфат (G2p); уридин-2'-фосфат (U2p); аденозин-2'-фосфат (A2p); термически дестабилизирующего нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA) и 2'-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

В одном варианте осуществления модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил-, 2'-О-алкил-, 2'-О-аллил-, 2'-С-аллил-, 2'-фтор-, 2'-дезоксид-, 2'-гидроксил-модифицированного и гликоль-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, один из модифицированных

нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезокси-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), например, Ggn, Cgn, Tgn или Agn, нуклеотида, содержащего 2'-фосфонатную группу, и винилфосфонатного нуклеотида; и их комбинаций.

В еще одном варианте осуществления, по меньшей мере, одна из модификаций нуклеотидов представляет собой термически дестабилизирующую модификацию нуклеотида.

В одном варианте осуществления термически дестабилизирующая модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из абазической модификации; несовпадения с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезокси-модификации, ациклического нуклеотида, разблокированной нуклеиновой кислоты (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

Двухцепочечная область может иметь 19-30 пар нуклеотидов в длину; 19-25 пар нуклеотидов в длину; 19-23 пары нуклеотидов в длину; 23-27 пар нуклеотидов в длину; или 21-23 пары нуклеотидов в длину.

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

В одном варианте осуществления смысловая цепь имеет 21 нуклеотид в длину, и антисмысловая цепь имеет 23 нуклеотида в длину.

Область комплементарности может иметь, по меньшей мере, 17 нуклеотидов в длину; 19-23 нуклеотида в длину; или 19 нуклеотидов в длину.

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

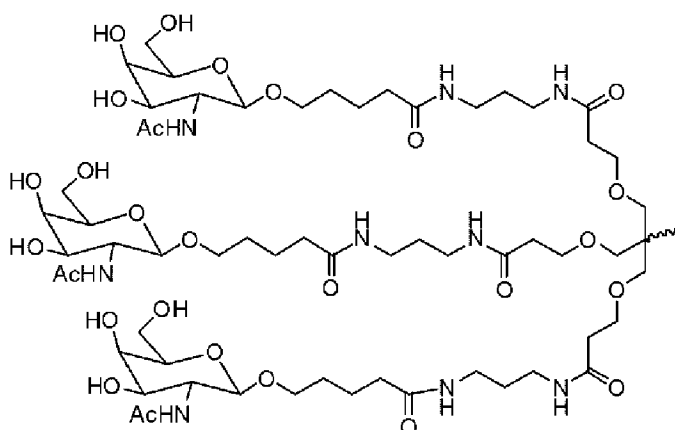
В одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит лиганд.

В одном варианте осуществления лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи дцРНК-агента.

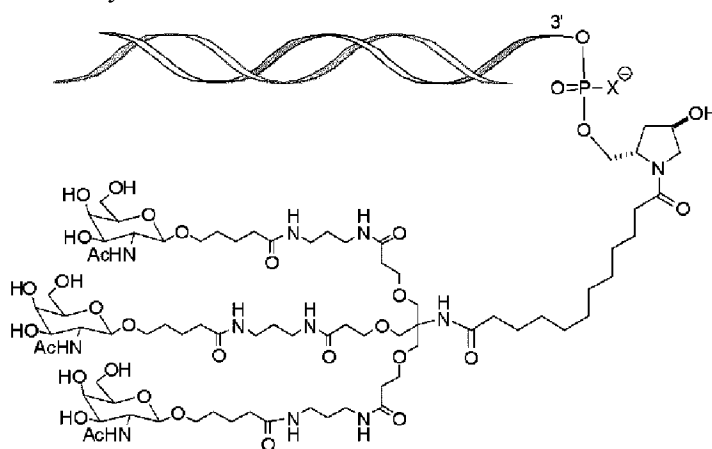
В одном варианте осуществления лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В одном варианте осуществления лиганд представляет собой:



В одном варианте осуществления дцРНК-агент конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме.



и где X представляет собой O или S.

В одном варианте осуществления X представляет собой O.

В одном варианте осуществления дцРНК-агент дополнительно содержит, по меньшей мере, одну фосфоротиаатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

В одном варианте осуществления фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи, например, антисмысловой цепи или смысловой цепи.

В еще одном варианте осуществления фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи, например, антисмысловой цепи или смысловой цепи.

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

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

Настоящее изобретение также относится к клеткам, содержащим любой из дцРНК-агентов по изобретению, и фармацевтическим композициям, содержащим любой из дцРНК-агентов по изобретению.

Фармацевтическая композиция по изобретению может включать дцРНК-агент в незабуференном растворе, например, физиологическом растворе или воде, или фармацевтическая композиция по изобретению может включать дцРНК-агент в буферном растворе, например, буферном растворе, содержащем 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 фактора комплемента В (CFB) в клетке. Способ включает приведение клетки в контакт с любой из дцРНК по изобретению или любой из фармацевтических композиций по изобретению, тем самым ингибируя экспрессию гена CFB в клетке.

В одном варианте осуществления клетка находится внутри организма субъекта, например, человека, например, субъекта, имеющего расстройство, ассоциированное с фактором комплемента В. Такие расстройства обычно связаны с воспалением или активацией иммунной системы, например, лизисом, опосредованным мембраноатакующим комплексом (MAC), анафилаксией или гемолизом. Неограничивающие примеры расстройств, ассоциированных с фактором комплемента В, включают пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), астму, ревматоидный артрит (РА); антифосфолипидный синдром; волчаночный нефрит; ишемически-реперфузионное повреждение; типичный или инфекционный гемолитико-уремический синдром (tHUS); болезнь плотных отложений (DDD); оптиконевромиелит (NMO); мультифокальную моторную невропатию (MMN); рассеянный склероз (MS); макулярную дегенерацию (например, возрастную макулярную дегенерацию (AMD)); гемолиз, повышенную активность ферментов печени и синдром низкого уровня тромбоцитов (HELLP); тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТР); спонтанную потерю плода; малоиммунный васкулит; буллезный эпидермолиз; рецидивирующую потерю плода; преэклампсию, черепно-мозговую травму, миастению гравис, болезнь холодовых агглютининов, буллезный пемфигоид, дерматомиозит, гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шига-токсин-продуцирующей *E. coli*, нейропатию С3, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (например, гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как гранулематоз Вегенера), синдром Черджа-Стросса и микроскопический полиангиит), гуморальное и васкулярное отторжение трансплантата, дисфункцию трансплантата, инфаркт миокарда (например, повреждение тканей и ишемия при инфаркте миокарда), аллогенный трансплантат, сепсис (например, неблагоприятный исход при сепсисе), ишемическую болезнь сердца, дерматомиозит, болезнь Грейвса, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, системный воспалительный ответ, сепсис, септический шок, повреждение спинного мозга, гломерулонефрит, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет I типа, псориаз, пемфигус, аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА), ИТР, синдром Гудпасчера, болезнь Дегоса, антифосфолипидный синдром (APS), катастрофический APS (CAPS), сердечно-сосудистое расстройство, миокардит, цереброваскулярное расстройство,

периферическое (например, скелетно-мышечное) васкулярное расстройство, реноваскулярную болезнь, мезентериальное/кишечнососудистое расстройство, нефрит при пурпуре Шенлейна-Геноха, васкулит, ассоциированный с системной красной волчанкой, васкулит, ассоциированный с ревматоидным артритом, иммунный комплексный васкулит, болезнь Такаясу, дилатационную кардиомиопатию, диабетическую ангиопатию, болезнь Кавасаки (артериит), венозную газовую эмболию (VGE) и рестеноз после установки стента, ротационную атерэктомию и чрескожную транслюминальную коронарную ангиопластику (PTCA) (см., например, Holers (2008) *Immunological Reviews*, 223:300-316; Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology*, 41:147-152; публикацию патента США № 20070172483).

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломеруллопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии, поликистозной болезни почек, мембранозной нефропатии, возрастной макулярной дегенерации, атипичного гемолитико-уремического синдрома, тромботической микроангиопатии, миастении гравис, ишемии и реперфузионного повреждения, пароксизмальной ночной гемоглобинурии и ревматоидного артрита.

В еще одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломеруллопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек.

В одном варианте осуществления приведение в контакт клетки с дцРНК-агентом ингибирует экспрессию CFB, по меньшей мере, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В одном варианте ингибирование экспрессии CFB снижает уровень белка CFB в сыворотке субъекта, по меньшей мере, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего расстройство, при котором было бы полезно снижение экспрессии фактора комплемента В (CFB). Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из дцРНК по изобретению или любой из фармацевтических композиций по изобретению, тем самым обеспечивая лечение субъекта, страдающего расстройством, при котором было бы полезно снижение экспрессии CFB.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу профилактики развития расстройства, при котором было бы полезно снижение экспрессии фактора комплемента В (CFB) у субъекта, имеющего, по меньшей мере, один признак или симптом расстройства, которое еще не соответствует диагностическим критериям для данного расстройства. Способ включает введение субъекту профилактически эффективного количества любой из дцРНК по изобретению или любой из фармацевтических композиций по изобретению, тем самым обеспечивая профилактику прогрессирования у субъекта до соответствия диагностическим критериям данного расстройства, при котором было бы полезно снижение экспрессии CFB.

В одном варианте осуществления расстройство представляет собой расстройство, ассоциированное с фактором комплемента В (CFB).

В одном варианте осуществления субъектом является человек.

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 одном варианте осуществления уровень CFB в образце(ах) субъекта представляет собой уровень белка CFB в образце(ах) крови или сыворотки.

В одном варианте осуществления введение агента субъекту вызывает снижение гемолиза или уменьшение накопления белка CFB.

В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению также включают введение субъекту дополнительного терапевтического средства.

В некоторых аспектах дополнительный терапевтический агент представляет собой иРНК-агент, нацеленный на ген C5, такой как агент, описанный в патенте США № 9249415, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В еще одних аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой иРНК-агент, нацеленный на ген фактора комплемента В (CFB), такой как описан в патенте США № 10465194, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В еще одних аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор C5, такой как антитело против компонента комплемента C5 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, экулизумаб, равулизумаб-cwvz или позелимаб (REGN3918)) или ингибитор пептида C5 (например, зилукоплан). Экулизумаб представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG2/4 с легкой каппа-цепью, которое специфически связывается с компонентом комплемента C5 с высокой аффинностью и ингибирует расщепление C5 с образованием C5a и C5b, тем самым ингибируя образование терминального комплекса комплемента C5b-9. Экулизумаб описан в патенте США № 6355245, полное содержание которого включено здесь посредством ссылки. Равулизумаб-cwvz представляет собой гуманизированное моноклональное антитело IgG2/4, которое специфически связывается с компонентом комплемента C5 с высокой аффинностью и ингибирует расщепление C5 с образованием C5a и C5b, тем самым ингибируя образование терминального комплекса комплемента C5b-9. Равулизумаб-cwvz описан в WO 2015134894, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Позелимаб (также известный как H4H12166P, описанный в US 20170355757, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки), представляет собой полностью человеческое моноклональное IgG4 антитело, предназначенное для блокирования фактора комплемента C5. Зилукоплан представляет собой синтетический макроциклический пептид, который связывается с компонентом комплемента 5 (C5) с субнанолярной аффинностью и аллостерически ингибирует его расщепление с образованием C5a и C5b при активации классического, альтернативного или

лектинового путей (см., например, WO 2017105939, все разделы из которой включены здесь посредством ссылки).

В еще одних аспектах дополнительное терапевтическое средство представляет собой ингибитор пептида C3 или его аналог. В одном варианте осуществления ингибитор пептида C3 представляет собой компстатин. Компстатин представляет собой циклический тридекапептид с высокой и селективной ингибирующей активностью в отношении C3. Компстатин и его аналоги описаны в патентах США № 7888323, 7989589 и 8442776, в публикациях патентов США № 2012/0178694 и 2013/0053302, а также в РСТ публикациях WO 2012/174055, WO 17803/2, WO 2013/036778, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления способы лечения различных заболеваний, ассоциированных с CFB, известные в данной области, используют в комбинации с иРНК-агентами по изобретению.

Настоящее изобретение также относится к наборам, включающим любую из дцРНК по изобретению или любую из фармацевтических композиций по изобретению, и, необязательно, инструкции по применению.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показаны три пути комплемента: альтернативный, классический и лектиновый.

На фиг. 2А представлена тепловая карта, показывающая влияние двойного нацеливания на C3 и CFB на гемолитическую активность альтернативного пути в сыворотке крови человека *in vitro*.

На фиг. 2В представлена тепловая карта, показывающая влияние двойного нацеливания на C3 и C5 на гемолитическую активность альтернативного пути в сыворотке крови человека *in vitro*.

На фиг. 2С представлена тепловая карта, показывающая влияние двойного нацеливания на C3 и C5 на гемолитическую активность классического пути в сыворотке крови человека *in vitro*.

На фиг. 2D представлена тепловая карта, показывающая влияние двойного нацеливания на C3 и C5 на гемолитическую активность классического пути, как определено с использованием анализа комплемента классического пути Wieslab® (CCP) в сыворотке крови человека *in vitro*.

На фиг. 3А представлен график, показывающий эффект введения однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3; или дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или дцРНК-агента, нацеленного на C5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C5, на уровни белка C3, уровни белка CFB или уровни белка C5 в сыворотке приматов, отличных

от человека.

На фиг. 3В представлен график, показывающий эффект введения однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3; или дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или дцРНК-агента, нацеленного на С5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С5, на гемолитическую активность альтернативного пути в сыворотке приматов, отличных от человека.

На фиг. 3С представлен график, показывающий эффект введения однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3; или дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или дцРНК-агента, нацеленного на С5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С5, на гемолитическую активность классического пути в сыворотке приматов, отличных от человека.

На фиг. 3D представлен график, показывающий эффект введения однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3; или дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или дцРНК-агента, нацеленного на С5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С5, на гемолитическую активность альтернативного пути, как определено с использованием анализа комплемента альтернативного пути Wieslab® (CAP) в сыворотке нечеловекообразных приматов.

На фиг. 3Е представлен график, показывающий эффект введения однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3; или дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или дцРНК-агента, нацеленного на С5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С3, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С5; или однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB, и однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на С5, на гемолитическую активность альтернативного пути, как определено с использованием анализа комплемента классического пути Wieslab® (CCP) в сыворотке приматов, отличных от человека.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинговым комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, кодирующего фактор комплемента В (CFB). Ген может находиться внутри клетки, например, клетки субъекта, такого как человек. Использование таких иРНК делает возможным целенаправленную деградацию мРНК соответствующего гена (ген фактора комплемента В) у млекопитающих.

иРНК по изобретению были разработаны для нацеливания на ген фактора комплемента В человека, включая участки гена, которые являются консервативными в ортологах фактора комплемента В других видов млекопитающих. Не желая ограничиваться конкретной теорией, полагается, что комбинация или субкомбинация вышеуказанных свойств и конкретных сайтов-мишеней или специфических модификаций в таких иРНК придают иРНК по изобретению повышенную эффективность, стабильность, активность, продолжительность действия и безопасность.

Следовательно, настоящее изобретение относится к способам лечения и профилактики расстройства, заболевания или патологического состояния, ассоциированного с фактором комплемента В, например, расстройства, заболевания или патологического состояния с воспалением или активацией иммунной системы, например, лизиса, опосредованного мембраноатакующим комплексом (MAC), анафилаксии или гемолиза, например, гломерулопатии С3, системной красной волчанки (СКВ), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек, с использованием композиций иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинговым комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, кодирующего фактор комплемента В.

иРНК по изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область длиной примерно до 30 нуклеотидов или меньше, например, 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, где данная область является по существу комплементарной, по меньшей мере, участку транскрипта мРНК гена фактора комплемента В. В некоторых вариантах осуществления иРНК-агенты по настоящему изобретению включают цепь РНК (антисмысловую цепь), имеющую область длиной примерно 21-23 нуклеотидов, которая является по существу комплементарной, по меньшей мере, участку гена мРНК транскрипта фактора комплемента В.

В некоторых вариантах осуществления одна или обе цепи двухцепочечных РНК-агентов по изобретению имеют до 66 нуклеотидов, например, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 нуклеотидов в длину, с областью, состоящей, по меньшей мере, из 19 последовательных нуклеотидов, которая является по существу комплементарной, по меньшей мере, участку гена мРНК транскрипта фактора комплемента В. В некоторых вариантах осуществления такие иРНК-агенты, имеющие более длинные антисмысловые цепи, могут включать вторую цепь РНК (смысловую цепь) длиной 20-60 нуклеотидов, где

смысловая и антисмысловая цепи образуют дуплекс из 18-30 последовательных нуклеотидов.

Применение иРНК по изобретению делает возможным целенаправленную деградацию мРНК соответствующего гена (гена фактора комплемента В) у млекопитающих. Используя анализы *in vitro* и *in vivo*, авторы настоящего изобретения показали, что иРНК, нацеленные на ген фактора комплемента В, могут эффективно опосредовать РНКи, приводя к существенному ингибированию экспрессии гена фактора комплемента В. Таким образом, способы и композиции, включающие такие иРНК, являются пригодными для лечения субъекта, страдающего расстройством, ассоциированным с фактором комплемента В, например, гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек.

Следовательно, настоящее изобретение относится к способам и комбинированной терапии для лечения субъекта, страдающего заболеванием, при котором было бы полезно ингибировать или снижать экспрессию гена фактора комплемента В, например, заболеванием, ассоциированным с фактором комплемента В, таким как гломерулопатия С3, системная красная волчанка (SLE), например, волчаночный нефрит, IgA-нефропатия, диабетическая нефропатия и поликистозная болезнь почек, с использованием композиций иРНК, которые воздействуют на опосредованное РНК-индуцированным сайленсинговым комплексом (RISC) расщепление РНК-транскриптов гена, кодирующего фактор комплемента В.

Настоящее изобретение также относится к способам профилактики, по меньшей мере, одного симптома у субъекта, страдающего заболеванием, при котором было бы полезно ингибировать или снижать экспрессию гена фактора В комплемента, например, гломерулопатии С3, системной красной волчанки (СКВ), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек.

В некоторых вариантах осуществления введение дцРНК субъекту вызывает снижение уровня мРНК CFB, уровня белка CFB, активности СН50 (показатель общего гемолитического комплемента), АН50 (показатель гемолитической активности альтернативного пути комплемента), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (показатель внутрисосудистого гемолиза), уровень гемоглобина; уровень любого одного или более из С3, С9, С5, С5а, С5b и растворимого комплекса С5b-9.

Следующее подробное описание раскрывает способы получения и применения композиций, содержащих иРНК, для ингибирования экспрессии гена фактора комплемента В, а также композиции, применения и способы лечения субъектов, для которых было бы полезно ингибирование или снижение экспрессии гена фактора комплемента В, например, субъектов, предрасположенных к развитию расстройства, или у которых диагностировано расстройство, ассоциированное с фактором комплемента В.

I. Определения

Для того чтобы настоящее изобретение 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 данного изобретения.

Артикли «а» и «ан» используются здесь для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере, одного) грамматического объекта артикля. В качестве примера, «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. Например, «смысловая цепь или антисмысловая цепь» понимается как «смысловая цепь или антисмысловая цепь или смысловая цепь и антисмысловая цепь».

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», «не менее чем» или «не более чем» 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 следует из контекста. Например, «по меньшей мере, 19 нуклеотидов из 21-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 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, диапазоны включают как верхний, так и нижний предел.

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

В случае противоречия между указанным сайтом-мишенью и нуклеотидной

последовательностью смысловой или антисмысловой цепи, указанная последовательность имеет приоритет.

В случае противоречия между последовательностью и ее указанным сайтом в транскрипте или другой последовательности, то указанная в описании нуклеотидная последовательность имеет приоритет.

В рамках настоящего изобретения, термин «фактор комплемента В», используемый взаимозаменяемо с термином «CFB», относится к хорошо известному гену и полипептиду, также известному в данной области как AHUS, BF, CFAB, BFD, FB, GBG, FBI12, В-фактор, пропердин, H2-Bf, богатый глицином бета-гликопротеин, проакселератор C3, пропердин-фактор В, проактиватор C3, PBF2, богатый глицином бета-гликопротеин, конвертаза C3/C5, ЕС 3.4.21 и ЕС 3.4. 21.473.

Термин «CFB» включает человеческий CFB, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого найти, например, в GenBank с идентификационным номером GI:189181756; мышинный CFB, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank с идентификационными номерами GI:218156288 и GI:218156290; крысиный CFB, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank с идентификационным номером GI:218156284; и CFB шимпанзе, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank с идентификационным номером GI:57114201. Термин «CFB» также включает CFB *Macaca fascicularis*, аминокислотную и нуклеотидную последовательность которого можно найти, например, в GenBank с идентификационным номером 53620) на веб-сайте проекта по расшифровке генома *Macaca* (macaque.genomics.org.cn/page/species/index.jsp). Дополнительные примеры последовательностей мРНК CFB легко доступны с использованием, например, GenBank, UniProt, OMIM и веб-сайта проекта по расшифровке генома *Macaca*.

Примеры нуклеотидных последовательностей CFB также можно найти в SEQ ID NO: 1-7. SEQ ID NO:8-14 представляют собой антисмысловые последовательности SEQ ID NO:1-7 соответственно.

В рамках настоящего изобретения, термин «CFB» также относится к встречающимся в природе вариантам последовательности ДНК гена CFB. Неограничивающие примеры вариантов последовательности в гене CFB включают 1598A>G в экзоне 12, что приводит к замещению лизина на аргинин в аминокислотном остатке 533; 858C>G в экзоне 6, что приводит к замещению фенилаланина на лейцин в аминокислотном остатке 286; и 967A>G в экзоне 7, что приводит к замещению лизина на аланин в аминокислотном остатке 323 (Tawadrous H. et al. (2010) *Pediatr Nephrol.* 25:947; Goicoechea de Jorge E et al. (2007) *Proc Natl Acad Sci. USA* 104:240). В рамках настоящего изобретения, термин «CFB» также относится к однонуклеотидным полиморфизмам в гене CFB. Были идентифицированы многочисленные варианты последовательности в гене CFB, которые можно найти, например, в NCBI dbSNP и UniProt (см., например, ncbi.nlm.nih.gov/snp).

Дополнительную информацию о CFB можно найти, например, на сайте

www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/629.

Дополнительные примеры последовательностей мРНК CFB легко доступны в общедоступных базах данных, например, GenBank, UniProt, OMIM и на веб-сайте проекта по расшифровке генома *Macaca*.

Полный состав каждого из вышеуказанных идентификационных номеров GenBank и номеров в базе 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 фактора комплемента В, включая как продукт первичной транскрипции, так и мРНК, представляющую собой продукт процессинга РНК первичной транскрипции. 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 CFB, или рядом с ней.

Последовательность-мишень имеет примерно 19-30 нуклеотидов в длину. Например, последовательность-мишень может состоять примерно из 19-30 нуклеотидов, 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. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень имеет примерно от 19 до примерно 30 нуклеотидов в длину. В других вариантах осуществления последовательность-мишень имеет примерно от 19 до примерно 25 нуклеотидов в длину. В еще одних вариантах осуществления последовательность-мишень имеет примерно от 19 до примерно 23 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления последовательность-мишень имеет примерно от 21 до примерно 23 нуклеотидов в длину. Диапазоны и длины, промежуточные по отношению к вышеуказанным диапазонам и длинам, также рассматриваются в качестве части изобретения.

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, содержащий в качестве основания гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил соответственно в качестве основания. Однако следует понимать, что термин «рибонуклеотид» или «нуклеотид» также может также относиться к модифицированному нуклеотиду, как более подробно описано ниже, или к группе заместителя-миметика (см., например, таблицу 1). Специалисту в данной области хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил могут быть замещены 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 дцРНК, представленных в изобретении, нуклеотидом, содержащим, например, инозин. В еще одном примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида могут быть замещены гуанином и урацилом, соответственно, с образованием неоднозначной пары оснований G-U с мРНК-мишенью. Последовательности, содержащие такие замещающие группы, подходят для композиций и способов, представленных в настоящем изобретении.

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. иРНК модулирует, например, ингибирует экспрессию фактора комплемента В 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 фактора комплемента В, чтобы направлять расщепление РНК-мишени. Не желая ограничиваться какой-либо 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 более 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), генерированной в клетке и способствующей образованию комплекса RISC для сайленсинга гена-мишени, т.е. гена фактора комплемента В (CFB). Следовательно, термин «миРНК» также используется в данном документе для обозначения иРНК, как описано выше.

В некоторых вариантах 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 миРНК 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 нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, 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 некоторых вариантах осуществления «иРНК» для использования в композициях, применениях и способах по настоящему изобретению представляет собой двухцепочечную РНК и упоминается в настоящем документе как «агент на основе двухцепочечной РНК», «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 фактора комплемента В (CFB). 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.

В рамках настоящего изобретения, термин «модифицированный нуклеотид» относится к нуклеотиду, независимо имеющему модифицированную группу сахара, модифицированную межнауклеотидную связь или модифицированное азотистое основание. Таким образом, термин «модифицированный нуклеотид» включает замещения, добавления или удаления, например, функциональной группы или атома в межнауклеозидных связях, групп сахара или азотистых оснований. 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 «иРНК» или «РНКи-агент» для целей настоящего описания и формулы изобретения.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения включение дезоксинуклеотида - который, как известно, является природной формой нуклеотида - если он присутствует в РНКи-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 19 до 36 пар оснований в длину, например, примерно 19-30 пар оснований в длину, например, примерно 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 пар оснований в длину, например, примерно 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. Когда две цепи являются частью одной более крупной молекулы, то они могут соединяться непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образуя дуплексную структуру, с соединяющей цепью РНК, обозначенной «петля-шпилькой». Петля-шпилька может содержать, по меньшей мере, один неспаренный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления петля-шпилька может содержать, по меньшей мере, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 или более неспаренных нуклеотидов. 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.

В некоторых вариантах осуществления две цепи двухцепочечного олигомерного соединения могут быть связаны вместе. Две цепи могут быть связаны друг с другом на обоих концах или только на одном конце. Связывание на одном конце означает, что 5'-конец первой цепи соединен с 3'-концом второй цепи или 3'-конец первой цепи соединен с 5'-концом второй цепи. Когда две цепи соединены друг с другом на обоих концах, то 5'-конец первой цепи соединяется с 3'-концом второй цепи, и 3'-конец первой цепи соединяется с 5'-концом второй цепи. Две цепи могут быть связаны друг с другом олигонуклеотидным линкером, включая, не ограничиваясь этим, $(N)_n$; где N независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, и n равно 3-23. В некоторых вариантах осуществления n равно 3-10, например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидный линкер выбран из группы, состоящей из GNRA, (G)₄, (U)₄ и (dT)₄, где N представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, и R представляет собой модифицированный или немодифицированный пуриновый нуклеотид. Некоторые нуклеотиды в линкере могут быть вовлечены во взаимодействие пар оснований с другими нуклеотидами в линкере. Две цепи также могут быть связаны друг с другом ненуклеозидным линкером, например линкер, описанный в настоящем документе. Специалисту в данной области будет понятно, что в олигонуклеотидном линкере можно использовать любые описанные здесь химические модификации или вариации олигонуклеотидов.

Олигомерные соединения типа шпильки и гантели будут иметь дуплексную область, равную или, по меньшей мере, имеющую 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 пар нуклеотидов. Дуплексная область может быть равной или меньше 200, 100 или 50 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления диапазоны дуплексной

области составляют 15-30, 17-23, 19-23 и 19-21 пару нуклеотидов в длину.

Олигомерные соединения типа шпильки могут иметь одноцепочечный выступ или концевой неспаренный участок, в некоторых вариантах осуществления на 3'-конце и в некоторых вариантах осуществления в антисмысловой стороне шпильки. В некоторых вариантах осуществления выступы имеют 1-4, чаще 2-3 нуклеотида в длину. Олигомерные соединения типа шпильки, которые могут индуцировать РНК-интерференцию, также упоминаются здесь как «кшРНК».

Когда две по существу комплементарные цепи дцРНК состоят из отдельных молекул РНК, то эти молекулы не обязательно, но могут быть ковалентно связаны. Когда две цепи соединены ковалентно посредством 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». 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 некоторых вариантах осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению представляет собой дцРНК, каждая цепь которой независимо содержит 19-23 нуклеотида, которая взаимодействует с последовательностью РНК-мишени, например, последовательностью мРНК-мишени фактора комплемента В (CFB), 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 CFB, 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 дцРНК, 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 других 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 других вариантах осуществления как 3'-, так и 5'-концы одной цепи РНКи-агента содержат выступ, по меньшей мере, из 1 нуклеотида.

В одном варианте осуществления антисмысловая цепь дцРНК имеет 1-10 нуклеотидов, 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 более нуклеотидов в выступе замещены нуклеозидтиофосфатом.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая 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 некоторых вариантах осуществления выступ на смысловой цепи или на антисмысловой цепи, или на обеих, может включать удлиненные участки длиной более 10 нуклеотидов, например, 1-30 нуклеотидов, 2-30 нуклеотидов, 10-30 нуклеотидов, 10-25 нуклеотидов, 10-20 нуклеотидов, или 10-15 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ находится на смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ находится на 3'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ находится на 5'-конце смысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ находится на антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ находится на 3'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления удлиненный выступ находится на 5'-конце антисмысловой цепи дуплекса. В некоторых вариантах осуществления один или более нуклеотидов в удлиненном выступе замещены нуклеозидтиофосфатом. В некоторых вариантах осуществления выступ включает самокомплементарный участок, так что выступ способен образовывать шпилькообразную структуру, стабильную в физиологических условиях.

Термин «тупой» или «тупой конец» означает, что на этом конце двухцепочечного РНКи-агента отсутствуют неспаренные нуклеотиды, т.е. нет нуклеотидных выступов.

Двухцепочечный РНК-агент с «тупыми концами» является двухцепочечным по всей своей длине, то есть, на обоих концах молекулы отсутствуют нуклеотидные выступы. РНК-агенты по изобретению включают РНК-агенты без нуклеотидного выступа на одном конце (т.е. агенты с одним выступом и одним тупым концом) или без нуклеотидных выступов на любом конце. Чаще всего такая молекула будет двухцепочечной по всей своей длине.

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

В рамках настоящего изобретения, термин «область комплементарности» относится к области антисмысловой цепи, которая по существу комплементарна последовательности, например последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности фактора комплемента В, 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, РНК-агент, описанный здесь, может содержать одно или более несовпадений с последовательностью-мишенью. В одном варианте осуществления РНК-агент, описанный здесь, содержит не более 3 несовпадений (т.е. 3, 2, 1 или 0 несовпадений). В одном варианте осуществления РНК-агент, описанный здесь, содержит не более 2 несовпадений. В одном варианте осуществления РНК-агент, описанный здесь, содержит не более 1 несовпадения. В одном варианте осуществления РНК-агент, описанный здесь, содержит 0 несовпадений. В некоторых вариантах осуществления, когда антисмысловая цепь РНК-агента содержит несовпадения с последовательностью-мишенью, то

необязательно это несовпадение может ограничиваться последними 5 нуклеотидами либо от 5'-, либо от 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах осуществления для РНК-агента из 23 нуклеотидов цепь, комплементарная области гена CFB, 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 РНК-агент, содержащий несовпадение с последовательностью-мишенью, в ингибировании экспрессии гена CFB. Оценка эффективности РНК-агентов с несовпадениями в ингибировании экспрессии гена CFB важна, особенно если известно, что конкретная область комплементарности в гене CFB имеет полиморфную изменчивость последовательности в пределах популяции.

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 «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.

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). 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 иРНК, 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, сохраняя при этом способность к гибридизации в условиях, наиболее подходящих для их конечного применения, например, ингибирование экспрессии генов, *in vitro* или *in vivo*. Однако если два олигонуклеотида сконструированы 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 между двумя олигонуклеотидами или полинуклеотидами, такими как антисмысловая цепь РНК-агента и последовательности-мишени, как будет понятно из контекста, в котором эти термины используются.

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 фактора комплемента В). Например, полинуклеотид комплементарен, по меньшей мере, участку мРНК фактора

комплемента В, если последовательность по существу комплементарна непрерывному участку мРНК, кодирующей ген фактора комплемента В (CFB).

Следовательно, в некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой цепи, раскрытые здесь, полностью комплементарны последовательности-мишени CFB.

В еще одних вариантах осуществления антисмысловые полинуклеотиды, раскрытые здесь, по существу комплементарны последовательности-мишени CFB 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, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 или 35, или участку любой из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33 или 35, 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 полинуклеотиды антисмысловой цепи, раскрытые здесь, по существу комплементарны участку последовательности-мишени CFB 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 943-965; 788-810; 734-756; 1016-1038; 1013-1035; 1207-1229; 1149-1171; 574-596; 1207-1229 или 828-850 из SEQ ID NO: 1, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, или является полностью комплементарной.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой цепи, раскрытые здесь, по существу комплементарны участку последовательности-мишени CFB 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 153-175; 202-224; 219-241; 254-276; 304-326; 321-343; 347-369; 402-424; 418-440; 447-469; 491-513; 528-550; 549-571; 566-588; 591-613; 792-814; 819-841; 967-989; 1042-1064; 1234-1256; 1250-1272; 1269-1291; 1335-1357; 1354-1376; 1372-1394; 1422-1444; 1496-1518; 1670-1692; 1716-1738; 1757-1779; 1774-1796; 1793-1815; 1844-1866; 1871-1893; 1909-1931; 1924-1947; 1947-1969; 2161-2183; 2310-2332; 2330-2352; 2355-2377; 2494-2516 и 2527-2549 из SEQ ID NO: 1, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, или является полностью комплементарной.

В еще одних вариантах осуществления полинуклеотиды антисмысловой цепи, описанные здесь, по существу комплементарны последовательности-мишени CFB 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 2-7, 13, 16, 19 и 20, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей смысловой цепи,

представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, или является полностью комплементарной.

В одном варианте осуществления РНК-агент по настоящему изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна полинуклеотиду антисмысловой цепи, который, в свою очередь, является таким же, как последовательность-мишень CFB, 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: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 или 36, или фрагменту любой из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 или 36, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, или является полностью комплементарной.

В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению включает смысловую цепь, которая по существу комплементарна полинуклеотиду антисмысловой цепи, который, в свою очередь, комплементарен последовательности-мишени фактора комплемента В, 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, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, или фрагменту любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, например, является комплементарной примерно на 85%, примерно на 90%, примерно на 95%, или является полностью комплементарной.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из химически модифицированных дуплексов AD-560018, AD-559375, AD-559160, AD-559374, AD-559060, AD-559721, AD-559026, AD-558225, AD-557069, AD-558068, AD-557422, AD-558063, AD-558066, AD-556701, AD-558657, AD-559020, AD-559023, AD-558860, AD-560019, AD-560016, AD-559008, AD-559717, AD-557072, AD-558097, AD-557774, AD-557070, AD-558065, AD-557853, AD-557079.

В некоторых вариантах осуществления смысловая и антисмысловая цепи выбраны из любого из химически модифицированных дуплексов AD-560132.1; AD-560099.1; AD-559998.1; AD-559993.1; AD-559973.1; AD-559882.1; AD-559706.1; AD-559704.1; AD-559688.1; AD-559668.1; AD-559641.1; AD-559609.1; AD-559590.1; AD-559573.1; AD-559532.1; AD-559486.1; AD-559330.1; AD-559274.1; AD-559226.1; AD-559208.1; AD-559189.1; AD-559124.1; AD-559105.1; AD-559089.1; AD-558935.1; AD-558879.1; AD-558777.1; AD-558750.1; AD-558637.1; AD-558612.1; AD-558595.1; AD-558574.1; AD-558555.1; AD-558511.1; AD-558482.1; AD-558466.1; AD-558450.1; AD-558424.1; AD-558407.1; AD-558393.1; AD-558378.1; AD-558361.1; AD-558312.1.

В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область двухцепочечного иРНК-агента равна или, по меньшей мере, имеет 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,

28, 29 или 30 более пар нуклеотидов в длину.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь двухцепочечного иРНК-агента равна или, по меньшей мере, имеет 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в длину.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь двухцепочечного иРНК-агента равна или, по меньшей мере, имеет 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов в длину.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи двухцепочечного иРНК-агента имеют от 18 до 30 нуклеотидов в длину каждая.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи двухцепочечного иРНК-агента имеют от 19 до 25 нуклеотидов в длину каждая.

В одном варианте осуществления смысловая и антисмысловая цепи двухцепочечного иРНК-агента имеют от 21 до 23 нуклеотидов в длину каждая.

В одном варианте осуществления смысловая цепь иРНК-агента имеет 21 нуклеотид в длину, и антисмысловая цепь имеет 23 нуклеотида в длину, где цепи образуют двухцепочечную область из 21 последовательной пары оснований, имеющую одноцепочечные выступы из 2 нуклеотидов на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления большинство нуклеотидов каждой цепи представляют собой рибонуклеотиды, но, как подробно описано в настоящем документе, каждая или обе цепи могут также включать один или более нерибонуклеотидов, например, дезоксирибонуклеотид или модифицированный нуклеотид. Кроме того, «иРНК» может включать рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, раскрытых в настоящем документе или известных в данной области техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле иРНК, охватываются термином «иРНК» для целей настоящего описания и формулы изобретения.

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

В одном варианте осуществления, по меньшей мере, частичное подавление экспрессии гена CFB оценивают по снижению количества мРНК CFB, которая может быть выделена или детектироваться в первой клетке или группе клеток, в которых транскрибируется ген CFB, и которые подверглись или были обработаны таким образом, что экспрессия гена CFB 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 может быть выражена в следующих показателях:

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

В рамках настоящего изобретения, выражение «приведение в контакт клетки с

иРНК», такой как дцРНК, включает приведение в контакт клетки любым возможным способом. Контактное взаимодействие клетки с иРНК включает приведение в контакт клетки *in vitro* с иРНК или приведение в контакт клетки *in vivo* с иРНК. Контактное взаимодействие может осуществляться прямо или опосредованно. Так, например, иРНК может быть приведена в физический контакт с клеткой субъектом, выполняющим способ, или, альтернативно, иРНК можно поместить в условия, которые позволят или заставят ее затем вступить в контакт с клеткой.

Контактное взаимодействие с клеткой *in vitro* может быть осуществлено, например, инкубацией клетки с иРНК. Контактное взаимодействие с клеткой *in vivo* можно осуществить, например, инъекционным введением иРНК в ткань или рядом с ней, где расположена клетка, или инъекционным введением иРНК в другую область, например, в кровоток или в подкожное пространство таким образом, что затем агент достигнет ткани, где расположена клетка, которую необходимо привести в контакт с ним. Например, иРНК может содержать или быть связанной с лигандом, например, GalNAc, который направляет иРНК в представляющее интерес место, например, печень. Также возможны комбинации методов контактного взаимодействия *in vitro* и *in vivo*. Например, также клетка может быть приведена в контакт *in vitro* с иРНК и затем трансплантирована субъекту.

В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт клетки с иРНК включает «введение» или «доставку иРНК в клетку» посредством обеспечения или осуществления захвата или поглощения клеткой. Поглощение или захват иРНК может происходить за счет диффузионных или активных клеточных процессов или с использованием вспомогательных агентов или устройств. Введение иРНК в клетку может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Например, для введения *in vivo* иРНК 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 «липидная наночастица» или «LNP» представляет собой везикулу, содержащую липидный слой, инкапсулирующий фармацевтически активную молекулу, такую как молекула нуклеиновой кислоты, например, иРНК или плазмиду, из которой транскрибируется иРНК. 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), непримата (например, кролика, овцу, хомяка, морскую свинку, собаку, крысу или мышь), или птицу, которое экспрессирует целевой ген эндогенно или гетерологично. В одном варианте осуществления субъект представляет собой человека, например, человека, которого лечат или оценивают по поводу заболевания или расстройства, при котором было бы полезно снижение экспрессии CFB; человека с риском развития заболевания или расстройства, при котором было бы полезно снижение

экспрессии CFB; человека, страдающего заболеванием или расстройством, при котором было бы полезно снижение экспрессии CFB; или человека, которого лечат от заболевания или расстройства, при котором было бы полезно снижение экспрессии CFB, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъектом является женщина. В других вариантах осуществления субъектом является мужчина. В одном варианте осуществления субъект представляет собой взрослого субъекта. В другом варианте осуществления субъектом является ребенок.

В рамках настоящего изобретения, термины «лечение» или «проводить лечение» также включают ослабление одного или более признаков или симптомов, связанных с нежелательной экспрессией CFB; уменьшение степени нежелательной активации или стабилизации CFB; ослабление или смягчение нежелательной активации или стабилизации CFB. Термин «лечение» также может означать пролонгацию выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью в отсутствии лечения.

Термин «ниже» в контексте уровня CFB 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, например уровня экспрессии белка или гена, составляет, по меньшей мере, 50%. «Ниже» в контексте уровня CFB у субъекта представляет собой снижение до уровня, принятого за диапазон нормы для субъекта без такого расстройства. В некоторых вариантах осуществления экспрессия мишени нормализуется, т. е. снижается к уровню или до уровня, принятого в качестве нормального для субъекта без такого расстройства, например, нормализация массы тела, кровяного давления или уровня липидов в сыворотке. В рамках настоящего изобретения, термин «ниже» у субъекта может относиться к снижению экспрессии гена или продукции белка в клетке у субъекта, где необязательно снижение экспрессии во всех клетках или тканях субъекта. Например, в данном контексте снижение у субъекта может включать снижение экспрессии гена или продукции белка в печени субъекта.

Термин «ниже» также может использоваться в связи с нормализацией симптома заболевания или патологического состояния, т.е. уменьшением разницы между уровнем у субъекта, страдающего заболеванием, ассоциированным с CFB, к или до уровня у здорового субъекта, не страдающего заболеванием, ассоциированным с CFB. Например, если субъект с нормальной массой тела 70 кг весит 90 кг до лечения (избыточная масса тела на 20 кг) и 80 кг после лечения (избыточная масса тела на 10 кг), то масса тела субъекта снижается до нормального веса на 50% ($10/20 \times 100\%$). Аналогично, если уровень ЛПВП у женщины повышается с 50 мг/дл (плохой) до 57 мг/дл при нормальном уровне 60 мг/дл, то разница между предыдущим уровнем у субъекта и нормальным уровнем уменьшается на 70% (разница в 10 мг/дл между уровнем у субъекта и нормой уменьшается на 7 мг/дл, $7/10 \times 100\%$). Как используется в настоящем документе, если заболевание связано с повышенным

показателем симптома, то «нормой» считается верхняя граница нормы. Если заболевание связано со сниженным показателем симптома, «нормой» считается нижняя граница нормы.

В рамках настоящего изобретения, термины «профилактика» или «проведение профилактики», когда они используются по отношению к заболеванию, расстройству или патологическому состоянию, при котором было бы полезно снижение экспрессии CFB или продукции белка CFB, то они относятся к предупреждению у субъекта, имеющего, по меньшей мере, один признак или симптом заболевания, развития других признаков и симптомов, тем самым соответствуя диагностическим критериям данного заболевания. В некоторых вариантах осуществления профилактика включает отсроченное прогрессирование до соответствия диагностическим критериям заболевания на сутки, недели, месяцы или годы по сравнению с тем, что прогнозировано исследованиями естественного течения или типичным прогрессированием заболевания.

В рамках настоящего изобретения, термины «заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В» или «заболевание, ассоциированное с CFB» представляют собой заболевание или расстройство, которое вызвано активацией комплемента или связано с ней. Термин «заболевание, ассоциированное с CFB» включает заболевание, расстройство или патологическое состояние, при котором было бы полезно снижение экспрессии гена CFB, репликации или активности белка. Неограничивающие примеры расстройств, ассоциированных с фактором комплемента В, включают пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), астму, ревматоидный артрит (РА); антифосфолипидный синдром; волчаночный нефрит; ишемически-реперфузионное повреждение; типичный или инфекционный гемолитико-уремический синдром (tHUS); болезнь плотных отложений (DDD); оптиконевромиелит (NMO); мультифокальную моторную невропатию (MMN); рассеянный склероз (MS); макулярную дегенерацию (например, возрастную макулярную дегенерацию (AMD)); гемолиз, повышенную активность ферментов печени и синдром низкого уровня тромбоцитов (HELLP); тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP); спонтанную потерю плода; малоиммунный васкулит; буллезный эпидермолиз; рецидивирующую потерю плода; презклампсию, черепно-мозговую травму, миастению гравис, болезнь холодовых агглютининов, буллезный пемфигоид, дерматомиозит, гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шига-токсин-продуцирующей *E. coli*, нейропатию С3, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (например, гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как гранулематоз Вегенера), синдром Черджа-Стросса и микроскопический полиангиит), гуморальное и васкулярное отторжение трансплантата, дисфункцию трансплантата, инфаркт миокарда (например, повреждение тканей и ишемия при инфаркте миокарда), аллогенный трансплантат, сепсис (например, неблагоприятный исход при сепсисе), ишемическую болезнь сердца, дерматомиозит, болезнь Грейвса, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, системный воспалительный ответ, сепсис, септический шок, повреждение спинного мозга, гломерулонефрит, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет I

типа, псориаз, пемфигус, аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА), ИТР, синдром Гудпасчера, болезнь Дегоса, антифосфолипидный синдром (APS), катастрофический APS (CAPS), сердечно-сосудистое расстройство, миокардит, цереброваскулярное расстройство, периферическое (например, скелетно-мышечное) васкулярное расстройство, реноваскулярную болезнь, мезентериальное/кишечнососудистое расстройство, нефрит при пурпуре Шенлейна-Геноха, васкулит, ассоциированный с системной красной волчанкой, васкулит, ассоциированный с ревматоидным артритом, иммунный комплексный васкулит, болезнь Такаясу, дилатационную кардиомиопатию, диабетическую ангиопатию, болезнь Кавасаки (артериит), венозную газовую эмболию (VGE) и рестеноз после установки стента, ротационную атерэктомию и чрескожную транслуминальную коронарную ангиопластику (PTCA) (см., например, Holers (2008) *Immunological Reviews*, 223:300-316; Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology*, 41:147-152; публикацию патента США № 20070172483).

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии, поликистозной болезни почек, мембранозной нефропатии, возрастной макулярной дегенерации, атипичного гемолитико-уремического синдрома, тромботической микроангиопатии, миастении гравис, ишемии и реперфузионного повреждения, пароксизмальной ночной гемоглобинурии и ревматоидного артрита.

В еще одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек.

Дополнительные подробности, касающиеся признаков и симптомов различных заболеваний или патологических состояний, представлены здесь и хорошо известны в данной области.

Выражение «терапевтически эффективное количество», используемое в данном документе, включает количество РНКи-агента, которое при введении субъекту, страдающему заболеванием, ассоциированным с CFB, является достаточным для эффективного лечения заболевания (например, за счет уменьшения, ослабления или контроля имеющегося заболевания или одного или более симптомов заболевания). «Терапевтически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от конкретного РНКи-агента, способа введения агента, заболевания и его тяжести, и также анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетических характеристик, типов предшествующего или сопутствующего лечения, если таковые имеются, и других индивидуальных характеристик субъекта, подлежащего лечению.

«Профилактически эффективное количество», используемое в данном документе, включает количество РНКи-агента, которое при введении субъекту, имеющему, по меньшей мере, один признак или симптом расстройства, ассоциированного с CFB, является

достаточным для профилактики или замедления прогрессирования заболевания у субъекта, соответствуя полным диагностическим критериям заболевания. Профилактика заболевания включает в себя замедление прогрессирования заболевания до полной остановки развития. «Профилактически эффективное количество» может варьироваться в зависимости от РНКи-агента, способа введения агента, степени риска развития заболевания и анамнеза, возраста, массы тела, семейного анамнеза, генетических характеристик, типов предшествующего или сопутствующего лечения, и любых других индивидуальных характеристик пациента, подлежащего лечению.

«Терапевтически эффективное количество» или «профилактически эффективное количество» также включает количество РНКи-агента, которое оказывает определенный желаемый 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 тщательной медицинской оценки, подходят для использования при контактировании с тканями людей и животных без проявления чрезмерной токсичности, раздражающего действия, 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, смазывающее вещество, тальк, стеарат магния, кальция или цинка, или стерическую кислоту) или инкапсулирующий растворитель материал, участвующий в переносе или транспортировке соединения по настоящему изобретению 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. Такие носители известны в данной области техники. Фармацевтически приемлемые носители включают носители для введения путем инъекции.

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 печени (например, всей печени или определенных сегментов печени или определенных типов клеток в печени, например,

таких как гепатоциты). В некоторых вариантах осуществления «образец, полученный от субъекта» относится к моче, полученной от субъекта. «Образец, полученный от субъекта» может относиться к крови или полученной из крови сыворотке или плазме субъекта.

II. иРНК по изобретению

Настоящее изобретение относится к иРНК, которые ингибируют экспрессию гена фактора комплемента В. В некоторых вариантах осуществления иРНК включает молекулы двухцепочечной рибонуклеиновой кислоты (дцРНК) для ингибирования экспрессии гена СFB в клетке, такой как клетка субъекта, например млекопитающего, такого как человек, предрасположенного к развитию расстройства, ассоциированного с фактором комплемента В. дцРНК-агент включает антисмысловую цепь, имеющую область комплементарности, которая комплементарна, по меньшей мере, участку мРНК, образовавшейся при экспрессии гена СFB. Область комплементарности имеет примерно 19-30 нуклеотидов в длину (например, примерно 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20 или 19 нуклеотидов в длину). При контактировании с клеткой, экспрессирующей ген СFB, иРНК ингибирует экспрессию гена СFB (например, гена СFB человека, примата, животного, отличного от примата, или крысы) по меньшей мере, примерно на 50%, по данным анализа 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 некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии определяют с использованием метода количественной ПЦР, представленного в примерах в настоящем документе, с миРНК, например, в концентрации 10 нМ, в соответствующей клеточной линии организма, представленной в ней. В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии *in vivo* определяется нокдауном человеческого гена у грызунов, экспрессирующих человеческий ген, например, у мыши или мыши, инфицированной AAV, экспрессирующей человеческий целевой ген, например, при введении в виде однократной дозы, например, в дозе 3 мг/кг на пике экспрессии РНК.

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, образовавшейся во время экспрессии гена СFB. 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 от 19 до 30 нуклеотидов в длину.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК имеет от 19 до 23 нуклеотидов в длину, или примерно 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 с обычной квалификацией 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 имеет длину примерно от 19 до 30 пар оснований, например, 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. 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, имеет 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 еще одном варианте осуществления дцРНК не является встречающейся в природе миРНК. В еще одном варианте осуществления иРНК-агент, пригодный для нацеливания на экспрессию фактора комплемента В, не образуется в клетке-мишени в результате расщепления более крупной дцРНК.

дцРНК, описанная здесь, может дополнительно включать один или более одноцепочечных нуклеотидных выступов, например, из 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов. дцРНК, имеющие по меньшей мере, один нуклеотидный выступ, могут обладать более высокими ингибиторными свойствами по сравнению с их аналогами с тупыми концами. Нуклеотидный выступ может содержать или состоять из аналога нуклеотида/нуклеозида, 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 иРНК 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.

Независимо от способа синтеза препарат миРНК можно приготовить в растворе (например, водном или органическом растворе), подходящем для формуляции препарата. Например, препарат миРНК можно осадить и повторно растворить в чистой бидистиллированной воде и лиофилизировать. Затем высушенную миРНК можно ресуспендировать в растворе, подходящем для предполагаемого процесса приготовления.

В одном аспекте дцРНК по настоящему изобретению включает, по меньшей мере, две нуклеотидные последовательности, смысловую последовательность и антисмысловую последовательность. Последовательность смысловой цепи может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, и соответствующая нуклеотидная последовательность антисмысловой цепи для смысловой цепи может быть выбрана из группы последовательностей, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20. 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

фактора комплемента В. Таким образом, в этом аспекте дцРНК будет включать два олигонуклеотида, где один олигонуклеотид описывается как смысловая цепь, представленная в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, и второй олигонуклеотид описывается как соответствующая антисмысловая для смысловой цепи, представленной в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20.

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

В некоторых вариантах осуществления смысловая или антисмысловая цепь выбрана из смысловой или антисмысловой цепи любого из дуплексов AD-560018, AD-559375, AD-559160, AD-559374, AD-559060, AD-559721, AD-559026, AD-558225, AD-557069, AD-558068, AD-557422, AD-558063, AD-558066, AD-556701, AD-558657, AD-559020, AD-559023, AD-558860, AD-560019, AD-560016, AD-559008, AD-559717, AD-557072, AD-558097, AD-557774, AD-557070, AD-558065, AD-557853 или AD-557079.

Следует понимать, что хотя последовательности, представленные в таблицах 2, 4, 6 и 19, не описаны как модифицированные или конъюгированные последовательности, РНК в иРНК по настоящему изобретению, например, дцРНК по настоящему изобретению, может содержать любую из последовательностей, представленных в любой из таблиц 2, 4, 6 и 19, которая является немодифицированной, неконъюгированной или модифицированной или конъюгированной иначе, чем представлено в таблицах. Другими словами, изобретение охватывает дцРНК из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, которые являются немодифицированными, неконъюгированными, модифицированными или конъюгированными, как здесь описано.

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 в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, дцРНК, описанные в настоящем документе, могут включать, по меньшей мере, одну цепь длиной не менее 21 нуклеотида. Можно обоснованно ожидать, что более короткие дуплексы, имеющие одну или более последовательностей, представленных в таблицах 2-7, 13, 16, 19 и 20, за исключением нескольких нуклеотидов на одном или обоих концах, могут быть столь же эффективными по сравнению с дцРНК, описанными выше. Следовательно, дцРНК, имеющие последовательность из по меньшей мере 19, 20 или более последовательных нуклеотидов, полученных из любой из последовательностей любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, и различающиеся по своей способности ингибировать экспрессию гена фактора комплемента В посредством ингибирования не более чем примерно на 5, 10, 15, 20, 25 или

30% от дцРНК, содержащей полную последовательность, входят в объем настоящего изобретения.

Кроме того, РНК, представленные в таблицах 2-7, 13, 16, 19 и 20, идентифицируют сайт(ы) в транскрипте фактора комплемента В, который чувствителен к RISC-опосредованному расщеплению. Таким образом, настоящее изобретение дополнительно включает иРНК, нацеленные на один из этих сайтов. Как используется в данном документе, говорят, что иРНК нацелена на конкретный сайт транскрипта РНК, если иРНК способствует расщеплению транскрипта в любом участке этого конкретного сайта. Такая иРНК, как правило, будет включать, по меньшей мере, примерно 19 последовательных нуклеотидов любой из последовательностей, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20, связанных с дополнительными нуклеотидными последовательностями, взятыми из области, смежной с выбранной последовательностью в гене фактора комплемента В.

иРНК-агент, описанный в настоящем документе, может содержать одно или более несовпадений с последовательностью-мишенью. В одном варианте осуществления РНКи-агент, описанный в настоящем документе, 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 в настоящем документе, содержит 0 несовпадений. В некоторых вариантах осуществления, если антисмысловая цепь РНКи-агента содержит несовпадения с последовательностью-мишенью, то такое несовпадение может необязательно ограничиваться последними 5 нуклеотидами либо с 5'-, либо с 3'-конца области комплементарности. Например, в таких вариантах осуществления для РНКи-агента из 23 нуклеотидов цепь, которая комплементарна области гена CFB, обычно не содержит какого-либо несоответствия 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, для ингибирования экспрессии гена CFB. Определение эффективности РНКи-агентов с несовпадениями в ингибировании экспрессии гена CFB важно, особенно если известно, что конкретная область комплементарности в гене CFB имеет полиморфную вариабельность последовательности в пределах популяции.

III. Модифицированные иРНК по изобретению

В некоторых вариантах осуществления РНК в иРНК 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 других вариантах осуществления РНК в иРНК по настоящему изобретению, например, дцРНК, химически модифицируют для повышения стабильности или других преимущественных характеристик. В некоторых вариантах осуществления изобретения по существу все нуклеотиды иРНК по настоящему изобретению являются модифицированными. В еще одних вариантах осуществления

настоящего изобретения все нуклеотиды иРНК по настоящему изобретению являются модифицированными. В других вариантах осуществления изобретения все нуклеотиды иРНК или практически все нуклеотиды иРНК модифицированы, т.е. в цепи иРНК присутствует не более 5, 4, 3, 2 или 1 немодифицированных нуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты, описанные в изобретении, 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, замещение стабилизирующими основаниями, дестабилизирующими основаниями или основаниями, которые образуют пары оснований с более широким репертуаром партнеров, удаление оснований (абазические нуклеотиды) или конъюгированные основания; модификации сахара (например, в 2'-положении или 4'-положении) или замещение сахара; модификации остова, включая модификацию или замещение фосфодиэфирных связей. Конкретные примеры РНКи-соединений, 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. Для целей 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 модифицированная иРНК 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 от 3'-5' к 5'-3' или от 2'-5' к 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 по существу 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 связей, 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 более 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.

Предусматриваются подходящие миметики РНК для применения в иРНК по настоящему изобретению, в которых сахар и межнуклеозидные связи, т.е. остов из нуклеотидных единиц, замещаются новыми группами. Единицы, представленные основаниями, сохраняются для гибридизации с соответствующим нуклеиновокислотным соединением-мишенью. Одно такое олигомерное соединение, миметик РНК, которое, как было показано, обладает превосходными свойствами в отношении гибридизации,

называется пептидо-нуклеиновой кислотой (PNA). В PNA-соединениях сахарный остов РНК замещается остовом, содержащим амид, в частности, аминоэтилглициновым остовом. Азотистые основания сохраняются, 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 осуществления, описанные в изобретении, включают РНК с фосфоротиоатными остовами и олигонуклеозиды с остовами, содержащими гетероатомы, и в частности $--CH_2--NH--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--O--CH_2--$ [известный как метилен(метилямино)- или ММІ-остов], $--CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--$, $--CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2--$ и $--N(CH_3)--CH_2--CH_2--$, 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 $-O-P(O)(OH)-OCH_2-$.

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 C_1-C_{10} алкил или C_2-C_{10} алкенил и C_2-C_{10} алкинил. Примеры подходящих модификаций включают $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ и $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, где n и m равны от 1 до примерно 10. В других вариантах дцРНК содержат одну из следующих групп в 2'-положении: C_1-C_{10} 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, аминокламино, полиамин, замещенный сил, 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'-диметиламинооксиэтокс, т.е., группа $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, также известная как 2'-DMAOE, описанная в примерах ниже, и 2'-диметиламиноэтоксидэтокс (также известная в данной области как 2'-диметиламиноэтоксидэтил или 2'-DMAEOE), т.е. $2'-O--CH_2--O--CH_2--N(CH_3)_2$. Дополнительные иллюстративные модификации включают: 5'-Me-2'-F-нуклеотиды, 5'-Me-2'-OMe-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, в частности в 3'-положении сахара 3'-концевого нуклеотида или в 2'-5'-связанных дцРНК и в 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. иРНК 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.

иРНК 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 (А) и гуанин (G) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) 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 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

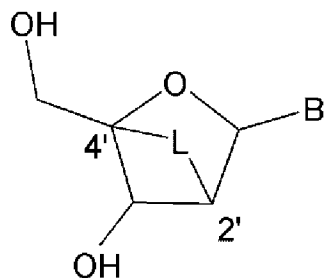
кислот на 0,6-1,2°C (Sanghvi Y. S., Crooke S. T. and Lebleu B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), и являются примером замещений оснований, еще более предпочтительно в сочетании с 2'-О-метоксиэтил-модификациями сахара.

Репрезентативные патенты США, в которых описано получение некоторых из вышеуказанных модифицированных азотистых оснований, а также других модифицированных азотистых оснований, включают, не ограничиваясь этим, вышеуказанные 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.

В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент по настоящему изобретению также можно модифицировать, включив в него одну или более групп бициклического сахара. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное мостиковым соединением из двух атомов. «Бициклический сахар» представляет собой фуранозильное кольцо, модифицированное кольцом, образованным мостиковым соединением двух атомов углерода, смежных или несмежных. «Бициклический нуклеозид» («BNA») представляет собой нуклеозид, имеющий группу сахара, содержащий мостик в кольце, образованном мостиковым соединением, соединяющим два атома углерода, смежных или несмежных, атомы сахарного кольца, тем самым образуют бициклическую кольцевую систему. В некоторых вариантах мостик соединяет 4'-углерод и 2'-углерод сахарного кольца, необязательно через атомы 2'-ациклического кислорода. 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, содержащую 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.

Заблокированный нуклеозид может быть представлен структурой (без

стереохимии),



где В представляет собой азотистое основание или модифицированное азотистое основание, и L представляет собой линкерную группу, которая соединяет 2'-углерод с 4'-углеродом рибозного кольца.

Примеры таких бициклических нуклеозидов, соединенных 4' к 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 вышеуказанных 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).

иРНК-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, называемой здесь «S-cEt».

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

Репрезентативные публикации патентов 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 включено здесь посредством ссылки.

Потенциально стабилизирующие модификации концов молекул РНК могут включать N-(ацетиламинокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-ННAc), N-(капроил-4-гидроксипролинол (Нур-С6), N-(ацетил-4-гидроксипролинол (Нур-ННAc), тимидин-2'-О-дезокситимидин (простой 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 иРНК по настоящему изобретению включают 5'-фосфат или 5'-миметик фосфата, например, 5'-концевой фосфат или миметик фосфата в антисмысловой цепи иРНК. Подходящие миметики фосфата описаны, например, в заявке на патент США 2012/0157511, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки.

А. Модифицированные иРНК, содержащие мотивы по изобретению

В некоторых аспектах изобретения двухцепочечные иРНК-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 из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах могут быть введены в смысловую цепь

или антисмысловую цепь дцРНК-агента, в частности, в сайт расщепления или рядом с ним. В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь и антисмысловая цепь дцРНК-агента могут быть полностью модифицированы. Введение этих мотивов прерывает паттерн модификации, если он присутствует, смысловой или антисмысловой цепи. дцРНК-агент можно необязательно конъюгировать с лигандом, производным GalNAc, например, в смысловой цепи.

Более конкретно, когда смысловая цепь и антисмысловая цепь двухцепочечного РНК-агента полностью модифицированы, чтобы иметь один или более мотивов из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах в месте расщепления, по меньшей мере в одной цепи дцРНК-агента или рядом с ним, то наблюдалась активность сайленсинга генов дцРНК-агента.

Следовательно, настоящее изобретение относится к двухцепочечным РНК-агентам, способным ингибировать экспрессию гена-мишени (т.е. гена CFB) *in vivo*. РНК-агент включает смысловую цепь и антисмысловую цепь. Каждая цепь РНК-агента может иметь 17-30 нуклеотидов в длину, 25-30 нуклеотидов в длину, 27-30 нуклеотидов в длину, 19-25 нуклеотидов в длину, 19-23 нуклеотидов в длину, 19-21 нуклеотида в длину, 21-25 нуклеотидов в длину, 21-23 нуклеотида в длину.

Смысловая цепь и антисмысловая цепь обычно образуют дуплексную двухцепочечную РНК («дцРНК»), также называемую здесь «дцРНК-агентом». Дуплексная область РНК-агента может иметь 27-30 пар нуклеотидов в длину, 19-25 пар нуклеотидов в длину, 19-23 пар 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 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 и 27 нуклеотидов в длину.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент может содержать один или более 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 некоторых вариантах осуществления выступающие области могут включать удлиненные выступающие области, как указано выше. 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 некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в выступающей области дцРНК-агента могут независимо представлять собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, включая, помимо прочего, 2'-модифицированный сахар,

такой как 2'-F, 2'-О-метил, тимидин (Т), 2'-О-метоксиэтил-5-метилуридин (Тео), 2'-О-метоксиэтиладенозин (Аео), 2'-О-метоксиэтил-5-метилцитидин (m5Ceo) и любые их комбинации.

Например, ТТ может представлять собой выступающую последовательность на любом конце 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 дцРНК-агента могут быть фосфорилированы. В некоторых вариантах осуществления выступающая(ие) область(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.

РНКи-агент может содержать только один выступ, что может усиливать интерференционную активность РНКи, не оказывая влияния на ее общую стабильность. Например, одноцепочечный выступ может находиться на 3'-конце смысловой цепи или, альтернативно, на 3'-конце антисмысловой цепи. РНКи также может иметь тупой конец, расположенный на 5'-конце антисмысловой цепи (т. е. на 3'-конце смысловой цепи) или наоборот. Как правило, антисмысловая цепь дцРНК-агента 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 некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент имеет двойные тупые концы из 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 одних вариантах осуществления дцРНК-агент имеет двойные тупые концы из 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 дцРНК-агент имеет двойные тупые концы из 21 нуклеотида 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 некоторых вариантах осуществления дцРНК-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. В одном варианте осуществления выступ из 2 нуклеотидов находится на 3'-конце антисмысловой цепи.

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

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-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 нуклеотидам 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 некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент содержит смысловую и антисмысловую цепи, где дцРНК-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 расщепление с участием Dicer дцРНК-агента приводит к образованию миРНК, содержащей 3'-конец второй цепи, тем самым снижая экспрессию гена-мишени у млекопитающего. Необязательно, дцРНК-агент дополнительно содержит лиганд.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь дцРНК-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 некоторых вариантах осуществления антисмысловая цепь дцРНК-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 дцРНК-агента, имеющего дуплексную область 19-23 нуклеотида в длину, сайт расщепления антисмысловой цепи обычно находится в положениях 10, 11 и 12 от 5'-конца. Таким образом, мотивы из трех одинаковых модификаций могут находиться в положениях 9, 10 и 11; в положениях 10, 11 и 12; в положениях 11, 12 и 13; в положениях 12, 13 и 14; или в 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 дцРНК-агента от 5'-конца.

Смысловая цепь дцРНК-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 нуклеотидный 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 некоторых вариантах осуществления смысловая цепь дцРНК-агента может содержать более одного мотива из 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 более нуклеотидами. Когда мотивы непосредственно примыкают друг к другу, то тогда химический состав мотивов отличается друг от друга, и когда мотивы разделены одним или более 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 сайте расщепления или рядом с ним, или с любой стороны от ведущего мотива.

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

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

В еще одних вариантах осуществления крыльевая модификация в смысловой цепи или антисмысловой цепи дцРНК-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 дцРНК-агента содержат, по меньшей мере, одну крыльевую модификацию, то крыльевые модификации могут приходиться на один и тот же конец дуплексной области и иметь перекрывающиеся один, два или три нуклеотида.

Когда смысловая цепь и антисмысловая цепь дцРНК-агента содержат, по меньшей мере, две крыльевые модификации, то 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 некоторых вариантах осуществления каждый нуклеотид в смысловой и антисмысловой цепях молекулы дцРНК-агента 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 более 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 указанных положениях в нуклеиновой кислоте, но во многих случаях она отсутствует. В качестве примера, 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 нуклеотидах 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 положении несвязывающего О может находиться 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 может находиться 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'-дезоксидезокси-2'-фтор- (2'-F) или 2'-О-метилмодифицированного вместо сахара рибозы 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 LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-дезоксидезокси 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.

Как правило, в смысловой и антисмысловой цепи находится, по меньшей мере, две различные модификации. Такими двумя модификациями могут быть 2'-О-метил-модификация или 2'-фтор-модификация или другие.

В некоторых вариантах осуществления N_a или N_b содержат модификации чередующегося паттерна. В рамках настоящего изобретения, термин «чередующийся мотив» относится к мотиву, имеющему одну или более модификаций, где каждая модификация находится на чередующихся нуклеотидах одной цепи. Чередующийся нуклеотид может относиться к одному на каждый второй нуклеотид или по одному на каждые три нуклеотида или к аналогичной схеме. Например, если каждый из А, В и С представляет один тип модификации нуклеотида, то чередующийся мотив может быть «АВАВАВАВАВАВАВ...», «ААВВААВВААВВ...», «ААВААВААВААВ...», «АААВАААВАААВ...», «АААВВВВВВВВВ...» или «АВСАВСАВСАВС...» 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 паттерн, т. е. модификации в каждом другом нуклеотиде, может быть одинаковым, но каждый в 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 дцРНК-агент по настоящему изобретению содержит паттерн модификации для чередующегося мотива в смысловой цепи, который сдвинут относительно паттерна модификации чередующегося мотива в антисмысловой цепи. Сдвиг может быть таким, 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 дуплексе дцРНК, то чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «АВАВАВ» в ориентации от 5' к 3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВАВАВА» в ориентации от 5' к 3' цепи в дуплексной области. В качестве другого примера, чередующийся мотив в смысловой цепи может начинаться с «ААВВААВВ» в ориентации от 5' к 3' цепи, и чередующийся мотив в антисмысловой цепи может начинаться с «ВВААВВАА» в ориентации от 5' к 3' цепи в дуплексной области, таким образом, что существует полный или частичный сдвиг паттерном модификации между смысловой цепью и антисмысловой цепью.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент содержит паттерн чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в смысловой цепи, изначально имеющий сдвиг относительно паттерна чередующегося мотива 2'-О-метил-модификации и 2'-F-модификации в антисмысловой цепи, т.е. 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид в смысловой цепи спаривается с 2'-F-модифицированным

нуклеотидом в антисмысловой цепи и наоборот. Положение 1 смысловой цепи может начинаться с 2'-F-модификации, и положение 1 антисмысловой цепи может начинаться с 2'-О-метил-модификации.

Введение одного или более мотивов из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую цепь или антисмысловую цепь прерывает исходный паттерн модификации, находящийся в смысловой цепи или антисмысловой цепи. Это прерывание паттерна модификации смысловой или антисмысловой цепи путем введения одного или более мотивов из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов в смысловую или антисмысловую цепь может усиливать активность сайленсинга гена в отношении гена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления, когда мотив из трех идентичных модификаций трех последовательных нуклеотидов вводится в любую из цепей, то модификация нуклеотида, следующего за мотивом, представляет собой модификацию, отличную от модификации мотива. Например, участок последовательности, содержащий мотив, представляет собой «...N_aY₁Y₂N_b...», где «Y» представляет собой модификацию мотива из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах, и «N_a» и «N_b» представляют собой модификацию мотива нуклеотид, следующего за мотивом «Y₁Y₂Y₃», которая отличается от модификации Y, и где N_a и N_b могут быть одинаковыми или разными модификациями. Альтернативно, N_a или N_b могут присутствовать или отсутствовать, когда имеется крыльевая модификация.

иРНК по настоящему изобретению может дополнительно содержать, по меньшей мере, одну фосфоротиоатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь. Модификация фосфоротиоатной 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 паттерне в смысловой цепи или антисмысловой цепи; или смысловая цепь или антисмысловая цепь содержит обе модификации межнуклеотидной связи в чередующемся паттерне. Чередующийся паттерн 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 паттерна модификации межнуклеотидной связи в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления двухцепочечный РНК-агент содержит 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая цепь содержит две тиофосфатные межнуклеотидные связи на 5'-конце и две тиофосфатные межнуклеотидные связи на 3'-конце, а смысловая цепь содержит по меньшей мере две тиофосфатные межнуклеотидные связи либо на 5'-конце, либо на 3'-конце.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент содержит модификацию

фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи в выступающей области. Например, выступающая область может содержать два нуклеотида, имеющих фосфоротиоатную 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 выступающие нуклеотиды могут быть связаны посредством фосфоротиоатной или метилфосфонатной межнуклеотидной связи, и необязательно могут иметь место дополнительные фосфоротиоатные или метилфосфонатные межнуклеотидные связи, связывающие выступающий нуклеотид 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 выступающими нуклеотидами, и третий является спаренным нуклеотидом, следующим за выступающим нуклеотидом. Такие три концевых нуклеотида могут находиться на 3'-конце антисмысловой цепи, 3'-конце смысловой цепи, 5'-конце антисмысловой цепи или 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления 2-нуклеотидный выступ находится на 3'-конце антисмысловой цепи, и между тремя концевыми нуклеотидами имеются две фосфоротиоатные межнуклеотидные связи, где два из трех нуклеотидов являются выступающими нуклеотидами, и третий нуклеотид представляет собой спаренный нуклеотид, следующий за выступающим нуклеотидом. Необязательно, дцРНК-агент может дополнительно иметь 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 дцРНК-агент содержит несовпадение(я) с мишенью в пределах дуплекса или их комбинации. Несовпадение может находиться 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 некоторых вариантах осуществления, дцРНК-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 некоторых вариантах 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 еще одних вариантах осуществления нуклеотид на 3'-конце смысловой цепи представляет собой дезокситимидин (dT) или нуклеотид на 3'-конце антисмысловой цепи представляет собой дезокситимидин (dT). В одном варианте осуществления имеется короткая последовательность из дезокситиминовых нуклеотидов, например, два нуклеотида dT на 3'-конце смысловой или антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, последовательность смысловой цепи может быть представлена формулой (I):



где:

i и j 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

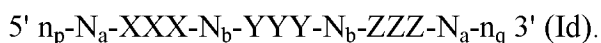
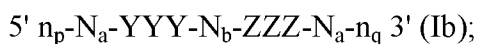
XXX, YYY и ZZZ, каждый независимо представляет собой один мотив из трех идентичных модификаций в трех последовательных нуклеотидах. Предпочтительно все YYY представляет собой 2'-F- модифицированные нуклеотиды.

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

В одном варианте осуществления мотив YYY находится в сайте расщепления смысловой цепи или рядом с ним. Например, когда РНКи-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 равен 1, или

оба i и j равны 1. Таким образом, смысловая цепь может быть представлена следующими формулами:



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. В одном варианте осуществления 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:



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 РНКи 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 некоторых вариантах осуществления N_a' или N_b' содержат модификации в чередующемся паттерне.

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. В одном варианте осуществления мотив $Y'Y'Y'$ находится в положениях 11, 12, 13.

В некоторых вариантах 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:

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

$5'-n_q'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p' 3'$ (IIc); или

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

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 (IId), 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 модифицированных нуклеотидов. Каждый N_a' независимо представляет собой олигонуклеотидную последовательность, содержащую 2-20, 2-15 или 2-10 модифицированных нуклеотидов. В одном варианте осуществления 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:

$5'-n_p'-N_a'-Y'Y'Y'-N_a'-n_q' 3'$ (Ia).

Когда антисмысловая цепь представлена формулой (IIa), 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, CRN, UNA, cEt, гликолевой нуклеиновой кислотой (GNA), гекситоловой нуклеиновой кислотой (HNA), CeNA, 2'-метоксиэтилом, 2'-О-метилом, 2'-О-аллилом, 2'-С-аллилом, 2'-гидроксилом или 2'-фтором. Например, каждый нуклеотид смысловой цепи и антисмысловой цепи независимо модифицирован 2'-О-метилом или 2'-фтором. В частности, каждый X , Y , Z , X' , Y' и Z' может представлять собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию.

В некоторых вариантах осуществления смысловая цепь дцРНК-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 некоторых вариантах 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 (IId) соответственно.

Соответственно, дцРНК-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:

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

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

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

нуклеотида;

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

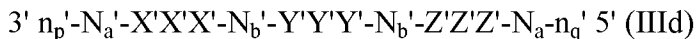
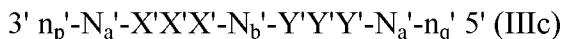
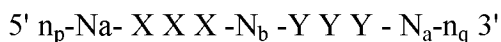
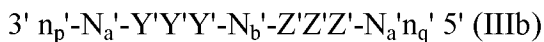
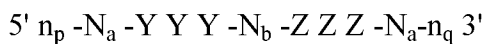
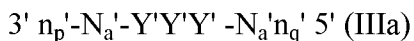
где:

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 нуклеотидах.

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:



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

Когда дцРНК-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 дцРНК-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 дцРНК-агент представлен формулой (IIIId), 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 паттерне.

Каждый из X, Y и Z в формулах (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId) может быть одинаковым или отличным друг от друга.

Когда дцРНК-агент представлен формулами (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) и (IIId), то, по меньшей мере, один из нуклеотидов Y может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Y'. Альтернативно, по меньшей мере, два нуклеотида Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'; или все три нуклеотида Y образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Y'.

Когда дцРНК-агент представлен формулой (IIIb) или (IIId), то, по меньшей мере, один из нуклеотидов Z может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов Z'. Альтернативно, по меньшей мере, два нуклеотида Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'; или все три нуклеотида Z образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами Z'.

Когда дцРНК-агент представлен формулой (IIIc) или (IIId), то, по меньшей мере, один из нуклеотидов X может образовывать пару оснований с одним из нуклеотидов X'. Альтернативно, по меньшей мере, два нуклеотида X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'; или все три нуклеотида X образуют пары оснований с соответствующими нуклеотидами X'.

В некоторых вариантах осуществления модификация нуклеотида Y отличается от модификации нуклеотида Y', модификация нуклеотида Z отличается от модификации нуклеотида Z' или модификация нуклеотида X отличается от модификации на нуклеотиде X'.

В некоторых вариантах осуществления, когда дцРНК-агент представлен формулой (IIId), то модификации N_a представляют собой 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию. В других вариантах осуществления, когда РНКи-агент представлен формулой (IIId), то модификации N_a представляют собой модификации 2'-О-метил-модификацию или 2'-фтор-модификацию, и n_p' > 0, и, по меньшей мере, один n_p' связан с соседним нуклеотидом через тиофосфатную связь. В еще одних вариантах осуществления, когда РНКи-агент представлен формулой (IIId), 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 одним или более производными GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер (описано ниже). В еще одних вариантах осуществления, когда РНКи-агент представлен формулой (IIId), 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 одним или более производными GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В некоторых вариантах осуществления, когда дцРНК-агент представлен формулой

(Ша), 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 одним или более производными GalNAc, присоединенными через двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

В некоторых вариантах осуществления дцРНК-агент представляет собой мультимер, содержащий, по меньшей мере, два дуплекса, 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 некоторых вариантах осуществления дцРНК-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 некоторых вариантах осуществления два дцРНК-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.

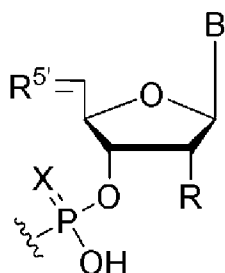
В некоторых вариантах осуществления РНКи-агент по изобретению может содержать небольшое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 10 или менее нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. Например, РНКи-агент может содержать 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. В конкретном варианте осуществления РНКи-агент по изобретению содержит 10 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи. В другом конкретном варианте осуществления РНКи-агент по изобретению содержит 6 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией, например, 4 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи.

В еще одних вариантах осуществления РНКи-агент по изобретению может содержать сверхнизкое количество нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию, например, 2 или меньше нуклеотидов, содержащих 2'-фтор-модификацию. Например, РНКи-агент может содержать 2, 1 из 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией. В конкретном варианте осуществления РНКи-агент может содержать 2 нуклеотида с 2'-фтор-модификацией, например, 0 нуклеотидов с 2'-фтор-модификацией в смысловой цепи и 2

нуклеотида с 2'-фтор-модификацией в антисмысловой цепи.

В различных публикациях описываются мультимерные иРНК, которые можно использовать в способах по изобретению. Такие публикации включают WO 2007/091269, патент США № 7858769, WO 2010/141511, WO 2007/117686, WO 2009/014887 и WO 2011/031520, полное содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы по настоящему изобретению включают модификацию РНКи-агента винилфосфонатом (VP), как здесь описано. В иллюстративных вариантах осуществления нуклеотид, модифицированный винилфосфонатом, по настоящему изобретению имеет следующую структуру:



где X представляет собой O или S;

R представляет собой атом водорода, гидроксиль, фтор или C₁₋₂₀ алкокси (например, метокси или н-гексадецилокси);

R^{5'} представляет собой =C(H)-P(O)(OH)₂, и двойная связь между углеродом C5' и R^{5'} имеет E или Z ориентацию (например, E ориентацию); и

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

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.

Модификации винилфосфатом также предусмотрены для композиций и способов по настоящему изобретению. Типичная структура винилфосфата включает предыдущую структуру, где R^{5'} представляет собой =C(H)-OP(O)(OH)₂, и двойная связь между углеродом C5' и R^{5'} имеет E или Z ориентацию (например, E ориентацию).

Как более подробно описано ниже, иРНК, которая содержит конъюгации одной или более углеводных групп с иРНК, может иметь улучшенные одно или более свойств иРНК. Во многих случаях углеводная группа будет присоединена к модифицированной субъединице иРНК. Например, сахар рибозу одной или более рибонуклеотидных субъединиц иРНК можно заместить другой группой, например, неуглеводным (предпочтительно циклическим) носителем, к которому присоединен 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» (TAP) 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, аминокгруппу или, как правило, обеспечивает связь, которая является подходящей для введения или связывания другой химической структуры, например, лиганда с компонентом кольца.

иРНК можно конъюгировать с лигандом посредством носителя, где носитель может представлять собой циклическую группу или ациклическую группу. В некоторых вариантах осуществления 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. В некоторых вариантах осуществления ациклическая группа может быть выбрана из остова серинола или остова диэтаноламина.

1. 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

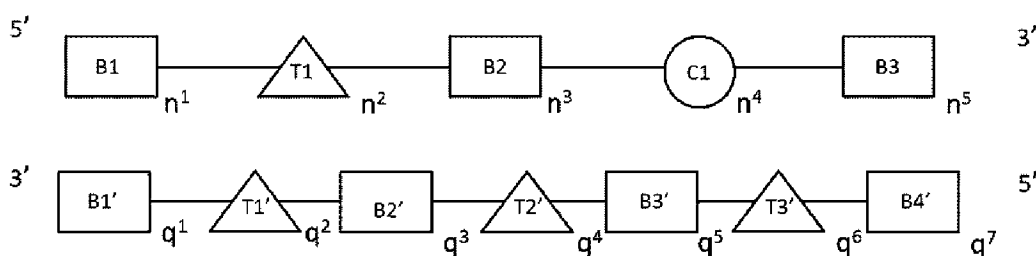
ингибировать сайленсинг нецелевого гена.

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'-дезоксификация или ациклический нуклеотид, например, разблокированные нуклеиновые кислоты (UNA) или гликолевая нуклеиновая кислота (GNA).

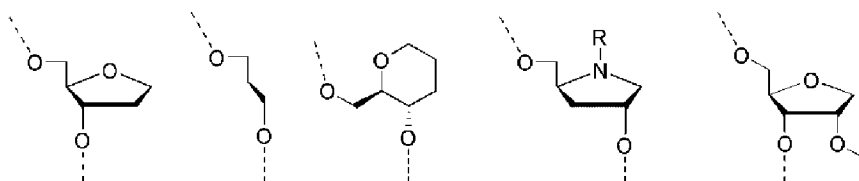
иРНК-агент содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, каждая из которых имеет от 14 до 40 нуклеотидов. иРНК-агент может быть представлен формулой (L):



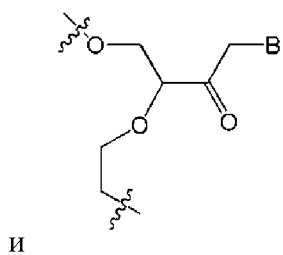
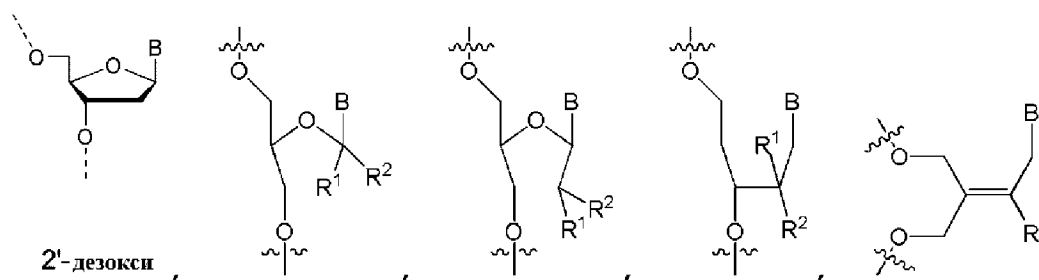
В формуле (L) каждый B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, выбранную из группы, состоящей из 2'-О-алкила,

2'-замещенного алкокси, 2'-замещенного алкила, 2'-галогена, ENA и BNA/LNA. В одном варианте осуществления каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-ОМе-модификации. В одном варианте осуществления каждый из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-ОМе-модификацию или 2'-F-модификацию. В одном варианте осуществления, по меньшей мере, один из B1, B2, B3, B1', B2', B3' и B4' содержит 2'-O-N-метилацетамидо-модификацию (2'-O-NMA).

C1 представляет собой термически дестабилизирующий нуклеотид, расположенный в месте, противоположном затравочной области антисмысловой цепи (т.е. в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой цепи). Например, C1 находится в положении смысловой цепи, который спаривается с нуклеотидом в положениях 2-8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой цепи. Нуклеотид C1 имеет термодестабилизирующую модификацию, которая может включать абазическую модификацию; несовпадение с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и модификацию сахара, такую как 2'-дезоксид-модификация или ациклический нуклеотид, например, разблокированные нуклеиновые кислоты (UNA) или глицериновая нуклеиновая кислота (GNA). В одном варианте осуществления C1 имеет термически дестабилизирующую модификацию, выбранную из группы, состоящей из: i) несовпадения с противоположным нуклеотидом в антисмысловой цепи; ii) абазической модификации, выбранной из группы, состоящей из:

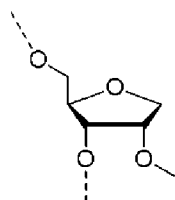


и iii) модификации сахара, выбранной из группы, состоящей из:



где В 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. В одном варианте осуществления термически дестабилизирующая модификация в C1 представляет собой несовпадение, выбранное из группы, состоящей из G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T и U:T; и, необязательно, по меньшей мере одно азотистое основание в паре несовпадения представляет собой 2'-дезокси-азотистое основание. В одном примере термически дестабилизирующая модификация в C1 представляет собой GNA или



T1, T1', T2' и T3' каждый независимо представляет собой нуклеотид, содержащий модификацию, обеспечивающую стерический объем нуклеотида, который меньше или равен стерическому объему 2'-ОМе-модификации. Стерический объем относится к сумме стерических эффектов модификации. Способы определения стерических эффектов модификации нуклеотида известны специалистам в данной области. Модификация может находиться в 2'-положении сахара рибозы нуклеотида или представлять собой модификацию нерибозного нуклеотида, ациклического нуклеотида или остова нуклеотида, который аналогичен или эквивалентен 2'-положению сахара рибозы, и обеспечивает нуклеотиду стерический объем, который меньше или равен стерическому объему 2'-ОМе-модификации. Например, каждый из T1, T1', T2' и T3' независимо выбран из ДНК, РНК, LNA, 2'-F и 2'-F-5'-метила. В одном варианте осуществления T1 представляет собой ДНК. В одном варианте осуществления T1' представляет собой ДНК, РНК или LNA. В одном варианте осуществления T2' представляет собой ДНК или РНК. В одном варианте осуществления T3' представляет собой ДНК или РНК.

n^1 , n^3 и q^1 независимо имеют 4 до 15 нуклеотидов в длину.

n^5 , q^3 и q^7 независимо имеют 1-6 нуклеотидов в длину.

n^4 , q^2 и q^6 независимо имеют 1-3 нуклеотида(ов) в длину; альтернативно, n^4 равен 0.

q^5 независимо имеет 0-10 нуклеотидов в длину.

n^2 и q^4 независимо имеют 0-3 нуклеотида в длину.

Альтернативно, n^4 имеет 0-3 нуклеотида в длину.

В одном варианте осуществления n^4 может быть равен 0. В одном примере n^4 равен 0, и q^2 и q^6 равны 1. В еще одном примере n^4 равен 0, и q^2 и q^6 равны 1, с двумя модификациями фосфоротиоатной межнауклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнауклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнауклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления p^4 , q^2 и q^6 каждый равен 1.

В одном варианте осуществления p^2 , p^4 , q^2 , q^4 и q^6 каждый равен 1.

В одном варианте осуществления C1 находится в положении 14-17 от 5'-конца смысловой цепи, когда длина смысловой цепи составляет 19-22 нуклеотида, и p^4 равен 1. В одном варианте осуществления C1 находится в положении 15 от 5'-конца смысловой цепи.

В одном варианте осуществления T3' начинается в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равен 1.

В одном варианте осуществления T1' начинается в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равен 1.

В иллюстративном варианте осуществления T3' начинается от положения 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и T1' начинается от положения 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' начинается от положения 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равен 1, и T1' начинается от положения 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равен 1.

В одном варианте осуществления T1' и T3' разделены 11 нуклеотидами в длину (т.е. не считая нуклеотидов T1' и T3').

В одном варианте осуществления T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T1' находится в положении 14 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^2 равен 1, и модификация в положении 2' или положениях в нерибозной, ациклической или основной цепи, которые обеспечивают меньший стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза.

В одном варианте осуществления T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T3' находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равен 1, и модификация в положении 2' или положениях в нерибозной, ациклической или основной цепи, которые обеспечивают меньший или равный стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза.

В одном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи. В одном примере T1 находится в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь имеет 19-22 нуклеотида в длину, и p^2 равен 1. В иллюстративном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь имеет 19-22 нуклеотида в длину, и p^2 равен 1,

В одном варианте осуществления T2' начинается в положении 6 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере T2' находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равен 1.

В иллюстративном варианте осуществления T1 находится в сайте расщепления смысловой цепи, например, в положении 11 от 5'-конца смысловой цепи, когда смысловая цепь имеет 19-22 нуклеотида в длину, и p^2 равен 1; T1' находится в положении 14 от 5'-

конца антисмысловой цепи, и q^2 равен 1, и модификация $T1'$ находится в 2'-положении сахара рибозы или в положениях нерибозной, ациклической или основной цепи, которая обеспечивает меньший стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза; $T2'$ находится в положениях 6-10 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равен 1; и $T3'$ находится в положении 2 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^6 равен 1, и модификация $T3'$ находится в 2'-положении или в положениях нерибозной, ациклической или основной цепи, которые обеспечивают меньший или равный стерический объем, чем 2'-ОМе рибоза.

В одном варианте осуществления $T2'$ начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере $T2'$ начинается в положении 8 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равен 2.

В одном варианте осуществления $T2'$ начинается в положении 9 от 5'-конца антисмысловой цепи. В одном примере $T2'$ находится в положении 9 от 5'-конца антисмысловой цепи, и q^4 равен 1.

В одном варианте осуществления $B1'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, $T1'$ представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, $B2'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, $T2'$ представляет собой 2'-F, q^4 равен 1, $B3'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 6, $T3'$ представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, $B4'$ представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления n^4 равен 0, $B3$ представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, $B1'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, $T1'$ представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, $B2'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, $T2'$ представляет собой 2'-F, q^4 равен 1, $B3'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 6, $T3'$ представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, $B4'$ представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления, $B1$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, $T1$ представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, $B2$ представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, $B3$ представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, $B1'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, $T1'$ представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, $B2'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, $T2'$ представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, $B3'$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, $T3'$ представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, $B4'$ представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1.

В одном варианте осуществления, $B1$ представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен

8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 6, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 7, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 6, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 7, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 6, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равен 7, n⁴ равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равен 1, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-

F, q^5 равен 6, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 5, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; необязательно, по меньшей мере, с 2 дополнительными ТТ на 3'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 5, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 1, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; необязательно, по меньшей мере, с 2 дополнительными ТТ на 3'-конце антисмысловой цепи; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца).

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1

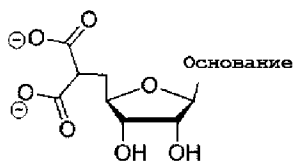
равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

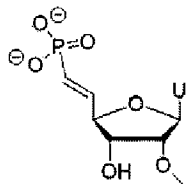
В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи).

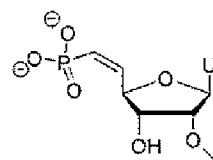
РНКи-агент может содержать фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой или антисмысловой цепи. 5'-концевая фосфорсодержащая группа может представлять собой 5'-концевой фосфат (5'-P), 5'-концевой фосфоротиоат (5'-PS), 5'-концевой фосфородитиоат (5'-PS₂), 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-концевой метилфосфонат (MePhos) или 5'-дезоксипентозин-5'-C-малонил



Когда 5'-концевая фосфорсодержащая группа представляет собой 5'-концевой винилфосфонат (5'-VP), 5'-VP может быть 5'-E-VP изомером (т. е. транс-винилфосфат,



, 5'-Z-VP изомером (т.е. цис-винилфосфат,



)или их

смесями.

В одном варианте осуществления РНК-агент содержит фосфорсодержащую группу на 5'-конце смысловой цепи. В одном варианте осуществления РНК-агент содержит фосфорсодержащую группу на 5'-конце антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-P. В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-P в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-PS. В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-PS в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-VP. В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-VP в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-E-VP в антисмысловой цепи. В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-Z-VP в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-PS₂. В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-PS₂ в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-PS₂. В одном варианте осуществления РНК-агент содержит 5'-дезоксигуанозил-5'-C-малонил в антисмысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равен 7, n⁴ равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ представляет собой 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ равен 1. РНК-агент также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равен 7, n⁴ равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,

F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-дезоксид-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F,

q^3 равен 4, $T2'$ представляет собой $2'-F$, q^4 равен 2, $B3'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^5 равен 5, $T3'$ представляет собой $2'-F$, q^6 равен 1, $B4'$ представляет собой $2'-OMe$, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит $5'-PS$.

В одном варианте осуществления, $B1$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, n^1 равен 8, $T1$ представляет собой $2'-F$, n^2 равен 3, $B2$ представляет собой $2'-OMe$, n^3 равен 7, n^4 равен 0, $B3$ представляет собой $2'-OMe$, n^5 равен 3, $B1'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^1 равен 9, $T1'$ представляет собой $2'-F$, q^2 равен 1, $B2'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^3 равен 4, $T2'$ представляет собой $2'-F$, q^4 равен 2, $B3'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^5 равен 5, $T3'$ представляет собой $2'-F$, q^6 равен 1, $B4'$ представляет собой $2'-OMe$, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит $5'-VP$. $5'-VP$ может представлять собой $5'-E-VP$, $5'-Z-VP$ или их комбинацию.

В одном варианте осуществления, $B1$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, n^1 равен 8, $T1$ представляет собой $2'-F$, n^2 равен 3, $B2$ представляет собой $2'-OMe$, n^3 равен 7, n^4 равен 0, $B3$ представляет собой $2'-OMe$, n^5 равен 3, $B1'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^1 равен 9, $T1'$ представляет собой $2'-F$, q^2 равен 1, $B2'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^3 равен 4, $T2'$ представляет собой $2'-F$, q^4 равен 2, $B3'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^5 равен 5, $T3'$ представляет собой $2'-F$, q^6 равен 1, $B4'$ представляет собой $2'-OMe$, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит $5'-PS_2$.

В одном варианте осуществления, $B1$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, n^1 равен 8, $T1$ представляет собой $2'-F$, n^2 равен 3, $B2$ представляет собой $2'-OMe$, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, $B3$ представляет собой $2'-OMe$, n^5 равен 3, $B1'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^1 равен 9, $T1'$ представляет собой $2'-F$, q^2 равен 1, $B2'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^3 равен 4, $T2'$ представляет собой $2'-F$, q^4 равен 2, $B3'$ представляет собой $2'-OMe$ или $2'-F$, q^5 равен 5, $T3'$ представляет собой $2'-F$, q^6 равен 1, $B4'$ представляет собой $2'-OMe$, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в

положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-дезоксипентозу-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 представляет собой 1. РНК-агент также содержит 5'-дезоксипентозу-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5

смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи цепь (где нумерация начинается от 5'-конца). РНК-агент также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи цепь (где нумерация начинается от 5'-конца). РНК-агент также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца). РНК-агент также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца). РНК-агент также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен

0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца). РНК-агент также содержит 5'-дезоксис-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP, или их комбинацию.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен

0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-дезоксипентозу-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца муравья представляет собой смысловую цепь). РНК-агент также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-

агент также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца муравья представляет собой смысловую цепь). РНК-агент также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 представляет собой 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-Р.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 представляет собой 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 представляет собой 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP, или их комбинацию.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1. РНК-агент также содержит 5'-дезоксигуанозил-5'-C-малонил.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-P.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где

нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-PS.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-VP. 5'-VP может представлять собой 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (считая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца). РНК-агент также содержит 5'-PS₂.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен

8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд.

В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями тиофосфатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-дезоксид-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксид-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация

начинается от 5'-конца). РНКи-агент также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи цепь (где нумерация начинается от 5'-конца). РНКи-агент также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 представляет собой 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи цепь (где нумерация начинается от 5'-конца). РНКи-агент также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи цепь (где нумерация

начинается от 5'-конца). РНКи-агент также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равен 7, n⁴ равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равен 4, q⁴ равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равен 1, В4' представляет собой 2'-ОМе, и q⁷ равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца) и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатных межнуклеотидных связей в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца). РНКи-агент также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равен 7, n⁴ равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНКи-агент также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n¹ равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n² равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМе, n³ равен 7, n⁴ равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМе, n⁵ равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q¹ равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q² равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q³ равен 4, Т2' представляет собой 2'-F, q⁴ равен 2, В3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q⁵ равен 5, Т3' представляет собой 2'-F, q⁶ равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q⁷ равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя

модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (считая от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (считая от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 представляет собой 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, T2' представляет собой 2'-F, q^4 равен 2, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 5, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5

смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18- 23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксигуанозин-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМe, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМe, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-Р и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-Р находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, n^1 или 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМe, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМe, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-PS и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, В1 представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, n^1 равен 8, Т1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, В2 представляет собой 2'-ОМe, n^3 равен 7, n^4 равен 0, В3 представляет собой 2'-ОМe, n^5 равен 3, В1' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^1 равен 9, Т1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, В2' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 равен 0, В3' представляет собой 2'-ОМe или 2'-F, q^5 равен 7, Т3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, В4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где

нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-VP (например, 5'-E-VP, 5'-Z-VP или их комбинацию) и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-VP находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 представляет собой 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, и q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-PS₂ и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-PS₂ находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В одном варианте осуществления, B1 представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, n^1 равен 8, T1 представляет собой 2'-F, n^2 равен 3, B2 представляет собой 2'-ОМе, n^3 равен 7, n^4 равен 0, B3 представляет собой 2'-ОМе, n^5 равен 3, B1' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^1 равен 9, T1' представляет собой 2'-F, q^2 равен 1, B2' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^3 равен 4, q^4 представляет собой 0, B3' представляет собой 2'-ОМе или 2'-F, q^5 равен 7, T3' представляет собой 2'-F, q^6 равен 1, B4' представляет собой 2'-F, and q^7 равен 1; с двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1-5 смысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца смысловой цепи), и модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 1 и 2 и двумя модификациями фосфоротиоатной межнуклеотидной связи в положениях 18-23 антисмысловой цепи (где нумерация начинается от 5'-конца антисмысловой цепи). РНК-агент также содержит 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил и нацеливающий лиганд. В одном варианте осуществления 5'-дезоксидезокси-5'-С-малонил находится на 5'-конце антисмысловой цепи, и нацеливающий лиганд находится на 3'-конце смысловой цепи.

В конкретном варианте осуществления РНК-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный

линкер; и

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 17, 19 и 21 и 2'-Оме-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14 до 16, 18 и 20 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 23 нуклеотида;

(ii) 2'-Оме-модификации в положениях 1, 3, 5, 9, 11-13, 15, 17, 19, 21 и 23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6-8, 10, 14, 16, 18, 20 и 22 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 21 и 22, и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где дцРНК-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В другом конкретном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11, 13, 15, 17, 19 и 21 и 2'-Оме-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18 и 20 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 23 нуклеотидов;

(ii) 2'-Оме-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНКи-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8, 10 и 12-21, 2'-F-модификации в положениях 7 и 9 и дезоксинуклеотид (например, dT) в положении 11 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 23 нуклеотидов;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4-6, 8, 10, 12, 14, 16 и 18 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, нуклеотидными положениями 21 и 22 и нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНК-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления РНК-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8, 10, 12, 14 и 16-21 и 2'-F-модификации в положениях 7, 9, 11, 13 и 15; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 23 нуклеотидов;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 и 21-23 и 2'-F-модификации в положениях 2-4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными

положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНКи-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-9 и 12-21 и 2'-F-модификации в положениях 10 и 11; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 23 нуклеотидов;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9, 11-13, 15, 17, 19 и 21-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18 и 20 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНКи-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-F-модификации в положениях 1, 3, 5, 7, 9-11 и 13 и 2'-ОМе-модификации в положениях 2, 4, 6, 8, 12 и 14-21; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 23 нуклеотидов;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3, 5-7, 9, 11-13, 15, 17-19 и 21-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 4, 8, 10, 14, 16 и 20 (где нумерация начинается от 5'-конца); а также

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНКи-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17 и 19-21 и 2'-F-модификации в положениях 3, 5, 7, 9-11, 13, 16 и 18; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 25 нуклеотидов;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 4, 6, 7, 9, 11-13, 15, 17 и 19-23, 2'-F-модификации в положениях 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16 и 18, и дезоксинуклеотиды (например, dT) в положениях 24 и 25 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНКи-агенты имеют выступ из четырех нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный

линкер;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8 и 12-21 и 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 23 нуклеотидов;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 8, 10-13, 15 и 17-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 9, 14 и 16 (где нумерация начинается от 5' конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНКи-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит:

a) смысловую цепь, имеющую:

(i) длиной 21 нуклеотид;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-6, 8 и 12-21 и 2'-F-модификации в положениях 7 и 9-11; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длиной 23 нуклеотидов;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-23 и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (где нумерация начинается от 5' конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 21 и 22 и между нуклеотидными положениями 22 и 23 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНКи-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В еще одном конкретном варианте осуществления РНКи-агент по настоящему изобретению содержит:

а) смысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 19 нуклеотидов;

(ii) лиганд ASGPR, присоединенный к 3'-концу, где указанный лиганд ASGPR содержит три производных GalNAc, присоединенных через трехвалентный разветвленный линкер;

(iii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1-4, 6 и 10-19 и 2'-F-модификации в положениях 5 и 7-9; и

(iv) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, и между нуклеотидными положениями 2 и 3 (где нумерация начинается от 5'-конца); и

(b) антисмысловую цепь, имеющую:

(i) длину из 21 нуклеотида;

(ii) 2'-ОМе-модификации в положениях 1, 3-5, 7, 10-13, 15 и 17-21 и 2'-F-модификации в положениях 2, 6, 8, 9, 14 и 16 (где нумерация начинается от 5' конца); и

(iii) фосфоротиоатные межнуклеотидные связи между нуклеотидными положениями 1 и 2, между нуклеотидными положениями 2 и 3, между нуклеотидными положениями 19 и 20 и между нуклеотидными положениями 20 и 21 (где нумерация начинается от 5'-конца);

где РНК-агенты имеют выступ из двух нуклеотидов на 3'-конце антисмысловой цепи и тупой конец на 5'-конце антисмысловой цепи.

В некоторых вариантах осуществления иРНК для применения в способах по изобретению представляет собой агент, выбранный из агентов, приведенных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20. Данные агенты могут дополнительно содержать лиганд.

III. иРНК, конъюгированные с лигандами

Еще одна 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). В других вариантах осуществления лиганд представляет собой 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 et al., 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 пальмита (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229-237) или группу окстадециламина или группу гексиламинокарбонилноксистерина (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 молекулами, в которых такой лиганд отсутствует. В некоторых вариантах осуществления 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-гликолид), 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: полиэтиленмин, полилизин (PLL), спермин, спермидин, полиамин, полиаминовый псевдопептид, полиаминовый пептидомиметик, дендримерный полиамин, аргинин, амидин, протамин, катионный липид, катионный порфирина, четвертичную соль полиамина или альфа-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, amino-, меркапто-, ПЭГ (например, ПЭГ-40K), MPEG, [MPEG]2, полиамино-, алкил, замещенный алкил, радиоактивно меченые маркеры, ферменты, гаптены (например, биотин), средства, облегчающие транспорт/всасывание (например, аспирин, витамин E, 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, гликопротеины, или пептиды, например, молекулы, обладающие специфичной аффинностью по отношению к колиганду, или антитела, например, антитело, которое связывается с конкретным типом клеток, таким как клетка печени. Лиганды также могут включать гормоны и рецепторы гормонов. Лиганды также могут включать непептидные молекулы, 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-κB.

Лигандом может быть соединение, например, лекарственное средство, которое может увеличивать захват иРНК-агента клеткой, 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 осуществления лиганд, присоединенный к иРНК, которая здесь описана, функционирует в качестве фармакокинетического модулятора (ФК-модулятора). РК-модуляторы включают липофильные вещества, желчные кислоты, стероиды, аналоги фосфолипидов, пептиды, белок-связывающие агенты, ПЭГ, витамины и т.д. Примеры ФК-модуляторов включают, без ограничения, холестерин, жирные кислоты, холевую кислоту, литохоловую кислоту, диалкилглицериды, диацилглицерид, фосфолипиды, сфинголипиды, напроксен, ибупрофен, витамин E, 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

являются пригодными 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 ФК-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 связанную 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 иРНК и несущих молекулу лиганда связанных в специфичную последовательность нуклеозидов по 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 последовательность-специфических связанных 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 или конъюгат представляет собой липид или молекулу на основе липида. Такой липид или молекула на основе липида может связываться с сывороточным белком, таким как сывороточный альбумин человека (HAS).

Лиганд, связывающий с HSA, обеспечивает возможность распределения конъюгата в ткани-мишени, например, непочечной ткани-мишени 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 непространственный или аспирин. Липид или лиганд на основе липида могут (а) повысить устойчивость конъюгата к разложению, (б) 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 липида можно использовать для того, чтобы модулировать, например, контролировать (например, ингибировать) связывание конъюгата с тканью-мишенью. Например, липид или лиганд на основе липидов, который связывается 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 на основе липидов связывается с HSA. В одном варианте осуществления лиганд может связываться с 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 на основе липида связывается с HSA слабо или совсем не связывается, так что распределение конъюгата в почки усиливается. Другие остатки, которые нацеливают в почечные клетки, также можно использовать вместо или дополнительно к лиганду на основе липида.

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 еще одном 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 antennopodia. 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 альфа-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: 15). Аналог RFGF (например, аминокислотная последовательность AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 16)), содержащий гидрофобную MTS, также может быть нацеливающей группой. 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: 17)) и белка *Drosophila antennapedia* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 18)) 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» (OBOC) (Lam et al., Nature, 354: 82-84, 1991). Обычно пептид или пептидомиметик, связанный с дцРНК-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 интегрина. Предпочтительные конъюгаты такого лиганда нацелены на PECAM-1 или VEGF.

«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 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 более 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 более 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 некоторых вариантах осуществления 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, через линкер, описанный здесь.

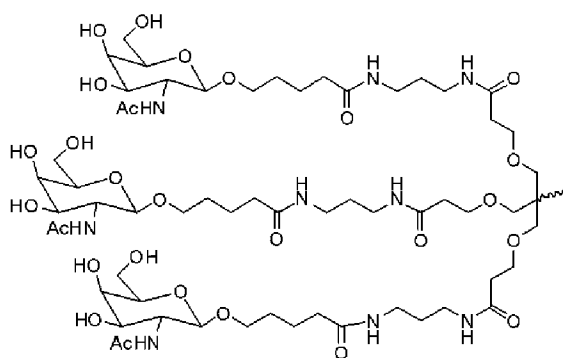
В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК-агенту по изобретению через моновалентный линкер. В некоторых вариантах осуществления GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК-агенту по изобретению через двухвалентный линкер. В других вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК-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 двухцепочечные РНКи-агенты по изобретению содержат один GalNAc или производное GalNAc, присоединенное к иРНК-агенту. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечные РНКи-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 РНКи-агента через множество моновалентных линкеров.

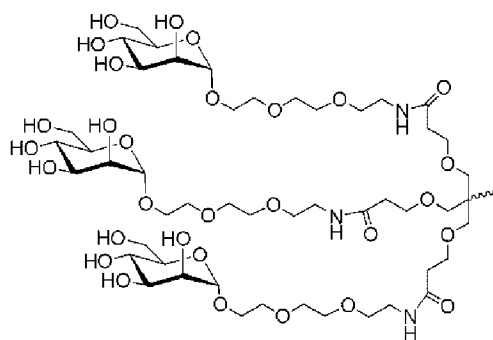
В некоторых вариантах осуществления, например, когда две цепи иРНК-агента по изобретению являются частью одной более крупной молекулы, соединенной непрерывной цепью нуклеотидов между 3'-концом одной цепи и 5'-концом соответствующей другой цепи, образующих петлю-шпильку, содержащую множество неспаренных 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 удлиненным выступом в одной цепи дуплекса.

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 удлиненным выступом в одной цепи дуплекса.

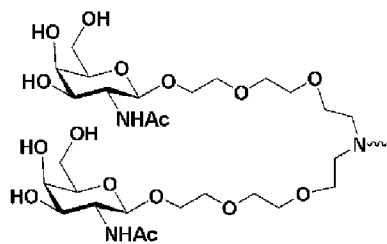
В некоторых вариантах осуществления конъюгат с углеводом для применения в композициях и способах по изобретению выбран из группы, состоящей из:



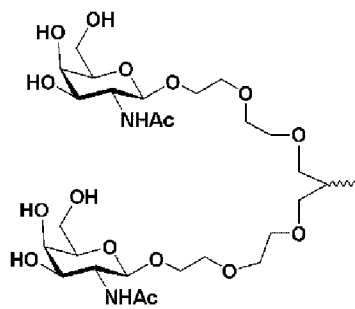
Формула II,



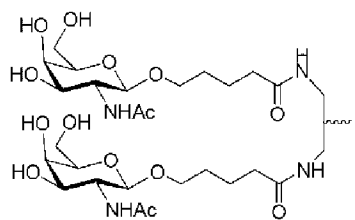
Формула III,



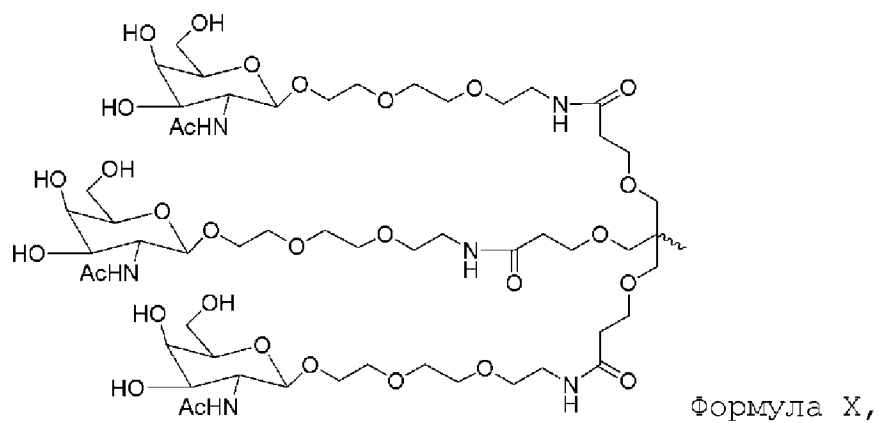
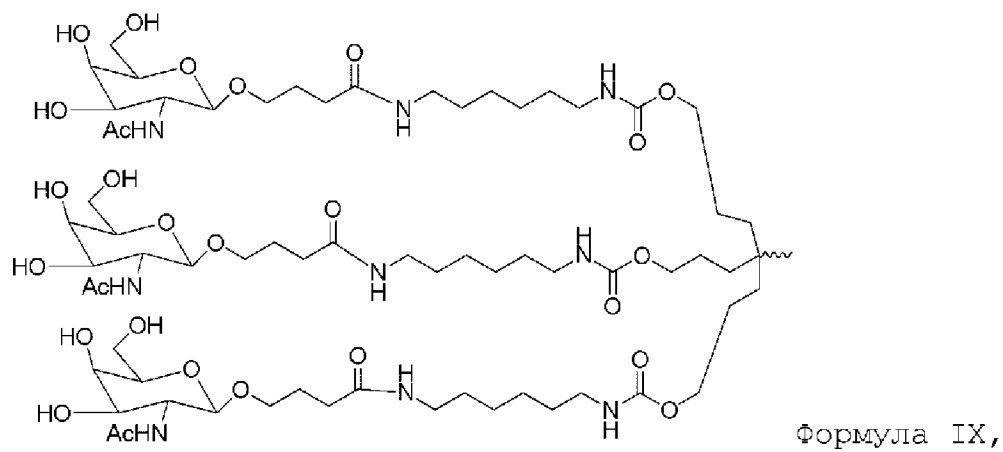
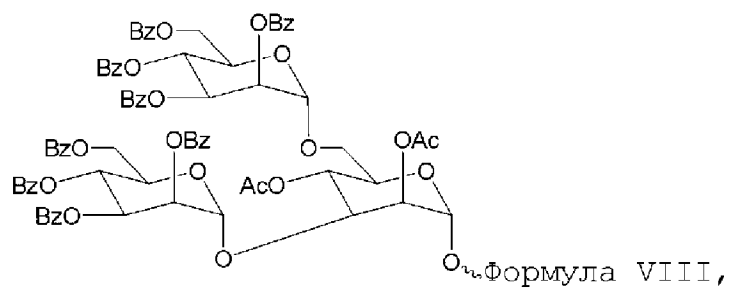
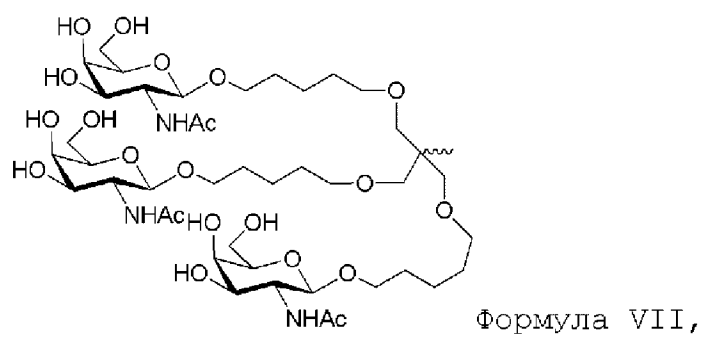
Формула IV,

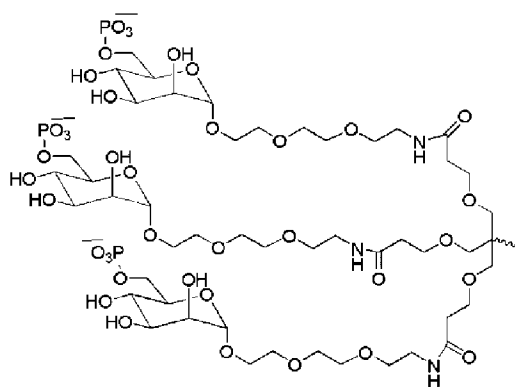


Формула V,

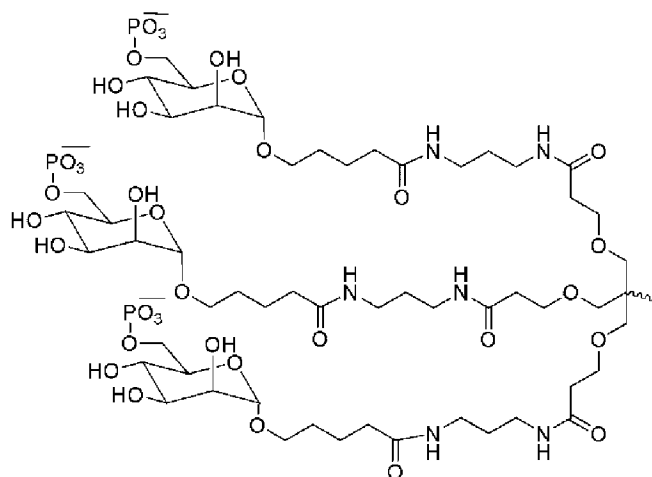


Формула VI,

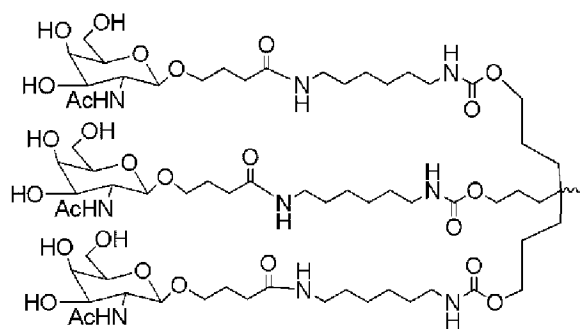




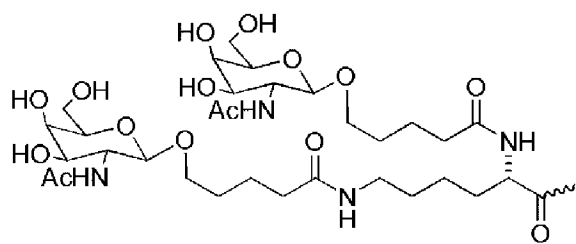
Формула XI,



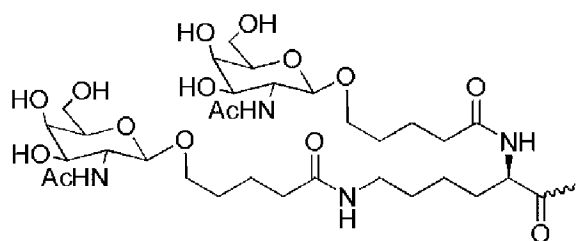
Формула XII,



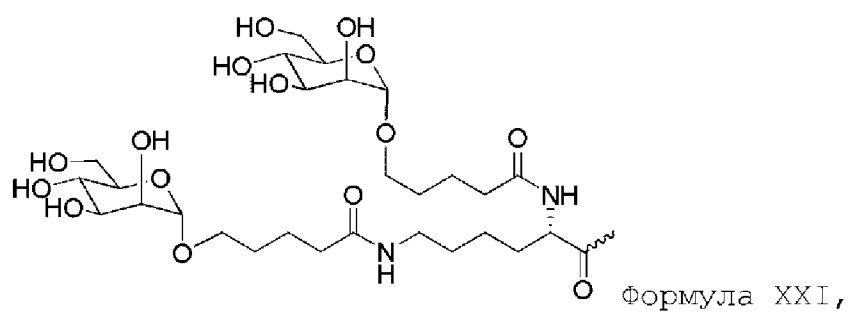
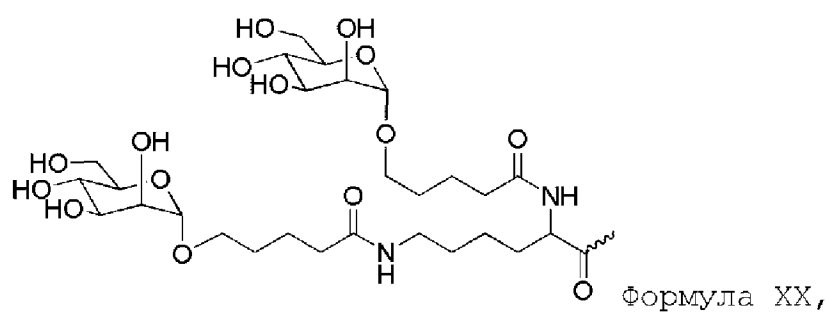
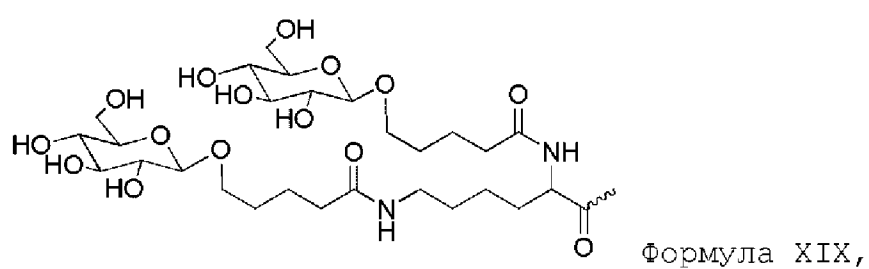
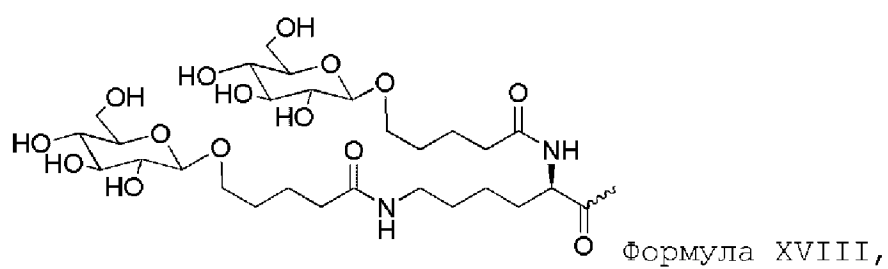
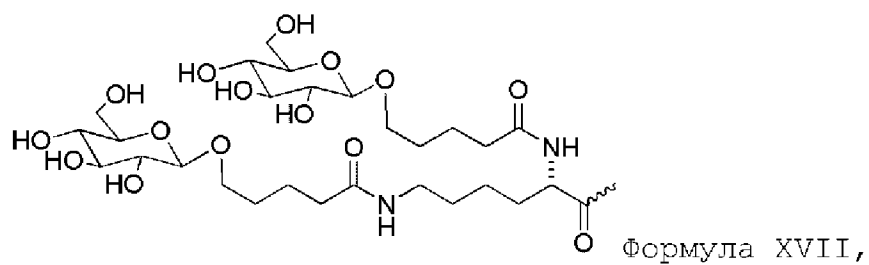
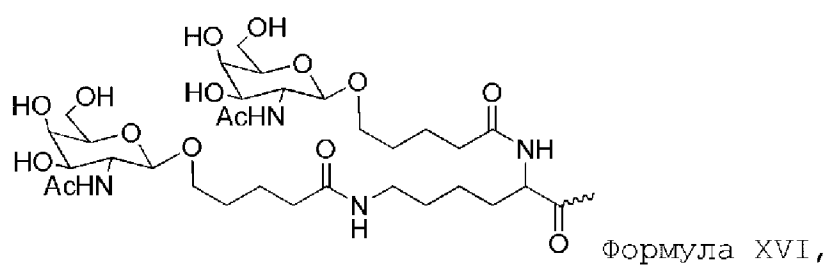
Формула XIII,

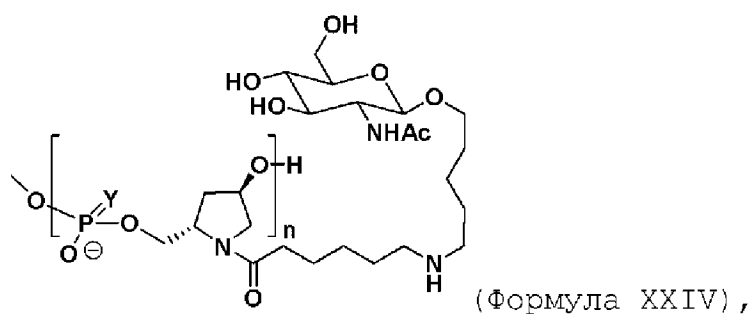
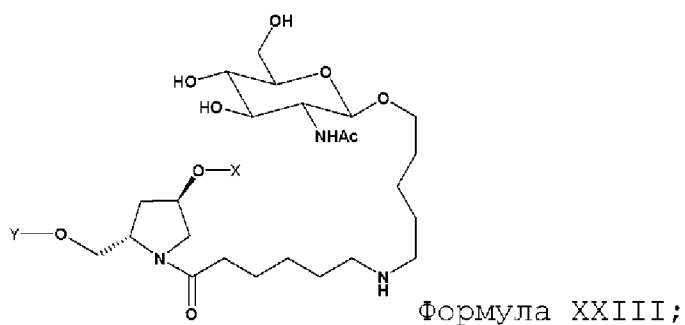
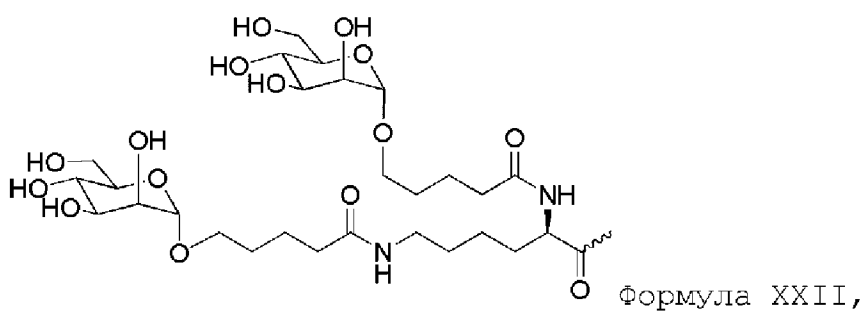


Формула XIV,

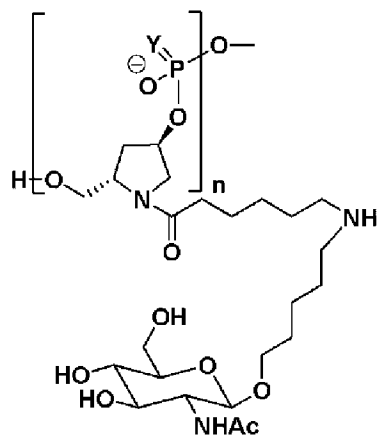


Формула XV,

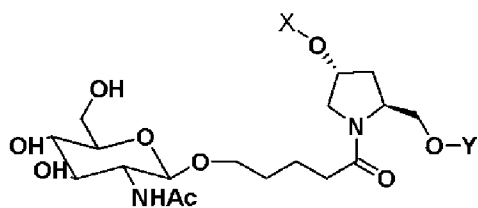




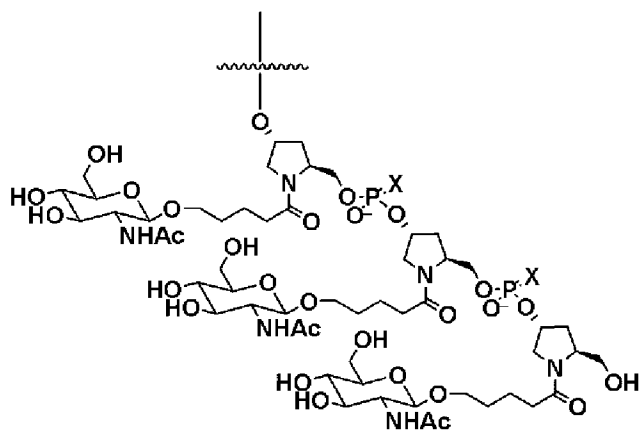
где Y представляет собой O или S, и n равен 3-6;



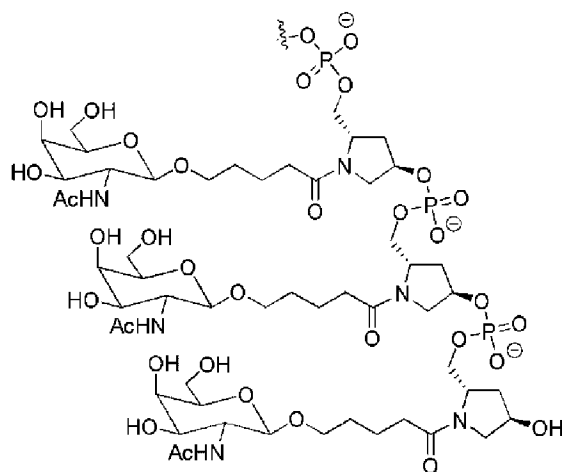
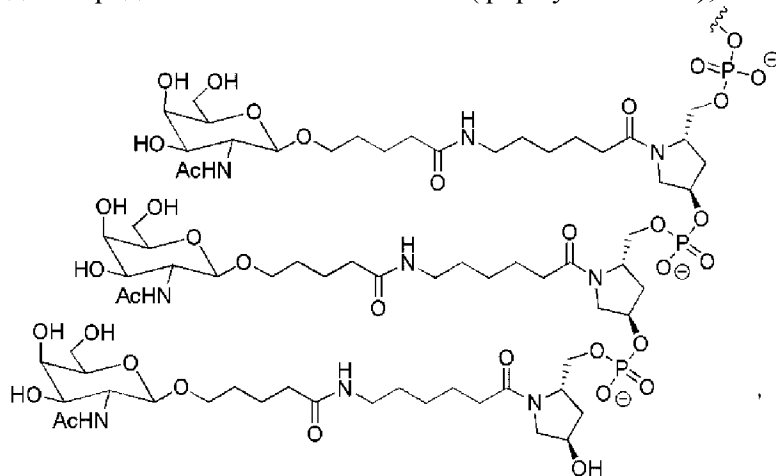
где Y представляет собой O или S, и n равен 3-6 (формула XXV);



формула XXVI;

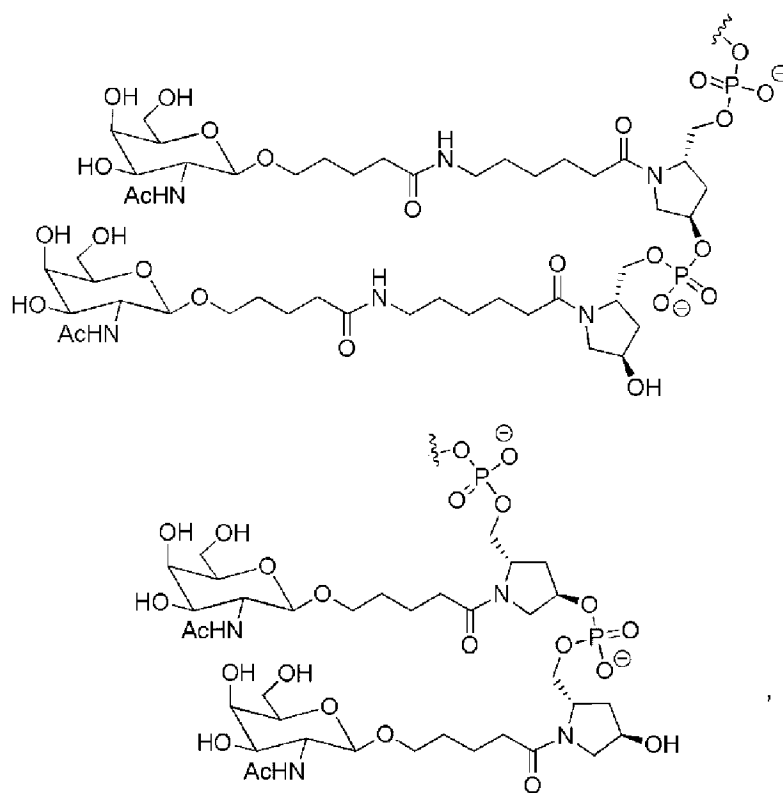


где X представляет собой O или S (формула XXVII);



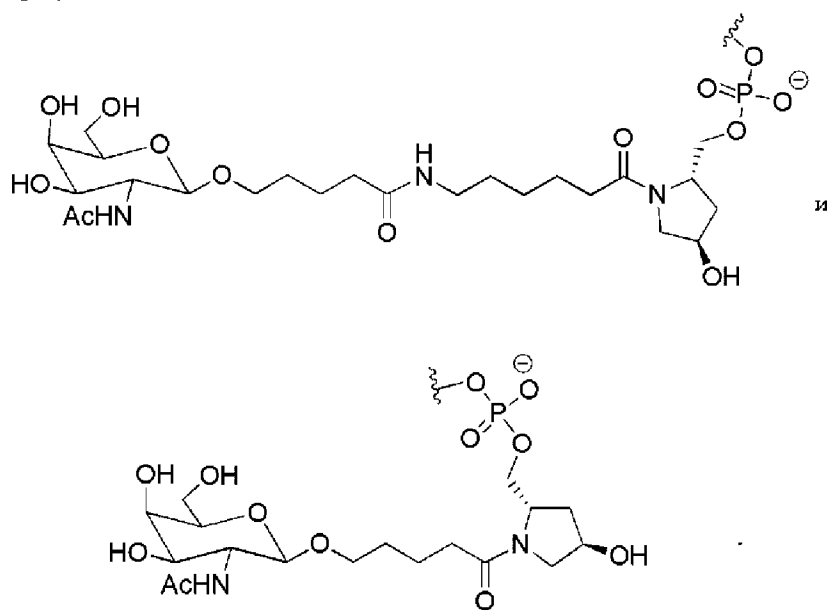
Формула XXIX;

Формула XXVII;



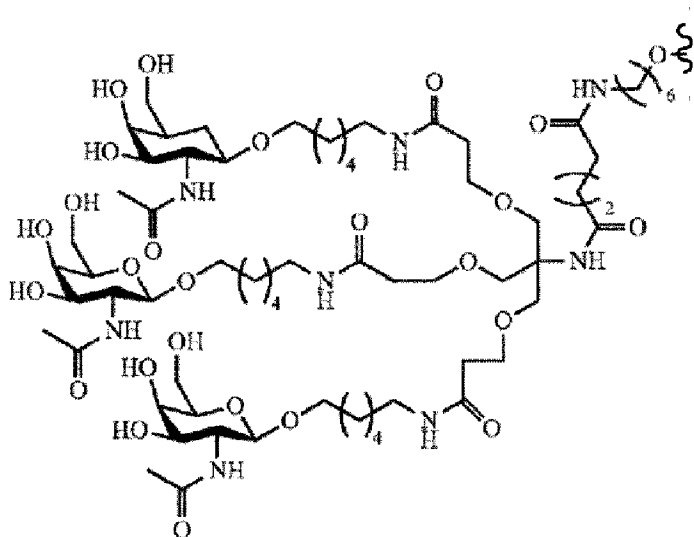
Формула XXX;

Формула XXXI;



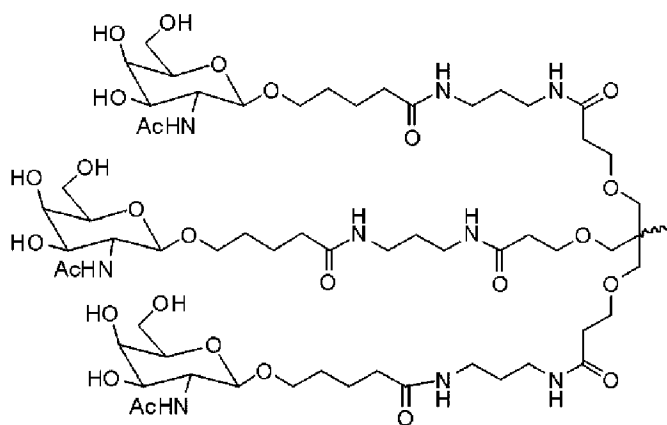
Формула XXXII;

Формула XXXIII.



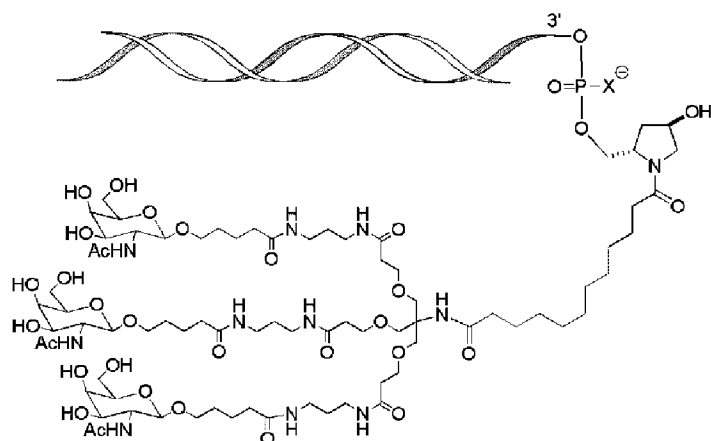
Формула XXXIV.

В еще одних 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:

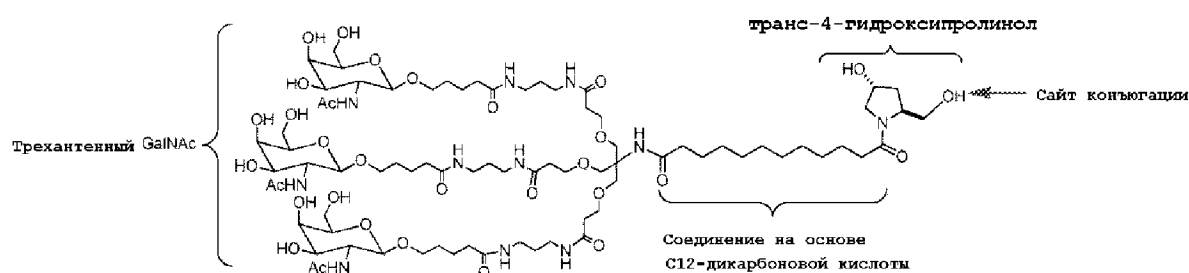


Формула II.

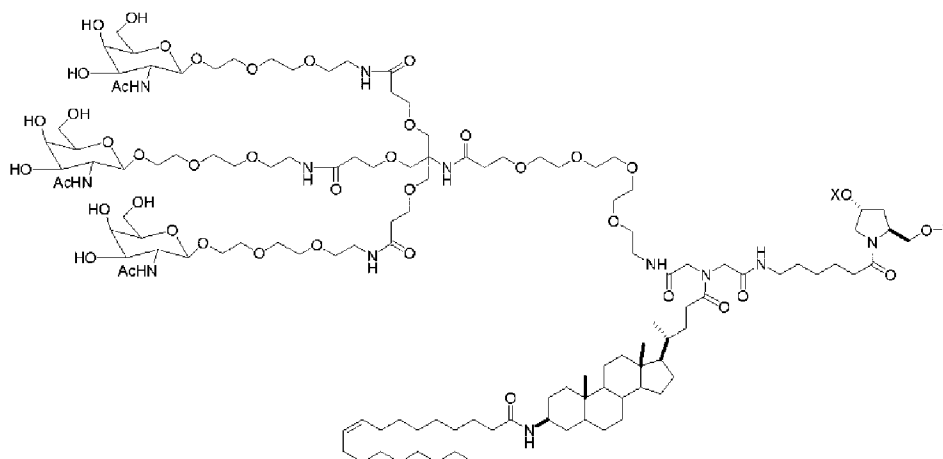
В некоторых вариантах осуществления иРНК-агент присоединен к углеводному конъюгату через линкер, как показано на следующей схеме, где X представляет собой O или S.



В некоторых вариантах осуществления РНК-агент конъюгирован с L96, как определено в таблице 1 и показано ниже:

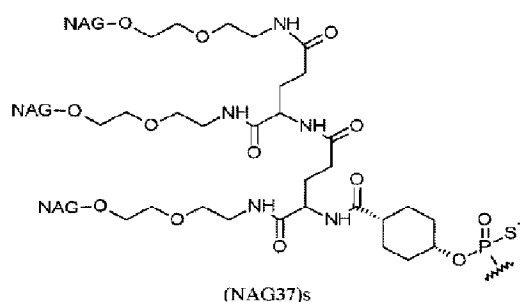


Еще один репрезентативный углеводный конъюгат для применения в вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, включает, не ограничиваясь этим,



(Формула XXXVI), когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, другой представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления подходящий лиганд представляет собой лиганд, раскрытый в WO 2019/055633, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления лиганд содержит следующую структуру, представленную ниже:



В некоторых вариантах осуществления изобретения GalNAc или производное GalNAc присоединены к иРНК-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 иРНК-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 иРНК-агенту. GalNAc может быть присоединен к любому нуклеотиду через линкер в 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 двухцепочечный РНК-агент по изобретению содержит множество (например, 2, 3, 4, 5 или 6) GalNAc или производных GalNAc, каждое из которых независимо присоединено к множеству нуклеотидов агента двухцепочечной РНК через множество линкеров, например моновалентные линкеры.

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, образуя 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 ФК или проникающий в клетку пептид.

Дополнительные углеводные конъюгаты и линкеры, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают те, что описаны в РСТ публикациях WO 2014/179620 и WO 2014/179627, полное содержание каждой 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 посредством 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, алкинилгетероциклилалкил, алкинилгетероциклилалкенил, алкинилгетероциклилалкинил, алкиларил, алкениларил, алкиниларил, алкилгетероарил, алкенилгетероарил, алкинилгетероарил, где один или более 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 представляют 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 одном 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, pH, 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 агенты, которые могут создавать кислую среду, например, агенты, которые приводят к значению pH 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 pH. Значение pH сыворотки человека равно 7,4, тогда как среднее значение внутриклеточного pH 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 линкерную группу-кандидат. Также может быть желательным тестирование линкерной группы-кандидата на способность быть резистентной к расщеплению в крови или в случае контактирования 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 культуральных условиях и для подтверждения дальнейшей оценки в целом на уровне организма животного. В некоторых вариантах осуществления пригодные соединения-кандидаты 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).

1. 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 дитиотрептолом (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 осуществления соединения-кандидаты расщепляются не более 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 таким образом, чтобы они имитировали внутриклеточные условия) по сравнению с кровью (или в условиях *in vitro*, выбранных таким образом, чтобы они имитировали внеклеточные 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 таким образом, чтобы они имитировали внеклеточную среду.

ii. Основанные на фосфате расщепляемые линкерные группы

В еще одних 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 $-O-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(S)(SR_k)-O-$, $-S-P(O)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(OR_k)-S-$, $-S-P(O)(OR_k)-S-$, $-O-P(S)(OR_k)-S-$, $-S-P(S)(OR_k)-O-$, $-O-P(O)(R_k)-O-$, $-O-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-O-$, $-S-P(S)(R_k)-O-$, $-S-P(O)(R_k)-S-$, $-O-P(S)(R_k)-S-$, где R_k в каждом случае представляет собой C1-C20 алкил, C1-C20 галогеналкил, C6-C10 арил или C7-C12 аралкил. Примерные варианты осуществления включают $-O-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(S)(SH)-O-$, $-S-P(O)(OH)-O-$, $-O-P(O)(OH)-S-$, $-S-P(O)(OH)-S-$, $-O-P(S)(OH)-S-$, $-S-P(S)(OH)-O-$, $-O-P(O)(H)-O-$, $-O-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-O-$, $-S-P(S)(H)-O-$, $-S-P(O)(H)-S-$, $-O-P(S)(H)-S-$. В некоторых вариантах осуществления основанная на фосфате расщепляемая линкерная группа представляет собой $-O-P(O)(OH)-O-$. Данные кандидаты можно оценить, используя способы, аналогичные вышеописанным способам.

iii. Расщепляемая кислотой линкерная группа

В еще одних 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 осуществления, 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.

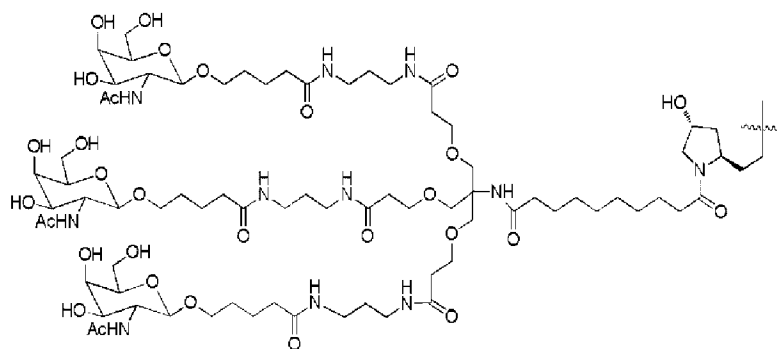
iv. Основанные на сложных эфирах расщепляемые линкерные группы

В еще одних вариантах осуществления расщепляемый линкер содержит основанную на сложном эфире расщепляемую линкерную группу. Основанная на сложном эфире расщепляемая линкерная группа расщепляется в клетках 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.

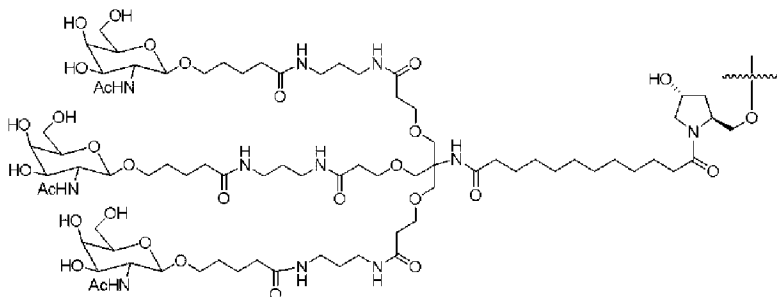
v. Основанные на пептидах расщепляемые линкерные группы

В еще одних вариантах осуществления 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 $-NHCHR^A C(O)NHCHR^B C(O)-$, где R^A и R^B представляют собой R-группы двух соседних аминокислот. Такие кандидаты можно оценить с использованием способов, аналогичных вышеописанным способам.

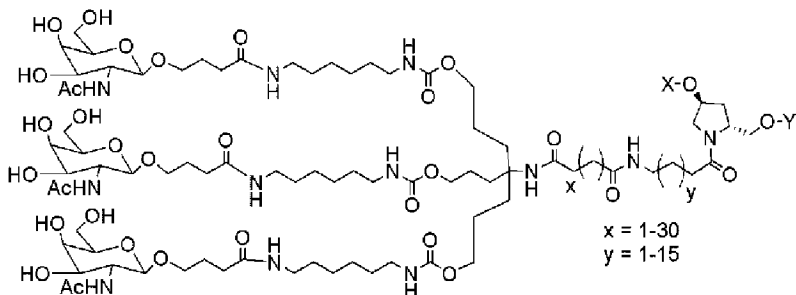
В некоторых вариантах осуществления иРНК по изобретению конъюгирована с углеводом через линкер. Неограничивающие примеры углеводных конъюгатов иРНК с линкерами в композициях и способах по изобретению включают, не ограничиваясь этим:



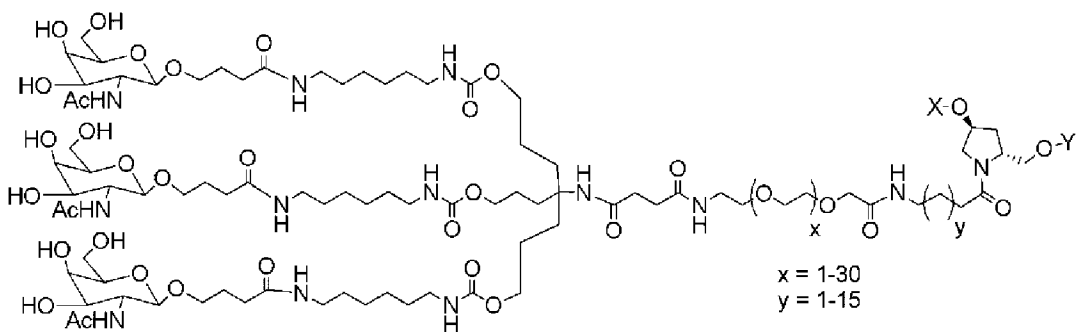
(Формула XXXVII),



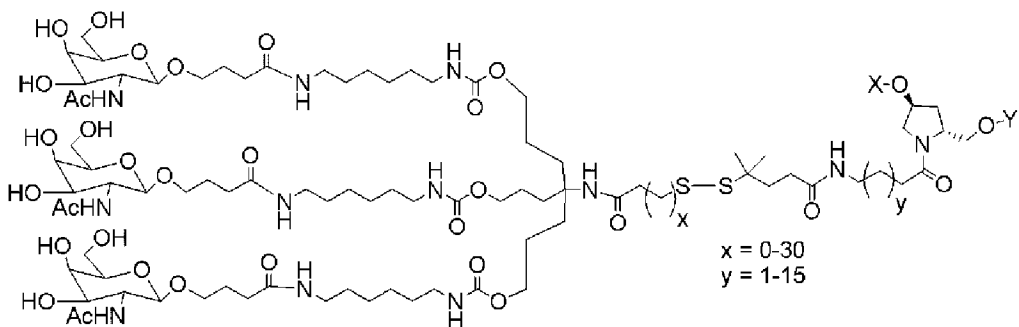
(Формула XXXVIII),



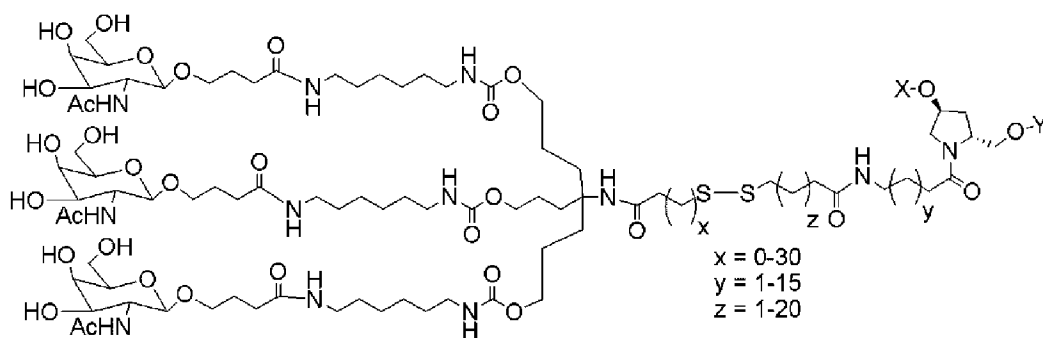
(Формула XXXIX),



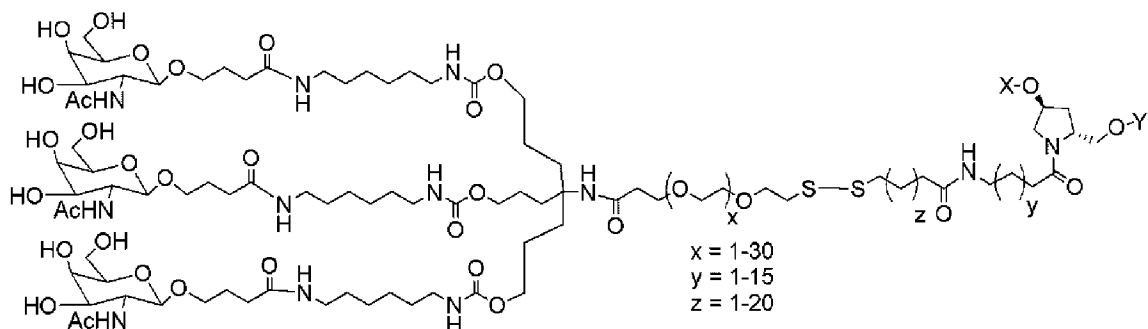
(Формула XL),



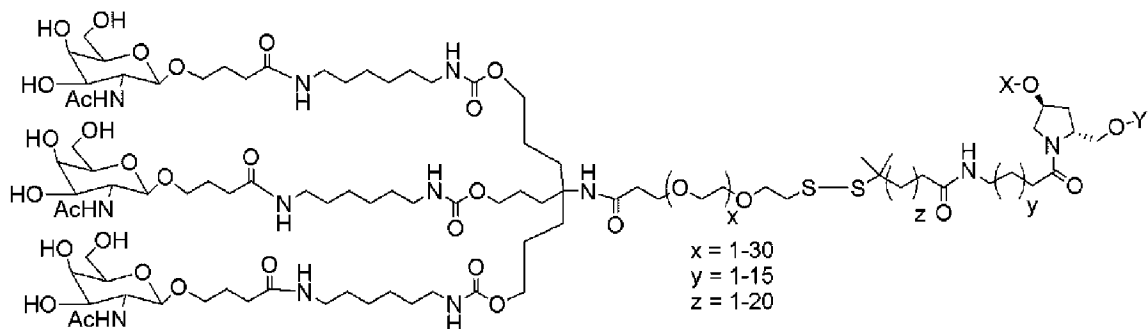
(Формула XLI),



(Формула XLII),



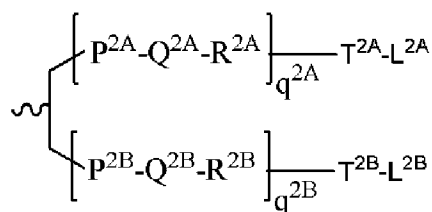
(Формула XLIII) и



(Формула XLIV), когда один из X или Y представляет собой олигонуклеотид, то 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 одном варианте осуществления дцРНК по изобретению конъюгирована с двухвалентным или трехвалентным разветвленным линкером, выбранным из группы структур, показанных в любой из формул (XLV) - (XLVI):

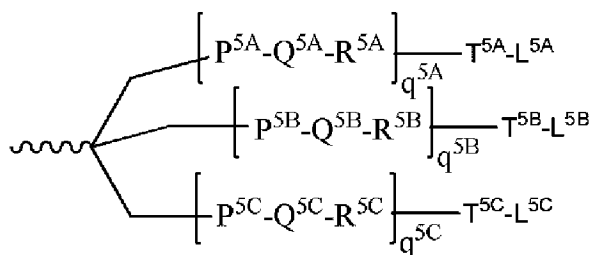


Формула XXXXV

или гетероциклил;

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 иРНК, которые представляют собой химерные соединения.

«Химерные» соединения иРНК или «химеры» по настоящему изобретению представляют собой соединения РНКи, например, дцРНК-агенты, 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 иРНК 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 иРНК 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 иРНК по сравнению с фосфоротиоатными дезокси-дцРНК, гибридизующимися с той же областью-мишенью. Расщепление РНК-мишени можно детектировать обычным методом, используя гель-электрофорез, и при необходимости ассоциированные способы гибридизации нуклеиновых кислот, известные в данной области.

В некоторых случаях РНК в иРНК может быть модифицирована нелигандной группой. Ряд нелигандных молекул был конъюгирован с иРНК для повышения активности, распределения в клетках или захвата иРНК 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-тримитилтиол (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660: 306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3: 2765), тиохолестерин (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20: 533), алифатическую цепь, например, остатки додекандиола или ундецила (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), фосфолипид, например, 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), группу пальмитоила (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229), или группу октадециламина или гексиламинокарбонилкохлестерина (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277: 923). Репрезентативные патенты США, в которых описано получение таких конъюгатов РНК, были приведены выше. Типичные протоколы конъюгации включают синтез РНК, несущих амиолинкер в одном или более положениях последовательности. Затем аминогруппу 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 иРНКи по изобретению

Доставка иРНК по настоящему изобретению в клетку, например, в клетку субъекта, такого как субъект-человек (например, субъект, нуждающийся в этом, такой как субъект,

предрасположенный к развитию, или у которого диагностировано расстройство, ассоциированное с фактором комплемента В, может быть достигнуто рядом различных путей. Например, доставку можно осуществить приведением в контакт клетки с иРНК по настоящему изобретению либо *in vitro*, либо *in vivo*. Доставка *in vivo* также может быть осуществлена непосредственно введением композиции, содержащей иРНК, например, дцРНК, субъекту. Альтернативно, доставка *in vivo* может осуществляться опосредованно введением одного или более векторов, которые кодируют и направляют экспрессию иРНК. Такие альтернативы дополнительно обсуждаются ниже.

В общем, любой способ доставки молекулы нуклеиновой кислоты (*in vitro* или *in vivo*) может быть адаптирован для применения с иРНК по настоящему изобретению (см., например, публикации 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 молекулы иРНК, включают, например, биологическую стабильность доставляемого агента, предотвращение неспецифических эффектов и накопление доставляемого агента в ткани-мишени. 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). Модификация РНК или фармацевтического носителя также может обеспечить нацеливание иРНК на ткань-мишень и избежать нежелательных нецелевых побочных эффектов. Молекулы иРНК могут быть модифицированы путем химической конъюгации с липофильными группами, такими как холестерин, для усиления захвата клетками и предотвращения деградации. Например, иРНК, направленную против АроВ, конъюгированную с липофильной группой холестерина, системно вводили мышам, что приводило к нокдауну мРНК ароВ как в печени, так и в тощей кишке (Soutschek, J., et al. (2004) *Nature* 432:173-178).

В альтернативном варианте осуществления иРНК может быть доставлена с использованием систем доставки, используемых для лекарственных средств, таких как наночастица, дендример, полимер, липосомы или катионные системы доставки. Положительно заряженные катионные системы для доставки способствуют связыванию молекулы иРНК (отрицательно заряженной), и также усиливают взаимодействия в отрицательно заряженной клеточной мембране, обеспечивая возможность эффективного захвата иРНК клеткой. Катионные липиды, дендримеры или полимеры могут либо быть связаны с иРНК, 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 включает в себе иРНК. Образование везикул или мицелл дополнительно предотвращает деградацию иРНК при системном введении. Способы получения и введения катионных комплексов иРНК 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 неограничивающие примеры систем для доставки лекарственных средств, применимых для системной доставки иРНК, включают DOTAP (Sorensen D.R. et al. (2003), выше; Verma U.N. et al. (2003), выше), «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 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.

А. Вектор, кодирующий иРНК

иРНК, нацеленные на ген фактора комплемента В, может экспрессироваться из транскрипционных единиц, вставленных в ДНК- или РНК-векторы (см., например, Couture A. et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern A. et al., публикация международной заявки WO 00/22113, Conrad, публикация международной заявки WO 00/22114, и Conrad, патент США № 6054299). Экспрессия может быть транзистентной (в течение месяцев или более) в зависимости от конкретной используемой конструкции и типа ткани или клетки-мишени. Такие 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).

Вирусные векторные системы, которые можно использовать в способах и композициях, описанных здесь, включают без ограничения (а) 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. Репликационно-дефектные 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 иРНК обычно могут потребоваться регуляторные элементы, например, промоторы, энхансеры и т.д., чтобы обеспечить экспрессию иРНК в клетках-мишенях. Другие аспекты, которые следует учитывать для векторов и конструкций, известны в данной области.

V. Фармацевтические композиции по изобретению

Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям и составам, которые включают иРНК по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим иРНК, как здесь описано, и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтические композиции, содержащие иРНК, применимы для лечения расстройства, ассоциированного с фактором комплемента В. Такие фармацевтические композиции составлены с учетом способа доставки. Одним примером являются композиции, сформулированные для системного введения посредством парентеральной доставки, например, путем подкожной (п/к), внутримышечной (в/м) или внутривенной (в/в) доставки. Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена фактора комплемента В.

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

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в дозах, достаточных для ингибирования экспрессии гена фактора комплемента В. Как правило, подходящая доза иРНК по изобретению будет находиться в диапазоне примерно от 0,001 до примерно 200,0 мг на кг массы тела реципиента в сутки, обычно в диапазоне примерно от 1 до 50 мг на кг массы тела в сутки. Как правило, подходящая доза иРНК по изобретению будет находиться в диапазоне от примерно 0,1 мг/кг до примерно 5,0 мг/кг, например, примерно 0,3 мг/кг и примерно 3,0 мг/кг. Режим с введением повторных доз может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, один раз в месяц, один раз в 3-6 месяцев или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят примерно от одного раза в месяц до примерно одного раза в шесть месяцев.

После начальной схемы терапии, лечение можно проводить реже. Продолжительность лечения можно определить в зависимости от тяжести заболевания.

В еще одних вариантах осуществления введение разовой дозы фармацевтических композиций может быть продолжительным, так что дозы вводят с интервалами не более 1, 2, 3 или 4 месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят примерно один раз в месяц. В других вариантах осуществления изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят раз в квартал (т.е. примерно каждые три месяца). В других вариантах осуществления изобретения разовую дозу фармацевтических композиций по изобретению вводят дважды в год (т.е. примерно раз в шесть месяцев).

Специалисту в данной области техники будет понятно, что на дозировку и временной режим, необходимые для эффективного лечения субъекта, могут влиять определенные факторы, включая, помимо прочего, мутации, присутствующие у субъекта, предшествующее лечение, общее состояние здоровья или возраст субъекта и другие имеющиеся заболевания. Более того, лечение субъекта профилактически или терапевтически эффективным количеством композиции, в зависимости от ситуации, может включать однократное введение или серии введений.

иРНК может быть доставлена таким образом, чтобы нацеливаться на конкретную ткань (например, гепатоциты).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению включают, не ограничиваясь ими, растворы, эмульсии и содержащие липосомы составы. Эти композиции могут быть получены из множества компонентов, которые включают, не ограничиваясь этим, предварительно приготовленные жидкости, самоэмульгирующиеся твердые вещества и самоэмульгирующиеся полутвердые вещества. Составы включают те, которые нацелены на печень.

Фармацевтические составы по настоящему изобретению, которые могут быть представлены в стандартной лекарственной форме, могут быть приготовлены в соответствии с обычными способами, хорошо известными в фармацевтической промышленности. Такие методики включают стадию связывания активных ингредиентов с фармацевтическим носителем (носителями) или эксципиентом (эксципиентами). Как правило, рецептуры готовят путем однородного и равномерного объединения активных ингредиентов с жидкими носителями.

А. Дополнительные составы

і. Эмульсии

Композиции по настоящему изобретению могут быть получены и формулированы 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, LV., Popovich NG. 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 полученную в

результате композиции 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 полученную 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 находиться 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. Другие способы стабилизации эмульсий заключаются в использовании эмульгаторов, которые могут быть включены в любую фазу эмульсии. В широком смысле, 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 сурфактанты, также известные как поверхностно-активные агенты, находят широкое применение в формуляции эмульсий, и в литературе имеются соответствующие обзоры (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).

Многочисленные разнообразные неэмульгирующие вещества также включают в эмульсионные препараты, и такие вещества вносят вклад в обеспечение определенных свойств 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).

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).

ii. Микроэмульсии

В одном варианте осуществления настоящего изобретения иРНК 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).

iii. Микрочастицы

иРНК 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 иРНК, в кожу животных. Большинство лекарственных средств находится в растворе как в ионизованной, так и в неионизованной 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 и их применение в производстве фармацевтических композиций и доставке фармацевтических агентов хорошо известна в данной области.

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 более 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., при объединении с нуклеиновой кислотой и другими компонентами данной фармацевтической композиции. Такие агенты хорошо известны в данной области.

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 по настоящему изобретению. Составы можно стерилизовать и при необходимости смешивать с вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, увлажнителями, эмульгаторами, солями, влияющими на осмотическое давление, буферами, красителями, корригентами и/или ароматизирующими веществами и тому подобное, которые не вступают во взаимодействие с нуклеиновой кислотой(ами) в составе, вызывающее их 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) одну или более иРНК и (б) один или более агентов, которые функционируют по механизму, отличному от РНК-интерференции, и которые также применимы для лечения расстройств, ассоциированных с фактором комплемента В.

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 человека. Дозы композиций, описанных в изобретении, обычно лежат в диапазоне концентраций в кровотоке, который включает значение ED50, 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. Дозу можно формулировать на животных моделях для достижения циркулирующего в плазме диапазона концентраций соединения или, в соответствующем случае, полипептидного продукта последовательности-мишени (например, достижение пониженной концентрации полипептида), который включает IC50 (т.е. концентрацию тестируемого соединения, которая приводит к половинному от максимального подавления симптомов), или более высокого ингибирования, как определено на культуре клеток. Таковую

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, иРНК, описанные в изобретении, можно вводить в комбинации с другими известными агентами, эффективными в профилактике и лечении и расстройства, ассоциированного с фактором комплемента В. В любом случае лечащий врач может корректировать дозу и временной режим введения иРНК на основе результатов, наблюдаемых с использованием стандартных показателей эффективности, известных в данной области или описанных в настоящем документе.

VIII. Способы ингибирования экспрессии фактора комплемента В

Настоящее изобретение также относится к способам ингибирования экспрессии гена CFB в клетке. Способы включают приведение клетки в контакт с РНКи-агентом, например, двухцепочечным РНКи-агентом, в количестве, эффективном для ингибирования экспрессии и/или активности CFB в клетке, тем самым ингибируя экспрессию и/или активность CFB в клетке.

Контактирование клетки с иРНК, например, двухцепочечным РНКи-агентом, может осуществляться *in vitro* или *in vivo*. Контактирование клетки *in vivo* с иРНК включает контактирование клетки или группы клеток субъекта, например человека, с иРНК. Также возможны комбинации способов приведения в контакт 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 представляющее интерес место.

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

Выражение «ингибирование экспрессии гена фактора комплемента В» относится к ингибированию экспрессии любого гена фактора комплемента В (например, такого как ген фактора комплемента В мыши, ген фактора комплемента В крысы, ген фактора комплемента В обезьяны или ген фактора комплемента В человека), а также вариантов или мутантов гена фактора комплемента В. Таким образом, ген фактора комплемента В может быть геном фактора комплемента В дикого типа, мутантным геном фактора комплемента В или трансгенным геном фактора комплемента В в контексте подвергшейся генетической манипуляции клетки, группы клеток или организма.

«Ингибирование экспрессии гена фактора комплемента В» включает любой уровень ингибирования гена фактора комплемента В, например, по меньшей мере частичное

подавление экспрессии гена фактора комплемента В, такое как клинически значимый уровень подавления. Экспрессию гена фактора В комплемента можно оценить на основе уровня или изменения уровня любой переменной, связанной с экспрессией гена фактора комплемента В, например, уровня мРНК фактора комплемента В или уровня белка фактора комплемента В, или, например, активности CH_{50} как показателя общего гемолитического комплемента, $АН_{50}$ для измерения гемолитической активности альтернативного пути комплемента, или уровня лактатдегидрогеназы (LDH) как показателя внутрисосудистого гемолиза, или уровней гемоглобина. Уровни C3, C9, C5, C5a, C5b и растворимого комплекса C5b-9 также можно определить для оценки экспрессии CFB. Ингибирование можно оценить по снижению абсолютного или относительного уровня одной или более из этих переменных по сравнению с контрольным уровнем. Этот уровень можно оценить в отдельной клетке или в группе клеток, включая, например, образец, полученный от субъекта. Понятно, что фактор комплемента В экспрессируется преимущественно в печени и присутствует в кровотоке.

Ингибирование можно оценить по снижению абсолютного или относительного уровня одной или более из этих переменных, которые связаны с экспрессией фактора комплемента В, 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, определенный у аналогичного субъекта, в клетке или образце, которые не подвергались обработке или подвергались обработке контролем (например, таким как только контрольный буфер или контрольный неактивный агент).

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению экспрессия гена фактора комплемента В ингибируется по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% или ниже уровня обнаружения анализа. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена фактора комплемента В ингибируется по меньшей мере на 70%. Кроме того, понятно, что может быть желательным ингибирование экспрессии фактора комплемента В в определенных тканях, например, в желчном пузыре, без значительного ингибирования экспрессии в других тканях, например, головном мозге. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с использованием метода анализа, представленного в примере 2, с концентрацией миРНК 10 нМ в клеточной линии соответствующего вида.

В некоторых вариантах осуществления ингибирование экспрессии *in vivo* определяется нокдауном человеческого гена у грызунов, экспрессирующих человеческий ген, например, у мыши, инфицированной AAV, экспрессирующей человеческий целевой ген (т.е. ген фактора комплемента В), например, при введении в виде однократная доза, например, 3 мг/кг на пике экспрессии РНК. Нокдаун экспрессии эндогенного гена в системе модельных животных также можно определить, например, после введения однократной дозы, например, 3 мг/кг, при наименьшей экспрессии РНК. Такие системы применимы, когда последовательности нуклеиновых кислот гена человека и гена модельного животного

достаточно близки, так что иРНК человека обеспечивает эффективный нокдаун гена модельного животного. Экспрессию РНК в печени определяют с использованием методов ПЦР, представленных в примере 2.

Ингибирование экспрессии гена фактора комплемента В может проявляться снижением количества мРНК, экспрессированной первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут находиться, например, в образце, полученном от субъекта), где ген фактора комплемента В транскрибируется и подвергается или подвергался обработке (например, приведением в контакт клетки или клеток с иРНК по изобретению или введением иРНК по изобретению субъекту, у которого клетки присутствуют или присутствовали) таким образом, что экспрессия гена фактора комплемента В ингибируется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по существу идентичных первой клетке или группе клеток, но не подвергается или не подвергался такой обработке (контрольная(ые) клетка(и) не обработанные иРНК или не обработанные иРНК, нацеленной на представляющей интерес ген). В некоторых вариантах осуществления ингибирование оценивают способом, представленным в примере 2, с использованием концентрации миРНК 10 нМ в клеточной линии соответствующего вида и выражением уровня мРНК в обработанных клетках в процентах от уровня мРНК в контрольных клетках с использованием следующей формулы:

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

В других вариантах осуществления ингибирование экспрессии гена фактора комплемента В можно оценить с точки зрения снижения параметра, который функционально связан с экспрессией гена фактора комплемента В, например, уровня белка фактора комплемента В в крови или сыворотке субъекта. Сайленсинг гена фактора комплемента В можно определить в любой клетке, экспрессирующей фактор комплемента В, либо эндогенной, либо гетерологичной, из экспрессионной конструкции и с помощью любого анализа, известного в данной области.

Ингибирование экспрессии белка фактора комплемента В может проявляться снижением уровня белка фактора комплемента В, который экспрессируется клеткой или группой клеток или в исследуемом образце (например, уровень белка в образце крови, полученном от субъекта). Как пояснялось выше, для оценки подавления мРНК ингибирование уровня экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток может быть аналогичным образом выражено в процентах от уровня белка в контрольной клетке или группе клеток, или по изменению уровня белка в исследуемом образце, например крови или полученной из нее сыворотке.

Контрольная клетка или группа клеток, которую можно использовать для оценки ингибирования экспрессии гена фактора комплемента В, 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 РНК-агентом или соответствующим образом подобранной контрольной популяции.

Уровень мРНК фактора комплемента В, 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 фактора комплемента В в образце определяют детектированием транскрибированного полинуклеотида или его фрагмента, например, мРНК гена фактора комплемента В. 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). Иллюстративные форматы анализов, в которых используется гибридизация рибонуклеиновой кислоты, включают радиоактивные анализы, ОТ-ПЦР, анализ защиты от РНКаз, нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализ микрочипов.

В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии фактора комплемента В оценивают с использованием нуклеиновокислотного зонда. В рамках настоящего изобретения, термин «зонд» относится к любой молекуле, которая способна избирательно связываться со специфическим фактором комплемента В. 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 фактора комплемента В. 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 фактора комплемента В.

Альтернативный метод определения уровня экспрессии фактора комплемента В 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 пригодны для детектирования молекул нуклеиновых кислот, если такие молекулы присутствуют в очень небольшом количестве. В конкретных аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии фактора комплемента В определяют с помощью количественной флуорогенной ОТ-ПЦР (т. е. системы TaqMan™). В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии определяют методом, описанным в примере 2, с использованием, например, концентрации миРНК 10 нМ в клеточной линии соответствующего вида.

Уровень экспрессии мРНК фактора комплемента В 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 фактора комплемента В 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. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии определяют с помощью способа, представленного в примере 2, с использованием концентрации миРНК 10 нМ в клеточной линии подходящего вида.

Уровень экспрессии белка CFB 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.

В некоторых вариантах осуществления эффективность способов по изобретению оценивают по снижению уровня мРНК или белка CFB (например, в биопсийном образце печени).

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению иРНК вводят субъекту таким образом, что иРНК доставляется в конкретный участок в организме

субъекта. Ингибирование экспрессии фактора комплемента В можно оценить с помощью определения уровня или изменения уровня мРНК фактора комплемента В или белка фактора комплемента В в образце, полученном из жидкости или ткани из определенного участка тела субъекта (например, печени или крови).

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

VII. Способы профилактики и лечения по изобретению

Настоящее изобретение также относится к способам применения иРНК по изобретению или композиции, содержащей иРНК по изобретению, для ингибирования экспрессии фактора комплемента В, тем самым обеспечивая профилактику или лечение расстройства, ассоциированного с фактором комплемента В, например, включая пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), астму, ревматоидный артрит (РА); антифосфолипидный синдром; волчаночный нефрит; ишемически-реперфузионное повреждение; типичный или инфекционный гемолитико-уремический синдром (tHUS); болезнь плотных отложений (DDD); оптиконевромиелит (NMO); мультифокальную моторную невропатию (MMN); рассеянный склероз (MS); макулярную дегенерацию (например, возрастную макулярную дегенерацию (AMD)); гемолиз, повышенную активность ферментов печени и синдром низкого уровня тромбоцитов (HELLP); тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (TTP); спонтанную потерю плода; малоиммунный васкулит; буллезный эпидермолиз; рецидивирующую потерю плода; преэклампсию, черепно-мозговую травму, миастению гравис, болезнь холодовых агглютининов, буллезный пемфигоид, дерматомиозит, гемолитико-уремический синдром, ассоциированный с шига-токсин-продуцирующей *E. coli*, невропатию С3, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (например, гранулематоз с полиангиитом (ранее известный как гранулематоз Вегенера), синдром Черджа-Стросса и микроскопический полиангиит), гуморальное и васкулярное отторжение трансплантата, дисфункцию трансплантата, инфаркт миокарда (например, повреждение тканей и ишемия при инфаркте миокарда), аллогенный трансплантат, сепсис (например, неблагоприятный исход при сепсисе), ишемическую болезнь сердца, дерматомиозит, болезнь Грейвса, атеросклероз, болезнь Альцгеймера, системный воспалительный ответ, сепсис, септический шок, повреждение спинного мозга, гломерулонефрит, тиреоидит Хашимото, сахарный диабет I типа, псориаз, пемфигус, аутоиммунную гемолитическую анемию (АИНА), ИТП, синдром Гудпасчера, болезнь Дегоса, антифосфолипидный синдром (APS), катастрофический APS (CAPS), сердечно-сосудистое расстройство, миокардит, цереброваскулярное расстройство, периферическое (например, скелетно-мышечное) васкулярное расстройство, реноваскулярную болезнь, мезентериальное/кишечнососудистое расстройство, нефрит при

пурпуре Шенлейна-Геноха, васкулит, ассоциированный с системной красной волчанкой, васкулит, ассоциированный с ревматоидным артритом, иммунный комплексный васкулит, болезнь Такаясу, дилатационную кардиомиопатию, диабетическую ангиопатию, болезнь Кавасаки (артериит), венозную газовую эмболию (VGE) и рестеноз после установки стента, ротационную атерэктомию и чрескожную транслюминальную коронарную ангиопластику (PTCA) (см., например, Holers (2008) *Immunological Reviews*, 223:300-316; Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology*, 41:147-152; публикацию патента США № 20070172483).

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии, поликистозной болезни почек, мембранозной нефропатии, возрастной макулярной дегенерации, атипичного гемолитико-уремического синдрома, тромботической микроангиопатии, миастении гравис, ишемии и реперфузионного повреждения, пароксизмальной ночной гемоглобинурии и ревматоидного артрита.

В еще одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек.

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 изобретению, может быть любая клетка, которая экспрессирует ген фактора комплемента В, например, клетка печени, клетка головного мозга, клетка желчного пузыря, клетка сердца или клетка почки. В одном варианте осуществления клетка представляет собой клетку печени. Клеткой, подходящей для использования в способах по изобретению, может быть клетка млекопитающего, например, клетка примата (такая как человеческая клетка, включая человеческую клетку химерного животного, отличного от человека, или клетка примата, отличного от человека, например, клетка обезьяны или клетка шимпанзе), или клетка животного, отличного от примата. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, например, клетку печени человека. В способах по изобретению экспрессия фактора комплемента В ингибируется в клетке, по меньшей мере, на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 или 95 или до уровня ниже уровня обнаружения анализа.

Способы *in vivo* по настоящему изобретению могут включать введение субъекту композиции, содержащей иРНК, где иРНК включает нуклеотидную последовательность, комплементарную по меньшей мере участку РНК-транскрипта гена фактора комплемента В млекопитающего, которому вводят РНК-агент. Композицию можно вводить любыми способами, известными в данной области, включая, не ограничиваясь этим, пероральный, внутрибрюшинный или парентеральный пути, включая интракраниальное (например, внутримозговое, интрапаренхиматозное и интратекальное), внутривенное,

внутримышечное, интравитреальное, подкожное, чрескожное, ингаляционное (в виде аэрозоля), интраназальное, 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 внутримышечной инъекцией.

В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется посредством инъекции-депо. Инъекция-депо может высвобождать иРНК непрерывно в течение длительного периода времени. Таким образом, инъекция-депо может снизить частоту введения, необходимую для получения желаемого эффекта, например, желаемого ингибирования CFB 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 интракраниальных, внутривенных, 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 иРНК в печень.

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 фактора комплемента В у млекопитающего. Способы включают введение млекопитающему композиции, содержащей дцРНК, нацеленную на ген фактора комплемента В в клетке млекопитающего, и поддержание млекопитающего в течение времени, достаточного для деградации мРНК-транскрипта гена фактора комплемента В, тем самым ингибируя экспрессию гена фактора комплемента В в клетке. Снижение экспрессии гена можно оценить любыми методами, известными в данной области, и методами, например, кОТ-ПЦР, описанной здесь, например, в примере 2. Снижение продукции белка можно оценить любыми методами, известными в данной области, например, ELISA. В некоторых вариантах осуществления образец пункционной биопсии печени служит тканевым материалом для мониторинга снижения экспрессии гена фактора комплемента В или белка. В других вариантах осуществления образец крови служит

образцом субъекта для мониторинга снижения экспрессии белка фактора комплемента В.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения субъекта, нуждающегося в этом, например, субъекта, у которого диагностировано заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, такое как гломерулопатия С3, системная красная волчанка (SLE), например, волчаночный нефрит, IgA-нефропатия, диабетическая нефропатия и поликистозная болезнь почек.

Настоящее изобретение также относится к способам профилактики у субъекта, нуждающегося в этом. Способы лечения по изобретению включают введение иРНК по изобретению субъекту, например, субъекту, для которого было бы полезно снижение экспрессии фактора комплемента В, в профилактически эффективном количестве иРНК, нацеленной на ген фактора комплемента В, или фармацевтической композиции, содержащей иРНК, нацеленной на ген фактора комплемента В.

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), астмы, ревматоидного артрита (РА); антифосфолипидного синдрома; волчаночного нефрита; ишемически-реперфузионного повреждения; типичного или инфекционного гемолитико-уремического синдрома (tHUS); болезни плотных отложений (DDD); оптиконевромиелита (NMO); мультифокальной моторной невропатии (MMN); рассеянного склероза (MS); макулярной дегенерации (например, возрастной макулярной дегенерации (AMD)); гемолиза, повышенной активности ферментов печени и синдрома низкого уровня тромбоцитов (HELLP); тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП); спонтанной потери плода; малоиммунного васкулита; буллезного эпидермолиза; рецидивирующей потери плода; преэклампсии, черепно-мозговой травмы, миастении гравис, болезни холодовых агглютининов, буллезного пемфигоида, дерматомиозита, гемолитико-уремического синдрома, ассоциированного с шига-токсин-продуцирующей *E. coli*, невропатии С3, васкулита, ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (например, гранулематоза с полиангиитом (ранее известного как гранулематоз Вегенера), синдрома Черджа-Стросса и микроскопического полиангиита), гуморального и васкулярного отторжения трансплантата, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда (например, повреждения тканей и ишемии при инфаркте миокарда), аллогенного трансплантата, сепсиса (например, неблагоприятный исход при сепсисе), ишемической болезни сердца, дерматомиозита, болезни Грейвса, атеросклероза, болезни Альцгеймера, системного воспалительного ответа, сепсиса, септического шока, повреждения спинного мозга, гломерулонефрита, тиреоидита Хашимото, сахарного диабета I типа, псориаза, пемфигуса, аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА), ИТР, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса, антифосфолипидного синдрома (APS), катастрофического APS (CAPS), сердечно-сосудистого расстройства, миокардита, цереброваскулярного расстройства, периферического (например, скелетно-мышечного) васкулярного расстройства, реноваскулярной болезни,

мезентериального/кишечнососудистого расстройства, нефрита при пурпуре Шенлейна-Геноха, васкулита, ассоциированного с системной красной волчанкой, васкулита, ассоциированного с ревматоидным артритом, иммунного комплексного васкулита, болезни Такаясу, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Кавасаки (артериита), венозной газовой эмболии (VGE) и рестеноза после установки стента, ротационной атерэктомии и чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (PTCA) (см., например, Holers (2008) *Immunological Reviews*, 223:300-316; Holers and Thurman (2004) *Molecular Immunology*, 41:147-152; публикацию патента США № 20070172483).

В одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии, поликистозной болезни почек, мембранозной нефропатии, возрастной макулярной дегенерации, атипичного гемолитико-уремического синдрома, тромботической микроангиопатии, миастения гравис, ишемии и реперфузионного повреждения, пароксизмальной ночной гемоглобинурии и ревматоидного артрита.

В еще одном варианте осуществления заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек.

иРНК по настоящему изобретению можно вводить в виде «свободной иРНК». Свободную иРНК вводят в отсутствие фармацевтической композиции. «Голая» иРНК 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 иРНК, можно корректировать таким образом, чтобы он подходил для введения субъекту.

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

Субъекты, для которых было бы полезно ингибирование экспрессии гена фактора комплемента В, являются субъектами, предрасположенных к развитию или у которых диагностировано расстройство, ассоциированное с СFB, например, гломерулопатия С3, системная красная волчанка (SLE), например, волчаночный нефрит, IgA-нефропатия, диабетическая нефропатия и поликистозная болезнь почек.

В одном варианте осуществления способ включает введение композиции, описанной в настоящем документе, таким образом, чтобы экспрессия целевого гена компонента комплемента В снижалась, например, примерно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 или 3-6 месяцев на дозу. В некоторых вариантах осуществления композицию вводят один раз в 3-6 месяцев.

В одном варианте осуществления иРНК, пригодные для способов и композиций, описанных в настоящем документе, специфически нацелены на РНК (первичные или

процессированные) целевого гена фактора комплемента В. Композиции и способы ингибирования экспрессии этих генов с использованием иРНК можно приготовить и осуществить, как описано в настоящем документе.

Введение иРНК в соответствии со способами по изобретению может привести к профилактике или лечению заболеваний, ассоциированных с фактором комплемента В, например, гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек.

Субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, такое как примерно от 0,01 мг/кг до примерно 200 мг/кг. Субъектам можно вводить терапевтическое количество иРНК, такое как примерно от 5 мг до примерно 1000 мг, в виде фиксированной дозы, независимо от массы тела.

В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят подкожно, т.е. путем подкожной инъекции. Для доставки желаемой дозы иРНК субъекту можно использовать одну или более 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 с повторными дозами может включать введение терапевтического количества иРНК на регулярной основе, например, от одного раза в месяц до одного раза в год. В некоторых вариантах осуществления иРНК вводят примерно от одного раза в месяц до примерно одного раза в три месяца или примерно от одного раза в три месяца до примерно одного раза в шесть месяцев.

Изобретение также относится к способам и применениям иРНК-агента или его фармацевтической композиции для лечения субъекта, для которого было бы полезно снижение или ингибирование экспрессии гена CFB, например, у субъекта, имеющего заболевание, ассоциированное с CFB, в комбинации с другими фармацевтическими или другими терапевтическими методами, например, с использованием известных фармацевтических препаратов или известных терапевтических методов, например, таких как которые используются в настоящее время для лечения таких расстройств.

Соответственно, в некоторых аспектах изобретения способы, которые включают либо один иРНК-агент по изобретению, дополнительно включают введение субъекту одного или более дополнительных терапевтических средств. иРНК-агент и дополнительное терапевтическое средство или метод лечения можно использовать одновременно или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции или в разное время, или другим способом, известным в данной области техники или описанных здесь.

В одном варианте осуществления иРНК-агент по изобретению вводят в комбинации с антителом против компонента комплемента С5 или его антигенсвязывающим фрагментом (например, экулизумабом или равулизумабом-cwvz), иРНК-агентом, нацеленным на

компонент комплемента C5, иРНК-агентом, нацеленным на компонент комплемента C3 или ингибитор пептида C3 (например, компстатин). В одном варианте осуществления иРНК-агент по изобретению вводят пациенту, и затем пациенту вводят дополнительное терапевтическое средство (или наоборот). В другом варианте осуществления иРНК-агент по изобретению и дополнительное терапевтическое средство вводят одновременно.

иРНК-агент по изобретению и дополнительное терапевтическое средство или метод лечения можно использовать одновременно или в одной и той же комбинации, например, парентерально, или дополнительное терапевтическое средство можно вводить как часть отдельной композиции, или в разное время, или с помощью другого способа, известного в данной области техники или описанный здесь.

VIII. Наборы

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к наборам, которые включают подходящий контейнер, содержащий фармацевтическую композицию соединения миРНК, например, двухцепочечного соединения миРНК или одноцепочечного соединения миРНК (например, предшественника, например, более крупного соединения миРНК, которое может процессироваться в соединение ssiРНК или ДНК, которая кодирует соединение миРНК, например, двухцепочечное соединение миРНК или соединение ssiРНК 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 мРНК CFB, белка CFB и/или активности CFB). Такие средства для оценки ингибирования CFB могут включать средства для получения образца от субъекта, например, такого как образец плазмы. Наборы по изобретению могут дополнительно включать средства для определения терапевтически эффективного или профилактически эффективного количества.

В некоторых вариантах осуществления отдельные компоненты фармацевтической композиции 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 более 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.

Настоящее изобретение дополнительно иллюстрировано следующими примерами,

которые не следует рассматривать в качестве ограничивающих. Полное содержание всех публикаций, патентов и опубликованных заявок на патент, цитированных в данной заявке, а также список последовательностей в произвольной форме и чертежи включены в настоящее описание посредством ссылки.

Примеры

Пример 1. Синтез иРНК

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.

Дизайн миРНК

миРНК, нацеленные на ген человеческого фактора комплемента В (CFB) (человеческий: NCBI refseqID NM_001710.5; NCBI GeneID: 629), были разработаны с использованием пользовательских сценариев R и Python. Человеческая мРНК NM_001710 REFSEQ, версия 5, имеет длину 2646 оснований. Подробные списки немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей CFB показаны в таблицах 2, 4 и 6. Подробные списки модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей CFB показаны в таблицах 3, 5 и 7.

Следует понимать, что во всей заявке имя дуплекса без десятичного знака эквивалентно имени дуплекса с десятичным знаком, которое просто ссылается на номер партии дуплекса. Например, AD-959917 эквивалентен AD-959917.1.

Синтез миРНК

миРНК синтезировали и подвергали отжигу с использованием обычных методов, известных в данной области.

Пример 2. Методы скрининга in vitro

Культивирование клеток и трансфекции в 384-луночных планшетах

Клетки Hep3b (ATCC, Манассас, Вирджиния) культивировали почти до слияния при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в минимальной эссенциальной среде Игла (Gibco) с добавлением 10% FBS (ATCC) перед высвобождением из чашки путем трипсинизации. Первичные мышечные гепатоциты (PMH) выделяли менее чем за 1 ч до трансфекции и культивировали в среде для первичных гепатоцитов. Как для Hep3b, так и для PMH трансфекцию проводили, добавляя 5 мкл Opti-MEM плюс 0,1 мкл Lipofectamine RNAiMax на лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, номер по каталогу 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса миРНК в отдельные лунки в 384-луночном планшете. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляли 40 мкл минимальной эссенциальной среды Игла (ATCC номер по каталогу 30-2003), содержащей ~5×10³ клеток Hep3b или PMH. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед выделением РНК. Эксперименты с однократной дозой проводили при 10 нМ, 1 нМ и 0,1 нМ.

Выделение общей фракции РНК с использованием набора для выделения мРНК DYNABEADS (Invitrogen™, номер по каталогу: 610-12)

РНК выделяли с использованием автоматизированного протокола на платформе BioTek-EL406 с использованием набора DYNABEAD (Invitrogen, номер по каталогу 61012). Вкратце, в планшеты 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.

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 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.

ПЦР в режиме реального времени

2 мкл кДНК и 5 мкл 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 CFB человека (Hs01115057_m1, Thermo), либо к 0,5 мкл зонда GAPDH TaqMan мыши (4352339E) и 0,5 мкл зонда CFB мыши (Mm00481934_m1, Thermo) из расчета на одну лунку в 384-луночных планшетах (Roche, номер по каталогу 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 однократных доз дцРНК-агентов в таблицах 2 и 3 на клетках Нер3В приведены в таблице 8. Результаты скрининга однократных доз дцРНК-агентов из таблиц 4 и 5 на клетках Нер3В приведены в таблице 9. Результаты скрининга однократных доз дцРНК-агентов из таблиц 4 и 5 на клетках РМН показаны в таблице 10. Результаты скрининга однократных доз дцРНК-агентов из таблиц 6 и 7 на клетках РМН показаны в таблице 11. Результаты скрининга однократных доз дцРНК-агентов из таблицы 6 и 7 на клетках Нер3В показаны в таблице 12.

Анализ ELISA

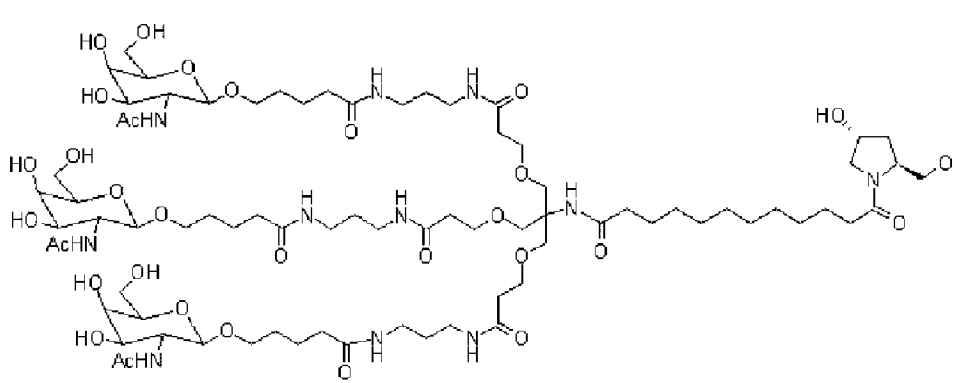
Уровни белка CFB человека определяли с использованием количественного иммуноферментного анализа типа «сэндвич» (Human Complement Factor B AssayMax ELISA Kit - AssayPro). Вкратце, образцы разбавляли 1:1000 и 50 мкл образца добавляли в лунку титрационного микропланшета. Образцы инкубировали в течение 2 ч и затем

промывали. В каждую лунку добавляли 50 мкл биотинилированного анти-CFB антитела и инкубировали в течение 1 ч. Затем образцы промывали и в каждую лунку добавляли по 50 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза и инкубировали в течение 30 мин. После очередной промывки добавляли 50 мкл субстрата для фермента пероксидазы из расчета на одну лунку и образцы инкубировали в течение 15 мин, после чего добавляли 50 мкл стоп-раствора на лунку. Образцы сразу анализировали при 450 нм и определяли количество белка CFB человека сравнением показаний со стандартной кривой (0-280 нг белка CFB человека).

Таблица 1

Сокращенные обозначения нуклеотидных мономеров, используемые в представлении последовательностей нуклеиновых кислот. Понятно, что эти мономеры, когда они присутствуют в олигонуклеотиде, взаимно связаны 5'-3'-фосфодиэфирными связями; и понятно, что когда нуклеотид содержит 2'-фтор-модификацию, то фтор замещает гидроксильную группу в этом положении в исходном нуклеотиде (т. е. это 2'-дезоксид-2'-фторнуклеотид)

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'-фосфоротиоат
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'-фосфоротиоат
u	2'-О-метилуридин-3'-фосфат
us	2'-О-метилуридин-3'-фосфоротиоат
s	фосфоротиоатная связь
L10	N-(холестерилкарбоксамидокапроил)-4-гидроксипролинол (Нур-С6-Chol)
L96	N-[трис(GalNAc-алкил)-амидодеcanoил]-4-гидроксипролинол (Нур-(GalNAc-алкил)3) 
Y34	2-гидроксиметил-тетрагидрофуран-4-метокси-3-фосфат (абазическая 2'-ОМе фураноза)
Y44	инвертированная абазическая ДНК (2-гидроксиметилтетрагидрофуран-5-фосфат)
(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'-фосфоротиоат

dC	2'-дезоксицитидин-3'-фосфат
dCs	2'-дезоксицитидин-3'-фосфоротиоат
dG	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфат
dGs	2'-дезоксигуанозин-3'-фосфоротиоат
dT	2'-дезокситимидин-3'-фосфат
dTs	2'-дезокситимидин-3'-фосфоротиоат
dU	2'-дезоксиуридин
dUs	2'-дезоксиуридин-3'-фосфоротиоат
(C2p)	цитидин-2'-фосфат
(G2p)	гуанозин-2'-фосфат
(U2p)	уридин-2'-фосфат
(A2p)	аденозин-2'-фосфат
(Chd)	2'-О-гексадецилцитидин-3'-фосфат
(Ahd)	2'-О-гексадециладенозин-3'-фосфат
(Ghd)	2'-О-гексадецилгуанозин-3'-фосфат
(Uhd)	2'-О-гексадецилуридин-3'-фосфат

Таблица 2

Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК-агентов фактора комплемента В

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон (NM_001710.5)	Последовательность антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон (NM_001710.5)
AD-557072.1	CAAAAAGUGUCUAGUCAACUU	19	1145-1165	AAGUUGACUAGACACUU UUUGGC	105	1143-1165
AD-558097.1	UAGUGGAUGUCUGCAAAAACU	20	2440-2460	AGUUUUTGCAGACAUC ACUACU	106	2438-2460
AD-557774.1	GAAUUCCUGAAUUUUAUGACU	21	1981-2001	AGUCAUAAAAUUCAGGA AUUCCU	107	1979-2001
AD-557070.1	GCCAAAAGUGUCUAGUCAAU	22	1143-1163	AUUGACTAGACACUUUU UGGCUC	108	1141-1163
AD-558068.1	UCACAAGAGAAGUCGUUUCAU	23	2393-2413	AUGAAACGACUUCUCUU GUGAAC	109	2391-2413
AD-557068.1	GAGCCAAAAGUGUCUAGUCU	24	1141-1161	AGACUAGACACUUUUUG GCUCCU	110	1139-1161
AD-556701.1	CUACUACAAUGUGAGUGAUGU	25	635-655	ACAUCACUCACAUUGUA GUAGGG	111	633-655
AD-558076.1	GAAGUCGUUUCAUUCAAGUUU	26	2401-2421	AAACUUGAAUGAAACGA CUUCUC	112	2399-2421
AD-558065.1	AGUUCACAAGAGAAGUCGUUU	27	2390-2410	AAACGACUUCUCUUGUG AACUAU	113	2388-2410

AD-557859.1	CAACUCGAGCUUUGAGGCUUU	28	2086-2106	AAAGCCTCAAAGCUCGA GUUGUU	114	2084-2106
AD-558096.1	GUAGUGGAUGUCUGCAAAAAU	29	2439-2459	AUUUUUGCAGACAUCCA CUACUC	115	2437-2459
AD-557422.1	GAGGAUUAUCUGGAUGUCUAU	30	1536-1556	AUAGACAUCCAGAUAAU CCUCCC	116	1534-1556
AD-556919.1	AGACUCCUUCAUGUACGACAU	31	935-955	AUGUCGTACAUGAAGGA GUCUUG	117	933-955
AD-558069.1	CACAAGAGAAGUCGUUCAU	32	2394-2414	AAUGAAACGACUUCUCU UGUGAA	118	2392-2414
AD-558063.1	AUAGUUCACAAGAGAAGUCGU	33	2388-2408	ACGACUTCUCUUGUGAA CUAUC	119	2386-2408
AD-557069.1	AGCCAAAAGUGUCUAGUCAU	34	1142-1162	AUGACUAGACACUUUUU GGCUCC	120	1140-1162
AD-558225.1	UGAAUUAAAACAGCUGCGACU	35	2604-2624	AGUCGCAGCUGUUUUAA UUCAU	121	2602-2624
AD-557853.1	AGGGAACAACUCGAGCUUUGU	36	2080-2100	ACAAAGCUCGAGUUGUU CCCUCG	122	2078-2100
AD-558012.1	GACAAAGUCAAGGACAUCUCU	37	2277-2297	AGAGAUGUCCUUGACUU UGUCAU	123	2275-2297
AD-558061.1	UGAUAGUUCACAAGAGAAGUU	38	2386-2406	AACUUCTCUUGUGAACU AUCAAG	124	2384-2406

AD-557079.1	UGUCUAGUCAACUAAUUGAU	39	1152-1172	AUCAAUTAAGUUGACUA GACACU	125	1150-1172
AD-558066.1	GUUCACAAGAGAAGUCGUUUU	40	2391-2411	AAAACGACUUCUCUUGU GAACUA	126	2389-2411
AD-557353.1	GACCCAAUUACUGUCAUUGAU	41	1467-1487	AUCAAUGACAGUAAUUG GGUCCC	127	1465-1487
AD-557782.1	GAAUUUUAUGACUAUGACGUU	42	1989-2009	AACGUCAUAGUCAUAAA AUUCAG	128	1987-2009
AD-556390.1	CUGGAGUUUCAGCUUGGACAU	43	179-199	AUGUCCAAGCUGAAACU CCAGAC	129	177-199
AD-557078.1	GUGUCUAGUCAACUAAUUGU	44	1151-1171	ACAAUUAAGUUGACUAG ACACUU	130	1149-1171
AD-557475.1	UUCCAAGAAAGACAAUGAGCU	45	1607-1627	AGCUCATUGUCUUUCUU GGAAGC	131	1605-1627
AD-556734.1	CUGCUAUGACGGUUACACUCU	46	668-688	AGAGUGTAACCGUCAUA GCAGUG	132	666-688
AD-557084.1	AGUCAACUAAUUGAGAAGGU	47	1157-1177	ACCUUCTCAAUUAAGUU GACUAG	133	1155-1177
AD-557498.1	AUGUGUUCAAAGUCAAGGAUU	48	1630-1650	AAUCCUTGACUUUGAAC ACAUGU	134	1628-1650
AD-556788.1	GACAGCGAUCUGUGACAACGU	49	740-760	ACGUUGTCACAGAUCGC UGUCUG	135	738-760

AD-557067.1	GGAGCCAAAAAGUGUCUAGUU	50	1140-1160	AACUAGACACUUUUUGG CUCCUG	136	1138-1160
AD-557852.1	GAGGGAACAACUCGAGCUUUU	51	2079-2099	AAAAGCTCGAGUUGUUC CCUCGG	137	2077-2099
AD-556733.1	ACUGCUAUGACGGUUACACUU	52	667-687	AAGUGUAACCGUCAUAG CAGUGG	138	665-687
AD-556725.1	CUCUUUCCACUGCUAUGACGU	53	659-679	ACGUCATAGCAGUGGAA AGAGAU	139	657-679
AD-557860.1	AACUCGAGCUUUGAGGCUUCU	54	2087-2107	AGAAGCCUCAAGCUCG AGUUGU	140	2085-2107
AD-556786.1	CAGACAGCGAUCUGUGACAAU	55	738-758	AUUGUCACAGAUCGCUG UCUGCC	141	736-758
AD-556581.1	CCUUCUGGCUUCUACCCGUAU	56	465-485	AUACGGGUAGAAGCCAG AAGGAC	142	463-485
AD-556963.1	ACCAUAGAAGGAGUCGAUGCU	57	999-1019	AGCAUCGACUCCUUCUA UGGUCU	143	997-1019
AD-557450.1	ACCAAGUGAACAUCAAUGCUU	58	1582-1602	AAGCAUTGAUGUUCACU UGGUUC	144	1580-1602
AD-557204.1	UGAAAUCAAUUAUGAAGACCU	59	1298-1318	AGGUCUTCAUAAUUGAU UUCAUU	145	1296-1318
AD-558062.1	GAUAGUUCACAAGAGAAGUCU	60	2387-2407	AGACUUCUCUUGUGAAC UAUCAA	146	2385-2407

AD-557602.1	AAGGGUACCGAUUACCACAAU	61	1734-1754	AUUGUGGUAUAUCGGUAC CCUUCC	147	1732-1754
AD-556917.1	CAAGACUCCUUCAUGUACGAU	62	933-953	AUCGUACAUGAAGGAGU CUUGGC	148	931-953
AD-557969.1	CUGACUCGGAAGGAGGUCUAU	63	2196-2216	AUAGACCUCCUUCCGAG UCAGCU	149	2194-2216
AD-558064.1	UAGUUCACAAGAGAAGUCGUU	64	2389-2409	AACGACTUCUCUUGUGA ACUAUC	150	2387-2409
AD-558105.1	GUCUGCAAAAACCAGAAGCGU	65	2448-2468	ACGCUUCUGGUUUUUGC AGACAU	151	2446-2468
AD-556791.1	AGCGAUCUGUGACAACGGAGU	66	743-763	ACUCCGTUGUCACAGAU CGCUGU	152	741-763
AD-557972.1	ACUCGGAAGGAGGUCUACAUI	67	2199-2219	AAUGUAGACCUCCUUCC GAGUCA	153	2197-2219
AD-556920.1	GACUCCUUCAUGUACGACACU	68	936-956	AGUGUCGUACAUGAAGG AGUCUU	154	934-956
AD-558078.1	AGUCGUUUCAUUCAAGUUGGU	69	2403-2423	ACCAACTUGAAUGAAAC GACUUC	155	2401-2423
AD-557861.1	ACUCGAGCUUUGAGGCUUCCU	70	2088-2108	AGGAAGCCUCAAAGCUC GAGUUG	156	2086-2108
AD-557856.1	GAACAACUCGAGCUUUGAGGU	71	2083-2103	ACCUCAAAGCUCGAGUU GUUCCC	157	2081-2103

AD-557041.1	UGGUGCUAGAUGGAUCAGACU	72	1096-1116	AGUCUGAUCCAUCUAGC ACCAGG	158	1094-1116
AD-556874.1	GUGUCAGGAAGGUGGCUCUUU	73	890-910	AAAGAGCCACCUUCCUG ACACGU	159	888-910
AD-557345.1	CUGAUGGAUUGCACAACAUGU	74	1441-1461	ACAUGUTGUGCAAUCCA UCAGUC	160	1439-1461
AD-557839.1	CAGACUAUCAGGCCCAUUUGU	75	2046-2066	ACAAAUGGGCCUGAUAG UCUGGC	161	2044-2066
AD-556962.1	GACCAUAGAAGGAGUCGAUGU	76	998-1018	ACAUCGACUCCUUCUAU GGUCUC	162	996-1018
AD-557066.1	AGGAGCCAAAAAGUGUCUAGU	77	1139-1159	ACUAGACACUUUUUGGC UCCUGU	163	1137-1159
AD-556961.1	AGACCAUAGAAGGAGUCGAUU	78	997-1017	AAUCGACUCCUUCUAUG GUCUCU	164	995-1017
AD-557226.1	AAGUUGAAGUCAGGGACUAAU	79	1320-1340	AUUAGUCCCUGACUUCA ACUUGU	165	1318-1340
AD-557865.1	GAGCUUUGAGGCUUCCUCCA	80	2092-2112	AUGGAGGAAGCCUCAA GCUCGA	166	2090-2112
AD-557209.1	UCAAUUAUGAAGACCACAAGU	81	1303-1323	ACUUGUGGUCUUCAUAA UUGAUU	167	1301-1323
AD-556918.1	AAGACUCCUUCAUGUACGACU	82	934-954	AGUCGUACAUGAAGGAG UCUUGG	168	932-954

AD-557868.1	CUUUGAGGCUUCCUCCAACUU	83	2095-2115	AAGUUGGAGGAAGCCUC AAAGCU	169	2093-2115
AD-557873.1	AGGCUUCCUCCAACUACCACU	84	2100-2120	AGUGGUAGUUGGAGGAA GCCUCA	170	2098-2120
AD-556787.1	AGACAGCGAUCUGUGACAACU	85	739-759	AGUUGUCACAGAUCGCU GUCUGC	171	737-759
AD-558004.1	CAGGCUAUGACAAAGUCAAGU	86	2269-2289	ACUUGACUUUGUCAUAG CCUGGG	172	2267-2289
AD-557867.1	GCUUUGAGGCUUCCUCCAACU	87	2094-2114	AGUUGGAGGAAGCCUCA AAGCUC	173	2092-2114
AD-557788.1	UAUGACUAUGACGUUGCCCUU	88	1995-2015	AAGGGCAACGUCAUAGU CAUAAA	174	1993-2015
AD-558106.1	UCUGCAAAAACCAGAAGCGGU	89	2449-2469	ACCGCUTCUGGUUUUUG CAGACA	175	2447-2469
AD-556724.1	UCUCUUUCCACUGCUAUGACU	90	658-678	AGUCAUAGCAGUGGAAA GAGAUC	176	656-678
AD-556739.1	AUGACGGUUACACUCUCCGGU	91	673-693	ACCGGAGAGUGUAACCG UCAUAG	177	671-693
AD-557417.1	CAAGGGAGGAUUAUCUGGAUU	92	1531-1551	AAUCCAGAUAAUCCUCC CUUGGG	178	1529-1551
AD-556790.1	CAGCGAUCUGUGACAACGGAU	93	742-762	AUCCGUTGUCACAGAUC GCUGUC	179	740-762

AD-557872.1	GAGGCUUCCUCCAACUACCAU	94	2099-2119	AUGGUAGUUGGAGGAAG CCUCAA	180	2097-2119
AD-556738.1	UAUGACGGUACACUCUCCGU	95	672-692	ACGGAGAGUGUAACCGU CAUAGC	181	670-692
AD-557857.1	AACAACUCGAGCUUUGAGGCU	96	2084-2104	AGCCUCAAAAGCUCGAGU UGUUCC	182	2082-2104
AD-556726.1	UCUUUCCACUGCUAUGACGGU	97	660-680	ACCGUCAUAGCAGUGGA AAGAGA	183	658-680
AD-557495.1	AACAUGUGUCAAAGUCAAGU	98	1627-1647	ACUUGACUUUGAACACA UGUUGC	184	1625-1647
AD-557016.1	CCUUCAGGCUCCAUGAACAUU	99	1071-1091	AAUGUUCAUGGAGCCUG AAGGGU	185	1069-1091
AD-558074.1	GAGAAGUCGUUUCAUUCAAGU	100	2399-2419	ACUUGAAUGAAACGACU UCUCUU	186	2397-2419
AD-557604.1	GGGUACCGAUUACCACAAGCU	101	1736-1756	AGCUUGTGGUAAUCGGU ACCCUU	187	1734-1756
AD-557346.1	UGAUGGAUUGCACAACAUGGU	102	1442-1462	ACCAUGTUGUGCAAUCC AUCAGU	188	1440-1462
AD-557851.1	CGAGGGAACAACUCGAGCUUU	103	2078-2098	AAAGCUCGAGUUGUUCC CUCGGU	189	2076-2098
AD-557786.1	UUUAUGACUAUGACGUUGCCU	104	1993-2013	AGGCAACGUCAUAGUCA UAAAAU	190	1991-2013

Таблица 3

Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК-агентов фактора комплемента 3

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательность антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишени	SEQ ID NO:
AD-557072.1	csasaaaaGfuGfUfCfuagucaa cuuL96	191	asAfsguug(Agn)cuagacAfcUfuuuu gsgsc	277	GCCAAAAAGUGUCUA GUCAACUU	363
AD-558097.1	usasguggAfuGfUfCfugcaaa aacuL96	192	asGfsuuuu(Tgn)gcagacAfuCfcacu ascsu	278	AGUAGUGGAUGUCUG CAAAAACC	364
AD-557774.1	gsasauucCfuGfAfAfuuuuau gacuL96	193	asGfsucau(Agn)aaauucAfgGfaauu cscsu	279	AGGAAUCCUGAAUU UUAUGACU	365
AD-557070.1	gscscaaaAfaGfUfGfucuagu caauL96	194	asUfsugac(Tgn)agacacUfuUfuugg csusc	280	GAGCCAAAAAGUGUC UAGUCAAC	366
AD-558068.1	uscsacaaGfaGfAfAfgucguu ucauL96	195	asUfsgaaa(Cgn)gacuucUfcUfugug asasc	281	GUUCACAAGAGAAGU CGUUUCAU	367
AD-557068.1	gsasgccaAfaAfAfGfugucua gucuL96	196	asGfsacua(Ggn)acacuuUfuUfggcu cscsu	282	AGGAGCCAAAAAGUG UCUAGUCA	368
AD-556701.1	csusacuaCfaAfUfGfugagug auguL96	197	asCfsauca(Cgn)ucacauUfgUfagua gsgsg	283	CCCUACUACAAUGUG AGUGAUGA	369
AD-558076.1	gsasagucGfuUfUfCfauuca guuuL96	198	asAfsacuu(Ggn)aaugaaAfcGfacuu csusc	284	GAGAAGUCGUUUCAU UCAAGUUG	370
AD-558065.1	asgsuucacfaAfGfAfgaaguc guuuL96	199	asAfsacga(Cgn)uucucuUfgUfgaac usasu	285	AUAGUUCACAAGAGA AGUCGUUU	371

AD-557859.1	csasacucGfaGfCfUfuugagg cuuuL96	200	asAfsagcc(Tgn)caaagcUfcGfaguu gsusu	286	AACAACUCGAGCUUU GAGGCUUC	372
AD-558096.1	gsusagugGfaUfGfUfcugcaa aaauL96	201	asUfsuuuu(Ggn)cagacaUfcCfacua csusc	287	GAGUAGUGGAUGUCU GCAAAAAC	373
AD-557422.1	gsasggauUfaUfCfUfggaugu cuauL96	202	asUfsagac(Agn)uccagaUfaAfuccu cscsc	288	GGGAGGAUUAUCUGG AUGUCUAU	374
AD-556919.1	asgsacucCfuUfCfAfuguacg acauL96	203	asUfsgucg(Tgn)acaugaAfgGfaguc ususg	289	CAAGACUCCUUCAUG UACGACAC	375
AD-558069.1	csascaagAfgAfAfGfucguuu cauuL96	204	asAfsugaa(Agn)cgacuuCfuCfuugu gsasa	290	UUCACAAGAGAAGUC GUUUCAUU	376
AD-558063.1	asusaguuCfaCfAfAfgagaag ucguL96	205	asCfsgacu(Tgn)cucuugUfgAfacua uscsa	291	UGAUAGUUCACAAGA GAAGUCGU	377
AD-557069.1	asgsccaaAfaAfGfUfgucuag ucauL96	206	asUfsgacu(Agn)gacacuUfuUfuggc uscsc	292	GGAGCCAAAAAGUGU CUAGUCAA	378
AD-558225.1	usgsaauuAfaAfAfCfagcugc gacuL96	207	asGfsucgc(Agn)gcuguuUfuAfauuc asasu	293	AUUGAAUUAACAG CUGCGACA	379
AD-557853.1	asgsggaaCfaAfCfUfcgagcu uuguL96	208	asCfsaaag(Cgn)ucgaguUfgUfuccc uscsg	294	CGAGGGAACAACUCG AGCUUUGA	380
AD-558012.1	gsascaaaGfuCfAfAfggacauc ucuL96	209	asGfsagau(Ggn)uccuugAfcUfuugu csasu	295	AUGACAAAGUCAAGG ACAUCUCA	381
AD-558061.1	usgsauagUfuCfAfCfaagaga aguL96	210	asAfscuuc(Tgn)cuugugAfaCfuauc asasg	296	CUUGAUAGUUCACAA GAGAAGUC	382

AD-557079.1	usgsucuaGfuCfAfAfcuuaau ugauL96	211	asUfscaau(Tgn)aaguugAfcUfagac ascsu	297	AGUGUCUAGUCAACU UAAUUGAG	383
AD-558066.1	gsusucacAfaGfAfGfaagucg uuuuL96	212	asAfsaacg(Agn)cuucucUfuGfugaa csusa	298	UAGUUCACAAGAGAA GUCGUUUC	384
AD-557353.1	gsascccaAfuUfAfCfugucau ugauL96	213	asUfscaau(Ggn)acaguaAfuUfgggg cscsc	299	GGGACCCAAUUACUG UCAUUGAU	385
AD-557782.1	gsasauuuUfaUfGfAfcuauga cguuL96	214	asAfscguc(Agn)uagucaUfaAfaauu csasg	300	CUGAAUUUUAUGACU AUGACGUU	386
AD-556390.1	csusggagUfuUfCfAfgcuugg acauL96	215	asUfsgucc(Agn)agcugaAfaCfucca gsasc	301	GUCUGGAGUUUCAGC UUGGACAC	387
AD-557078.1	gsusgucuAfgUfCfAfacuuaa uuguL96	216	asCfsaauu(Agn)aguugaCfuAfgaca csusu	302	AAGUGUCUAGUCAAC UUAUUGA	388
AD-557475.1	ususccaaGfaAfAfGfacauga gcuL96	217	asGfscuca(Tgn)ugucuuUfcUfugga asgsc	303	GCUUCCAAGAAAGAC AAUGAGCA	389
AD-556734.1	csusgcuaUfgAfCfGfguuaca cucuL96	218	asGfsagug(Tgn)aaccguCfaUfagca gsusg	304	CACUGCUAUGACGGU UACACUCU	390
AD-557084.1	asgsucaaCfuUfAfAfuugaga agguL96	219	asCfscuuc(Tgn)caauuaAfgUfugac usasg	305	CUAGUCAACUAAAUU GAGAAGGU	391
AD-557498.1	asusguguUfcAfAfAfgucaag gauuL96	220	asAfsuccu(Tgn)gacuuuGfaAfcaca usgsu	306	ACAUGUGUCAAAGU CAAGGAUA	392
AD-556788.1	gsascagcGfaUfCfUfgugacaa cguL96	221	asCfsguug(Tgn)cacagaUfcGfcugu csusg	307	CAGACAGCGAUCUGU GACAACGG	393

AD-557067.1	gsgsagccAfaAfAfAfgugucu aguL96	222	asAfscuag(Agn)cacuuUfuGfgcuc csusg	308	CAGGAGCCAAAAAGU GUCUAGUC	394
AD-557852.1	gsasgggaAfcAfAfCfucgagc uuuL96	223	asAfsaagc(Tgn)cgaguuGfuUfccu csgsg	309	CCGAGGGAACAACUC GAGCUUUG	395
AD-556733.1	ascsugcuAfuGfAfCfpgguuac acuL96	224	asAfsgugu(Agn)accgucAfuAfgcag usgsg	310	CCACUGCUAUGACGG UUACACUC	396
AD-556725.1	csuscuuuCfcAfCfUfgcuau acguL96	225	asCfsguca(Tgn)agcaguGfgAfaaga gsasu	311	AUCUCUUUCCACUGCU AUGACGG	397
AD-557860.1	asascucgAfgCfUfUfugaggc uucL96	226	asGfsaagc(Cgn)ucaaagCfuCfagagu usgsu	312	ACAACUCGAGCUUUG AGGCUUCC	398
AD-556786.1	csasgacaGfcGfAfUfcuguga caauL96	227	asUfsuguc(Agn)cagaucGfcUfgucu gscsc	313	GGCAGACAGCGAUCU GUGACAAC	399
AD-556581.1	cscsuucuGfgCfUfUfcuaccc guauL96	228	asUfsacgg(Ggn)uagaagCfcAfgaag gsasc	314	GUCCUUCUGGCUUCU ACCCGUAC	400
AD-556963.1	ascscauaGfaAfGfGfagucga ugcuL96	229	asGfscauc(Ggn)acuccuUfcUfaugg uscsu	315	AGACCAUAGAAGGAG UCGAUGCU	401
AD-557450.1	ascscagUfgAfAfCfaucaaug cuL96	230	asAfsgcau(Tgn)gauguuCfaCfuugg ususc	316	GAACCAAGUGAACAU CAAUGCUU	402
AD-557204.1	usgsaaauCfaAfUfUfauagaag accuL96	231	asGfsgucu(Tgn)cauaauUfgAfuuu asusu	317	AAUGAAAUCAAUUAU GAAGACCA	403
AD-558062.1	gsasuaguUfcAfCfAfagagaa gucuL96	232	asGfsacuu(Cgn)ucuuguGfaAfcuau csasa	318	UUGAUAGUUCACAAG AGAAGUCG	404

AD-557602.1	asasggguAfcCfGfAfuuacca caauL96	233	asUfsugug(Ggn)uaaucgGfuAfcccu uscsc	319	GGAAGGGUACCGAUU ACCACAAG	405
AD-556917.1	csasagacUfcCfUfUfcauguac gauL96	234	asUfscgua(Cgn)augaagGfaGfucuu gsgsc	320	GCCAAGACUCCUUCAU GUACGAC	406
AD-557969.1	csusgacuCfgGfAfAfggaggu cuauL96	235	asUfsagac(Cgn)uccuucCfgAfguca gscsu	321	AGCUGACUCGGAAGG AGGUCUAC	407
AD-558064.1	usasguucAfcAfAfGfagaagu cguuL96	236	asAfscgac(Tgn)ucucuuGfuGfaacu asusc	322	GAUAGUUCACAAGAG AAGUCGUU	408
AD-558105.1	gsuscugcAfaAfAfAfccagaa gcguL96	237	asCfsgcuu(Cgn)ugguuuUfuGfcaga csasu	323	AUGUCUGCAAAAACC AGAAGCGG	409
AD-556791.1	asgscgauCfuGfUfGfacaacg gaguL96	238	asCfsuccg(Tgn)ugucacAfgAfucgc usgsu	324	ACAGCGAUCUGUGAC AACGGAGC	410
AD-557972.1	ascsucggAfaGfGfAfggucua cauuL96	239	asAfsugua(Ggn)accuccUfuCfcgag uscsa	325	UGACUCGGAAGGAGG UCUACAUC	411
AD-556920.1	gsascuccUfuCfAfUfguacga cacuL96	240	asGfsuguc(Ggn)uacaugAfaGfgagu csusu	326	AAGACUCCUUCAUGU ACGACACC	412
AD-558078.1	asgsucguUfuCfAfUfucaagu ugguL96	241	asCfscaac(Tgn)ugaaugAfaAfcgacu susc	327	GAAGUCGUUUCAUUC AAGUUGGU	413
AD-557861.1	ascsucgaGfcUfUfUfgaggu uccuL96	242	asGfsgaag(Cgn)cucaaaGfcUfcgag ususg	328	CAACUCGAGCUUUGA GGCUUCCU	414
AD-557856.1	gsasacaaCfuCfGfAfgcuuug agguL96	243	asCfscuca(Agn)agcucgAfgUfuguu cscsc	329	GGGAACAACUCGAGC UUUGAGGC	415

AD-557041.1	usgsgugcUfaGfAfUfggauca gacuL96	244	asGfsucug(Agn)uccaucUfaGfcacc asgsg	330	CCUGGUGCUAGAUGG AUCAGACA	416
AD-556874.1	gsusgucaGfgAfAfGfguggcu cuuuL96	245	asAfsagag(Cgn)caccuuCfcUfgacac sgsu	331	ACGUGUCAGGAAGGU GGCUCUUG	417
AD-557345.1	csusgaugGfaUfUfGfcacaaca uguL96	246	asCfsaugu(Tgn)gugcaaUfcCfauca gsusc	332	GACUGAUGGAUUGCA CAACAUGG	418
AD-557839.1	csasgacuAfuCfAfGfgcccau uuguL96	247	asCfsaaau(Ggn)ggccugAfuAfgucu gsgsc	333	GCCAGACUAUCAGGCC CAUUUGU	419
AD-556962.1	gsasccauAfgAfAfGfgagucg auguL96	248	asCfsaucg(Agn)cuccuuCfuAfuggu csusc	334	GAGACCAUAGAAGGA GUCGAUC	420
AD-557066.1	asgsgagcCfaAfAfAfaguguc uaguL96	249	asCfsuaga(Cgn)acuuuuUfgGfcucc usgsu	335	ACAGGAGCCAAAAAG UGUCUAGU	421
AD-556961.1	asgsaccaUfaGfAfAfggaguc gauuL96	250	asAfsucga(Cgn)uccuucUfaUfgguc uscsu	336	AGAGACCAUAGAAGG AGUCGAUG	422
AD-557226.1	asasguugAfaGfUfCfaggac uaauL96	251	asUfsuagu(Cgn)ccugacUfuCfaacu usgsu	337	ACAAGUUGAAGUCAG GGACUAC	423
AD-557865.1	gsasgcuuUfgAfGfGfcuuccu ccauL96	252	asUfsggag(Ggn)aagccuCfaAfagcu csgsa	338	UCGAGCUUUGAGGCU UCCUCCAA	424
AD-557209.1	uscsaaauAfuGfAfAfgaccac aaguL96	253	asCfsuugu(Ggn)gucuucAfuAfauug asusu	339	AAUCAAUUAUGAAGA CCACAAGU	425
AD-556918.1	asasgacuCfcUfUfCfauguacg acuL96	254	asGfsucgu(Agn)caugaaGfgAfgucu usgsg	340	CCAAGACUCCUUCAUG UACGACA	426

AD-557868.1	csusuugaGfgCfUfUfccucca acuuL96	255	asAfsuguu(Ggn)aggaagCfcUfcaaa gscsu	341	AGCUUUGAGGCUUCC UCCAACUA	427
AD-557873.1	asgsgcuuCfcUfCfCfaacuacc acuL96	256	asGfsuggu(Agn)guuggaGfgAfagcc uscsa	342	UGAGGCUUCCUCCAAC UACCACU	428
AD-556787.1	asgsacagCfgAfUfCfugugac aacuL96	257	asGfsuugu(Cgn)acagauCfgCfuguc usgsc	343	GCAGACAGCGAUCUG UGACAACG	429
AD-558004.1	csasggcuAfuGfAfCfaaaguc aaguL96	258	asCfsuuga(Cgn)uuugucAfuAfgccu gsgsg	344	CCCAGGCUAUGACAA AGUCAAGG	430
AD-557867.1	gscsuuugAfgGfCfUfuccucc aacuL96	259	asGfsuugg(Agn)ggaagcCfuCfaaag csusc	345	GAGCUUUGAGGCUUC CUCCAACU	431
AD-557788.1	usasugacUfaUfGfAfcguugc ccuuL96	260	asAfsgggc(Agn)acgucaUfaGfucan asasa	346	UUUAUGACUAUGACG UUGCCCUG	432
AD-558106.1	uscsugcaAfaAfAfCfcagaagc ggul96	261	asCfscgcu(Tgn)cugguuUfuUfgcag ascsa	347	UGUCUGCAAAAACCA GAAGCGGC	433
AD-556724.1	uscsucuuUfcCfAfCfugcuau gacuL96	262	asGfsucan(Agn)gcagugGfaAfagag asusc	348	GAUCUCUUUCCACUGC UAUGACG	434
AD-556739.1	asusgacgGfuUfAfCfacucuc cgguL96	263	asCfscgga(Ggn)aguguaAfcCfguca usasg	349	CUAUGACGGUACAC UCUCCGGG	435
AD-557417.1	csasagggAfgGfAfUfuaucug gauuL96	264	asAfsucca(Ggn)auaaucCfuCfccuu gsgsg	350	CCCAAGGGAGGAUUA UCUGGAUG	436
AD-556790.1	csasgcgaUfcUfGfUfgacaacg gauL96	265	asUfscggu(Tgn)gucacaGfaUfcgcu gsusc	351	GACAGCGAUCUGUGA CAACGGAG	437

AD-557872.1	gsasggcuUfcCfUfCfcaacuac cauL96	266	asUfsggua(Ggn)uuggagGfaAfgccu csasa	352	UUGAGGCUUCCUCCA ACUACCAC	438
AD-556738.1	usasugacGfgUfUfAfcacucu ccguL96	267	asCfsggag(Agn)guguaaCfcGfuc <u>au</u> asgsc	353	GCUAUGACGGUUACA CUCUCCGG	439
AD-557857.1	asascaacUfcGfAfGfcuuuga ggcuL96	268	asGfscuc(Agn)aagcucGfaGfuugu uscsc	354	GGAACAACUCGAGCU UUGAGGCU	440
AD-556726.1	uscsuuucCfaCfUfGfcuaua cgguL96	269	asCfscguc(Agn)uagcagUfgGfaaag asgsa	355	UCUCUUUCCACUGCUA UGACGGU	441
AD-557495.1	asascaugUfgUfUfCfaaaguca aguL96	270	asCfsuuga(Cgn)uuugaaCfaCfaugu usgsc	356	GCAACAUGUGUUCAA AGUCAAGG	442
AD-557016.1	cscsuucaGfgCfUfCfcaugaac auuL96	271	asAfsuguu(Cgn)auggagCfcUfgaag gsgsu	357	ACCCUUCAGGCUCCAU GAACAUC	443
AD-558074.1	gsasgaagUfcGfUfUfuc <u>auuc</u> aaguL96	272	asCfsuuga(Agn)ugaaacGfaCfuucu csusu	358	AAGAGAAGUCGUUUC AUUCAAGU	444
AD-557604.1	gsgsguacCfgAfUfUfaccacaa gcuL96	273	asGfscuug(Tgn)gguaauCfgGfuacc csusu	359	AAGGGUACCGAUUAC CACAAGCA	445
AD-557346.1	usgsauggAfuUfGfCfacaaca ugguL96	274	asCfscaug(Tgn)ugugcaAfuCfcauc asgsu	360	ACUGAUGGAUUGCAC AACAUGGG	446
AD-557851.1	csgsagggAfaCfAfAfcucgag cuuL96	275	asAfsagcu(Cgn)gaguugUfuCfccuc gsgsu	361	ACCGAGGGAACAACU CGAGCUUU	447
AD-557786.1	ususaugAfcUfAfUfgacguu gccuL96	276	asGfsgcaa(Cgn)gucauaGfuCfauaa asasu	362	AUUUUAUGACUAUGA CGUUGCCC	448

Таблица 4

Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК-агентов фактора комплемента 3

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон (NM_001710.5)	Последовательности антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон (NM_001710.5)
AD-558860.1	UGCCAAGACUCCUUCA UGUAU	449	930-950	AUACAUGAAGGAGUCUUGG CAGG	520	928-950
AD-560018.1	AAGAGAAGUCGUUUC AUUCAU	450	2397-2417	AUGAAUGAAACGACUUCUC UUGU	521	2395-2417
AD-560019.1	AGAGAAGUCGUUUCA UUCAAU	451	2398-2418	AUUGAAUGAAACGACUUCU CUUG	522	2396-2418
AD-559160.1	UAUGAAGACCACAAG UUGAAU	452	1308-1328	AUUCAACUUGUGGUCUUCA UAAU	523	1306-1328
AD-559921.1	CGGAAGGAGGUCUAC AUCAAU	453	2202-2222	AUUGAUGUAGACCUCCUUC CGAG	524	2200-2222
AD-559755.1	AUCAAGCUCAAGAAU AAGCUU	454	2016-2036	AAGCUUAUUCUUGAGCUUG AUCA	525	2014-2036
AD-560017.1	CAAGAGAAGUCGUUU CAUUCU	455	2396-2416	AGAAUGAAACGACUUCUCU UGUG	526	2394-2416
AD-559614.1	CUGUGGUGUCUGAGU ACUUUU	456	1819-1839	AAAAGUACUCAGACACCAC AGCC	527	1817-1839
AD-559435.1	AUGAGCAACAUGUGU UCAAAU	457	1621-1641	AUUUGAACACAUGUUGCUC AUUG	528	1619-1641

AD-560016.1	ACAAGAGAAGUCGUU UCAUUU	458	2395-2415	AAAUGAAACGACUUCUCUU GUGA	529	2393-2415
AD-559451.1	CAAAGUCAAGGAUUAU GGAAAU	459	1637-1657	AUUUCCAUAUCCUUGACUU UGAA	530	1635-1657
AD-559617.1	UGGUGUCUGAGUACU UUGUGU	460	1822-1842	ACACAAAGUACUCAGACACC ACA	531	1820-1842
AD-560021.1	AGAAGUCGUUUCAUU CAAGUU	461	2400-2420	AACUUGAAUGAAACGACUU CUCU	532	2398-2420
AD-559449.1	UUCAAAGUCAAGGAU AUGGAU	462	1635-1655	AUCCAUAUCCUUGACUUUG AACA	533	1633-1655
AD-559450.1	UCAAAGUCAAGGAUA UGGAAU	463	1636-1656	AUCCAUAUCCUUGACUUU GAAC	534	1634-1656
AD-559925.1	AGGAGGUCUACAUCA AGAAUU	464	2206-2226	AAUUCUUGAUGUAGACCUC CUUC	535	2204-2226
AD-559440.1	CAACAUGUGUUCAAA GUCAAU	465	1626-1646	AUUGACUUUGAACACAUGU UGCU	536	1624-1646
AD-559788.1	ACUAUCAGGCCCAUU UGUCUU	466	2049-2069	AAGACAAAUGGGCCUGAUA GUCU	537	2047-2069
AD-559437.1	GAGCAACAUGUGUUC AAAGUU	467	1623-1643	AACUUUGAACACAUGUUGC UCAU	538	1621-1643
AD-559369.1	AGGAUUAUCUGGAUG UCUAUU	468	1537-1557	AAUAGACAUCCAGAUAAUC CUCC	539	1535-1557

AD- 559446.1	GUGUCAAAGUCAAG GAUAUU	469	1632-1652	AAUAUCCUUGACUUUGAAC ACAU	540	1630-1652
AD- 559924.1	AAGGAGGUCUACAUC AAGAAU	470	2205-2225	AUUCUUGAUGUAGACCUCC UUCC	541	2203-2225
AD- 558965.1	UCAGGCUCCAUGAAC AUCUAU	471	1074-1094	AUAGAUGUUCAUGGAGCCU GAAG	542	1072-1094
AD- 560045.1	GUGGAUGUCUGCAAA AACCAU	472	2442-2462	AUGGUUUUUGCAGACAUC ACUA	543	2440-2462
AD- 559946.1	GUGAGAGAGAUGCUC AAUAUU	473	2245-2265	AAUAUUGAGCAUCUCUCUC ACAG	544	2243-2265
AD- 558697.1	AUCGCACCUGCCAAGU GAAUU	474	703-723	AAUUCACUUGGCAGGUGCG AUUG	545	701-723
AD- 559008.1	UCACAGGAGCCAAAA AGUGUU	475	1135-1155	AACACUUUUUGGCUCCUGU GAAG	546	1133-1155
AD- 559357.1	AAAACCCAAGGGAGG AUUAUU	476	1525-1545	AAUAAUCCUCCCUUGGGUU UUUG	547	1523-1545
AD- 559020.1	AAAAGUGUCUAGUCA ACUUAU	477	1147-1167	AUAAGUUGACUAGACACUU UUUG	548	1145-1167
AD- 559143.1	CAGCUCAAUGAAAUC AAUUAU	478	1290-1310	AUAAUUGAUUUCAUUGAGC UGCU	549	1288-1310
AD- 559374.1	UAUCUGGAUGUCUAU GUGUUU	479	1542-1562	AAACACAUAGACAUCCAGA UAAU	550	1540-1562

AD-560161.1	GGCGUGGGAUUGAAU UAAAAU	480	2594-2614	AUUUUAUUCAAUCCCACG CCCC	551	2592-2614
AD-559947.1	UGAGAGAGAUGCUC AUAUGU	481	2246-2266	ACAUUUUGAGCAUCUCUCU CACA	552	2244-2266
AD-559616.1	GUGGUGUCUGAGUAC UUUGUU	482	1821-1841	AACAAAGUACUCAGACACC ACAG	553	1819-1841
AD-559142.1	GCAGCUCAAUGAAAU CAAUUU	483	1289-1309	AAAUUGAUUUCAUUGAGCU GCUU	554	1287-1309
AD-558639.1	CGGUCUCCCUACUACA AUGUU	484	627-647	AACAUUGUAGUAGGGAGAC CGGG	555	625-647
AD-560166.1	GGGAUUGAAUAAAA CAGCUU	485	2599-2619	AAGCUGUUUAAUUCAAUC CCAC	556	2597-2619
AD-559359.1	AACCCAAGGGAGGAU UAUCUU	486	1527-1547	AAGAUAAUCCUCCCUUGGG UUUU	557	1525-1547
AD-558657.1	GUGAGUGAUGAGAUC UCUUUU	487	645-665	AAAAGAGAUCUCAUCACUC ACAU	558	643-665
AD-559442.1	ACAUGUGUCAAAGU CAAGGU	488	1628-1648	ACCUUGACUUUGAACACAU GUUG	559	1626-1648
AD-559023.1	AGUGUCUAGUCAACU UAAUUU	489	1150-1170	AAAUUAAGUUGACUAGACA CUUU	560	1148-1170
AD-560160.1	GGGCGUGGGAUUGAA UUAAAAU	490	2593-2613	AUUUAAUCAAUCCCACGCC CCU	561	2591-2613

AD- 559398.1	CAAGUGAACAUCAAU GCUUUU	491	1584-1604	AAAAGCAUUGAUGUUCACU UGGU	562	1582-1604
AD- 559722.1	AUUCCUGAAUUUUUAU GACUAU	492	1983-2003	AUAGUCAUAAAAUUCAGGA AUUC	563	1981-2003
AD- 559146.1	CUCAAUGAAAUCAAU UAUGAU	493	1293-1313	AUCAUAAUUGAUUUCAUUG AGCU	564	1291-1313
AD- 558267.1	GGAUGUUCCGGGAAA GUGAUU	494	55-75	AAUCACUUUCCCGGAACAUC CAA	565	53-75
AD- 559074.1	GAUAUGGUCUAGUGA CAUAUU	495	1201-1221	AAUAUGUCACUAGACCAUA UCUU	566	1199-1221
AD- 560162.1	GCGUGGGAUUGAAUU AAAACU	496	2595-2615	AGUUUUAAUUCAAUCCCAC GCCC	567	2593-2615
AD- 559021.1	AAAGUGUCUAGUCA CUUAAU	497	1148-1168	AUUAAGUUGACUAGACACU UUUU	568	1146-1168
AD- 559144.1	AGCUCAAUGAAAUCA AUUAUU	498	1291-1311	AAUAAUUGAUUUCAUUGAG CUGC	569	1289-1311
AD- 559147.1	CAAUGAAAUCAAUUA UGAAGU	499	1295-1315	ACUUCAUAAUUGAUUUCAU UGAG	570	1293-1315
AD- 560164.1	GUGGGAUUGAAUUAA AACAGU	500	2597-2617	ACUGUUUUAAUUCAAUCCC ACGC	571	2595-2617
AD- 559714.1	AAGCAGGAAUUCCUG AAUUUU	501	1975-1995	AAA AUUCAGGAAUUCCUGC UUCU	572	1973-1995

AD- 560165.1	UGGGAUUGAAUAAA ACAGCU	502	2598-2618	AGCUGUUUAAUUCAAUCC CACG	573	2596-2618
AD- 559300.1	ACCCAAUUACUGUCA UUGAUU	503	1468-1488	AAUCA AUGACAGUAAUUGG GUCC	574	1466-1488
AD- 559866.1	CCCUGCACAGGAUAUC AAAGU	504	2147-2167	ACUUUGAUAUCCUGUGCAG GGAG	575	2145-2167
AD- 559302.1	CCAAUUACUGUCAUU GAUGAU	505	1470-1490	AUCAUCA AUGACAGUAAUU GGGU	576	1468-1490
AD- 560163.1	CGUGGGAUUGAAUUA AAACAU	506	2596-2616	AUGUUUAAUUCAAUCCCA CGCC	577	2594-2616
AD- 559718.1	AGGAAUUCCUGAAUU UUAUGU	507	1979-1999	ACAUA AAAUUCAGGAAUUC CUGC	578	1977-1999
AD- 559721.1	AAUUCCUGAAUUUUA UGACUU	508	1982-2002	AAGUCAU AAAUUCAGGAA UUCC	579	1980-2002
AD- 559026.1	GUCUAGUCAACUUA UUGAGU	509	1153-1173	ACUCAAUUAAGUUGACUAG ACAC	580	1151-1173
AD- 559719.1	GGAAUUCCUGAAUUU UAUGAU	510	1980-2000	AUCAU AAAUUCAGGAAU CCUG	581	1978-2000
AD- 559060.1	UGGUGUGAAGCCAAG AUAUGU	511	1187-1207	ACAUAUCUUGGCUUCACACC AUA	582	1185-1207
AD- 559864.1	CUCCCUGCACAGGAUA UCAAU	512	2145-2165	AUUGAUAUCCUGUGCAGGG AGCA	583	2143-2165

AD-559059.1	AUGGUGUGAAGCCAA GAUAUU	513	1186-1206	AAUAUCUUGGCUUCACACC AUAA	584	1184-1206
AD-559865.1	UCCCUGCACAGGAUA UCAAAU	514	2146-2166	AUUUGAUAUCCUGUGCAGG GAGC	585	2144-2166
AD-559148.1	AAUGAAAUCAAUUAU GAAGAU	515	1296-1316	AUCUUCAUAAUUGAUUUA UUGA	586	1294-1316
AD-559375.1	AUCUGGAUGUCUAUG UGUUUU	516	1543-1563	AAAACACAUAAGACAUCAG AUAA	587	1541-1563
AD-559393.1	UGAACCAAGUGAACA UCAAUU	517	1579-1599	AAUUGAUGUUCACUUGGUU CACC	588	1577-1599
AD-559717.1	CAGGAAUUCUGAAU UUUAUU	518	1978-1998	AAUAAAAUUCAGGAAUUC UGCU	589	1976-1998
AD-559392.1	GUGAACCAAGUGAAC AUCAAU	519	1578-1598	AUUGAUGUUCACUUGGUUC ACCA	590	1576-1598

Таблица 5

Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК-агентов фактора комплемента 3

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательности антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишени	SEQ ID NO:
AD-558860.1	usgsccaaGfaCfUfCfcuucauguauL 96	591	asUfsacaUfgAfAfggagUfcUfugg casgsg	662	CCUGCCAAGACUCCUU CAUGUAC	733
AD-560018.1	asasgagaAfgUfCfGfuucuucauL 96	592	asUfsgaaUfgAfAfacgaCfuUfcuc uusgsu	663	ACAAGAGAAGUCGUUU CAUUCAA	734

AD-560019.1	asgsagaaGfuCfGfUfuucaucaaL 96	593	asUfsugaAfuGfAfaacgAfcUfucu cususg	664	CAAGAGAAGUCGUUUC AUUCAAG	735
AD-559160.1	usasugaaGfaCfCfAfcaaguugaauL 96	594	asUfsucaAfcUfUfguggUfcUfuca uasasu	665	AUUAUGAAGACCACAA GUUGAAG	736
AD-559921.1	csgsgaagGfaGfGfUfcuacaucaaL 96	595	asUfsugaUfgUfAfgaccUfcCfuuc cgsasg	666	CUCGGAAGGAGGUCUA CAUCAAG	737
AD-559755.1	asuscaagCfuCfAfAfgaauaagcuuL 96	596	asAfsgcuUfaUfUfcuugAfgCfuug auscsa	667	UGAUCAAGCUCAAGAA UAAGCUG	738
AD-560017.1	csasagagAfaGfUfCfguucauucuL 96	597	asGfsaauGfaAfAfcgacUfuCfucu ugsusg	668	CACAAGAGAAGUCGUU UCAUUC	739
AD-559614.1	csusguggUfgUfCfUfgaguacuuuu L96	598	asAfsaagUfaCfUfcagaCfaCfcaca gscsc	669	GGCUGUGGUGUCUGAG UACUUUG	740
AD-559435.1	asusgagcAfaCfAfUfguguucaaauL 96	599	asUfsuugAfaCfAfcaugUfuGfcuc aususg	670	CAAUGAGCAACAUGUG UUCAAG	741
AD-560016.1	ascsaagaGfaAfGfUfcguucauuuL 96	600	asAfsaugAfaAfCfgacuUfcUfcuu gusgsa	671	UCACAAGAGAAGUCGU UUCAUUC	742
AD-559451.1	csasaaguCfaAfGfGfauauggaaauL 96	601	asUfsuucCfaUfAfuccuUfgAfcuu ugsasa	672	UUCAAAGUCAAGGAUA UGGAAA	743
AD-559617.1	usgsguguCfuGfAfGfuacuuugugu L96	602	asCfsacaAfaGfUfacucAfgAfcac cascsa	673	UGUGGUGUCUGAGUAC UUUGUGC	744
AD-560021.1	asgsaaguCfgUfUfUfcuucaaguL 96	603	asAfscuuGfaAfUfgaaaCfgAfcuu cuscsu	674	AGAGAAGUCGUUUCAU UCAAGUU	745

AD- 559449.1	ususcaaaGfuCfAfAfggauauggauL 96	604	asUfscCaUfaUfCfcuugAfcUfuug aascsa	675	UGUUCAAAGUCAAGGA UAUGGAA	746
AD- 559450.1	uscsaaagUfcAfAfGfggauauggauL 96	605	asUfsuccAfuAfUfccuuGfaCfuuu gasasc	676	GUUCAAAGUCAAGGAU AUGGAAA	747
AD- 559925.1	asgsgaggUfcUfAfCfaucaagaauuL 96	606	asAfsuucUfuGfAfuguaGfaCfcuc cususc	677	GAAGGAGGUCUACAUC AAGAAUG	748
AD- 559440.1	csasacauGfuGfUfUfcaaagucaauL 96	607	asUfsugaCfuUfUfgaacAfcAfugu ugscsu	678	AGCAACAUGUGUUCAA AGUCAAG	749
AD- 559788.1	ascsuauCfGfCfCfcauuugucuuL 96	608	asAfsgacAfaAfUfgggcCfuGfaua guscsu	679	AGACUAUCAGGCCCAU UUGUCUC	750
AD- 559437.1	gsasgcaaCfaUfGfUfgucaaaguL 96	609	asAfscuuUfgAfAfcacaUfgUfugc ucasu	680	AUGAGCAACAUGUGUU CAAAGUC	751
AD- 559369.1	asgsgauuAfuCfUfGfgaugucuaau L96	610	asAfsuagAfcAfUfccagAfuAfauc cuscsc	681	GGAGGAUUAUCUGGAU GUCUAUG	752
AD- 559446.1	gsusguucAfaAfGfUfcaaggauauuL 96	611	asAfsuauCfcUfUfgacuUfuGfaac acsasu	682	AUGUGUUCAAAGUCAA GGAUAUG	753
AD- 559924.1	asasggagGfuCfUfAfcaucaagaauL 96	612	asUfsucuUfgAfUfguagAfcCfucc uuscsc	683	GGAAGGAGGUCUACAU CAAGAAU	754
AD- 558965.1	uscsaggcUfcCfAfUfgaacaucauL 96	613	asUfsagaUfgUfUfcaugGfaGfccu gasasg	684	CUUCAGGCUCCAUGAA CAUCUAC	755
AD- 560045.1	gsusggauGfuCfUfGfcaaaaaccauL 96	614	asUfsgguUfuUfUfgcagAfcAfucc acsusa	685	UAGUGGAUGUCUGCAA AAACCAG	756

AD- 559946.1	gsusgagaGfaGfAfUfgcucauuuuL 96	615	asAfsuauUfgAfGfcaucUfcUfcuc acsasg	686	CUGUGAGAGAGAUGCU CAAUAUG	757
AD- 558697.1	asuscgcaCfcUfGfCfcaagugauuuL 96	616	asAfsuucAfcUfUfggcaGfgUfgcg aususg	687	CAAUCGCACCUGCCAA GUGAAUG	758
AD- 559008.1	uscsacagGfaGfCfCfaaaaaguguuL 96	617	asAfscacUfuUfUfuggcUfcCfugu gasasg	688	CUUCACAGGAGCCAAA AAGUGUC	759
AD- 559357.1	asasaaccCfaAfGfGfgaggauuuuuL 96	618	asAfsuaaUfcCfUfcccuUfgGfguu uususg	689	CAAAAACCCAAGGGAG GAUUAUC	760
AD- 559020.1	asasaaguGfuCfUfAfgucaacuauL 96	619	asUfsaagUfuGfAfcuagAfcAfcuu uususg	690	CAAAAAGUGUCUAGUC AACUUA	761
AD- 559143.1	csasgcucAfaUfGfAfaaucauuuuL 96	620	asUfsaauUfgAfUfuucaUfuGfagc ugscsu	691	AGCAGCUCAAUGAAAU CAAUUAU	762
AD- 559374.1	usasucugGfaUfGfUfcuauguguuu L96	621	asAfsacaCfaUfAfgacaUfcCfaga uasasu	692	AUUAUCUGGAUGUCUA UGUGUUU	763
AD- 560161.1	gsgscgugGfgAfUfUfgaauuuuuuuL 96	622	asUfsuuuAfaUfUfcaauCfcCfacg ccscsc	693	GGGGCGUGGGAUUGAA UUAAAAC	764
AD- 559947.1	usgsagagAfgAfUfGfcucaauauguL 96	623	asCfsauaUfuGfAfgcauCfuCfucu cascsa	694	UGUGAGAGAGAUGCUC AAUAUGC	765
AD- 559616.1	gsusggugUfcUfGfAfguacuuuguu L96	624	asAfscaaAfgUfAfcucaGfaCfacc acsasg	695	CUGUGGUGUCUGAGUA CUUUGUG	766
AD- 559142.1	gscsagcuCfaAfUfGfaaucauuuuL 96	625	asAfsauuGfaUfUfucuuUfgAfgcu gcsusu	696	AAGCAGCUCAAUGAAA UCAAUUA	767

AD-558639.1	csgsgucuCfcCfUfAfcuacauguuL 96	626	asAfscauUfgUfAfguagGfgAfgac cgsgsg	697	CCCGGUCUCCCUACUAC AAUGUG	768
AD-560166.1	gsgsgauuGfaAfUfUfaaacagcuuL 96	627	asAfsgcuGfuUfUfuaauUfcAfauc ccsasc	698	GUGGGAUUGAAUUAAA ACAGCUG	769
AD-559359.1	asascccaAfgGfGfAfggauuauuuL 96	628	asAfsgauAfaUfCfcuccCfuUfggg uususu	699	AAAACCCAAGGGAGGA UUAUCUG	770
AD-558657.1	gsusgaguGfaUfGfAfgaucucuuuu L96	629	asAfsaagAfgAfUfcucaUfcAfcuc acsasu	700	AUGUGAGUGAUGAGAU CUCUUUC	771
AD-559442.1	ascsauguGfuUfCfAfaagucaagguL 96	630	asCfscuuGfaCfUfuugaAfcAfcu gususg	701	CAACAUGUGUUCAAAG UCAAGGA	772
AD-559023.1	asgsugucUfaGfUfCfaacuuaauuuL 96	631	asAfsauuAfaGfUfugacUfaGfaca cususu	702	AAAGUGUCUAGUCAAC UUAUUG	773
AD-560160.1	gsgsgcguGfgGfAfUfugaauuaau L96	632	asUfsuuaAfuUfCfaucCfcAfcgc ccscsu	703	AGGGGCGUGGGGAUUGA AUUAAAA	774
AD-559398.1	csasagugAfaCfAfUfcaaugcuuuuL 96	633	asAfsaagCfaUfUfgaugUfuCfacu ugsgsu	704	ACCAAGUGAACAUCAA UGC UUUG	775
AD-559722.1	asusuccuGfaAfUfUfuuaugacuauL 96	634	asUfsaguCfaUfAfaauUfcAfgga aususc	705	GAAUUCCUGAAUUUUA UGACUAU	776
AD-559146.1	csuscaauGfaAfAfUfcaauuaugauL 96	635	asUfscauAfaUfUfgauuUfcAfuug agscsu	706	AGCUCAAUGAAAUCAA UUAUGAA	777
AD-558267.1	gsgsauguUfcCfGfGfgaaagugauuL 96	636	asAfsucaCfuUfUfcccGfaAfcu ccsasa	707	UUGGAUGUCCGGGAA AGUGAUG	778

AD- 559074.1	gsasuaugGfuCfUfAfgugacauuuL 96	637	asAfsuauGfuCfAfcuagAfcCfaua ucsusu	708	AAGAU AUGGUCUAGUG ACAU AUG	779
AD- 560162.1	gscsguggGfaUfUfGfaauuaaaacuL 96	638	asGfsuuuUfaAfUfucaaUfcCfcac gscscsc	709	GGGCGUGGGAUUGAAU UAAAACA	780
AD- 559021.1	asasagugUfcUfAfGfucaacuuaauL 96	639	asUfsuaaGfuUfGfacuaGfaCfacu uususu	710	AAAAAGUGUCUAGUCA ACUUA AU	781
AD- 559144.1	asgscucaAfuGfAfAfaucuuuuuL 96	640	asAfsuaaUfuGfAfuuuuAfuUfgag cusgsc	711	GCAGCUCAAUGAAAUC AAUUAUG	782
AD- 559147.1	csasaugaAfaUfCfAfauuaugaaguL 96	641	asCfsuucAfuAfAfuugaUfuUfcu ugsasg	712	CUCAAUGAAAUCAAUU AUGAAGA	783
AD- 560164.1	gsusgggaUfuGfAfAfuuaaaacaguL 96	642	asCfsuguUfuUfAfauuuAfaUfccc acsgsc	713	GCGUGGGAUUGAAUUA AAACAGC	784
AD- 559714.1	asasgcagGfaAfUfUfccugaauuuuL 96	643	asAfsaaUfcAfGfgaaUfcCfugc uuscsu	714	AGAAGCAGGAAUUCCU GAAUUUU	785
AD- 560165.1	usgsggauUfgAfAfUfuuaaaacagcuL 96	644	asGfscugUfuUfUfaauuCfaAfucc cascsg	715	CGUGGGAUUGAAUUA AACAGCU	786
AD- 559300.1	ascsccaaUfuAfCfUfgucauugauuL 96	645	asAfsucaAfuGfAfcaguAfaUfugg guscsc	716	GGACCCAAUUACUGUC AUUGAUG	787
AD- 559866.1	cscscugcAfcAfGfGfauucaaaaguL 96	646	asCfsuuuGfaUfAfuccuGfuGfcag ggsasg	717	CUCCCUGCACAGGAUA UCAAGC	788
AD- 559302.1	cscsaauuAfcUfGfUfcuugaugauL 96	647	asUfscuAfcAfUfgacaGfuAfauu ggsgsu	718	ACCCAAUUACUGUCAU UGAUGAG	789

AD-560163.1	csgsugggAfuUfGfAfaauaaaacauL96	648	asUfsguuUfuAfAfuucaAfuCfcca cgscsc	719	GGCGUGGGAUUGAAUU AAAACAG	790
AD-559718.1	asgsgaauUfcCfUfGfaauuuuanguL96	649	asCfsauaAfaAfUfucagGfaAfuuc cusgsc	720	GCAGGAAUUCCUGAAU UUUAUGA	791
AD-559721.1	asasuuccUfgAfAfUfuuuuagacuuL96	650	asAfsgucAfuAfAfaauCfaGfgaa uuscs	721	GGAAUUCCUGAAUUUU AUGACUA	792
AD-559026.1	gsuscuagUfcAfAfCfuuaauugaguL96	651	asCfsucaAfuUfAfaguuGfaCfuag acsasc	722	GUGUCUAGUCAACUUA AUUGAGA	793
AD-559719.1	gsgsaauuCfcUfGfAfauuuuanguL96	652	asUfscAuAfaAfAfuucaGfgAfaau ccsusg	723	CAGGAAUUCCUGAAUU UUAUGAC	794
AD-559060.1	usgsguguGfaAfGfCfcaagauanguL96	653	asCfsauaUfcUfUfggcuUfcAfcac casusa	724	UAUGGUGUGAAGCCAA GAUAUGG	795
AD-559864.1	csusccuGfcAfCfAfggauaucaauL96	654	asUfsugaUfaUfCfcuguGfcAfggg agscsa	725	UGCUCUCCUGCACAGGA UAUCAA	796
AD-559059.1	asusggugUfgAfAfGfccaagauauuL96	655	asAfsuauCfuUfGfgcuuCfaCfacc ausasa	726	UUAUGGUGUGAAGCCA AGAU AUG	797
AD-559865.1	uscscugCfaCfAfGfgauaucaauL96	656	asUfsuugAfuAfUfccugUfgCfagg gasgsc	727	GCUCUCCUGCACAGGAU AUCAAAG	798
AD-559148.1	asasugaaAfuCfAfAfuuaugaagauL96	657	asUfscuuCfaUfAfaugAfuUfuca uusgsa	728	UCA AUGAAUCAAUUA UGAAGAC	799
AD-559375.1	asuscuggAfuGfUfCfuauguguuuuL96	658	asAfsaacAfcAfUfagacAfuCfcag ausasa	729	UUAUCUGGAUGUCUAU GUGUUUG	800

AD-559393.1	usgsaaccAfaGfUfGfaacaucauuL 96	659	asAfsuugAfuGfUfucacUfuGfgu ucascsc	730	GGUGAACCAAGUGAAC AUCAAUG	801
AD-559717.1	csasggaaUfuCfCfUfgaauuuuuuuL 96	660	asAfsuaaAfaUfUfcaggAfaUfucc ugscsu	731	AGCAGGAAUCCUGAA UUUUAUG	802
AD-559392.1	gsusgaacCfaAfGfUfgaacaucaauL 96	661	asUfsugaUfgUfUfcacuUfgGfuuc acscsa	732	UGGUGAACCAAGUGAA CAUCAAU	803

Таблица 6

Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК-агентов фактора комплемента 3

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Название источника смысловой цепи	Последовательности антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Название источника антисмысловой цепи
AD-560969.1	UGCCAAGAUUCCUU CAUGUAU	804	NM_008198.2_1051-1071_s	AUACAUGAAGGAAUC UUGGCAGG	849	NM_008198.2_1049-1071_as
AD-561537.1	AUGUGUUUAAAGU CAAGGAUU	805	NM_008198.2_1751-1771_A21U_s	AAUCCUTGACUUUAA ACACAUGA	850	NM_008198.2_1749-1771_U1A_as
AD-562262.1	AAAGAUGAGGAUU UGGGUUUU	806	NM_008198.2_2668-2688_s	AAAACCCAAAUCCUC AUCUUUGA	851	NM_008198.2_2666-2688_as
AD-561960.1	AAGGAUGUCAAGC UCUGUUU	807	NM_008198.2_2275-2295_s	AAACAGAGCUUUGAC AUCCUUCA	852	NM_008198.2_2273-2295_as
AD-561580.1	CUACCAAUGAUUG AUGAAAU	808	NM_008198.2_1794-1814_C21U_s	AUUUCATCAAUCAUU UGGUAGAA	853	NM_008198.2_1792-1814_G1A_as
AD-561254.1	AUCAGUUAUGAAG ACCACAAU	809	NM_008198.2_1423-1443_G21U_s	AUUGUGGUCUUCAUA ACUGAUUU	854	NM_008198.2_1421-1443_C1A_as

AD-561578.1	UUCUACCAAUGAU UGAUGAU	810	NM_008198.2_1792- 1812_A21U_s	AUCAUCAUCAUUUG GUAGAAAA	855	NM_008198.2_1790- 1812_U1A_as
AD-561538.1	UGUGUUUAAAGUC AAGGAUUAU	811	NM_008198.2_1752- 1772_s	AUAUCCTUGACUUUA AACACAUG	856	NM_008198.2_1750- 1772_as
AD-561252.1	AAAUCAGUUAUGA AGACCACU	812	NM_008198.2_1421- 1441_A21U_s	AGUGGUCUUCAUAAC UGAUUUGG	857	NM_008198.2_1419- 1441_U1A_as
AD-561963.1	GAUGUCAAGCUCU GUUUGUU	813	NM_008198.2_2278- 2298_A21U_s	AACAAACAGAGCUUU GACAUCCU	858	NM_008198.2_2276- 2298_U1A_as
AD-562027.1	CCAGUUGUGAGAGA GAUGCUU	814	NM_008198.2_2360- 2380_A21U_s	AAGCAUCUCUCUCAC AACUGGCU	859	NM_008198.2_2358- 2380_U1A_as
AD-561653.1	AGCCAAGAUCUCAG UCACUCU	815	NM_008198.2_1887- 1907_G21U_s	AGAGUGACUGAGAUC UUGGCUUG	860	NM_008198.2_1885- 1907_C1A_as
AD-562137.1	CGCUUCAUCAAGU UGGUGUU	816	NM_008198.2_2527- 2547_G21U_s	AACACCAACUUGAAU GAAGCGGC	861	NM_008198.2_2525- 2547_C1A_as
AD-561536.1	CAUGUGUUUAAAG UCAAGGAU	817	NM_008198.2_1750- 1770_s	AUCCUUGACUUUAAA CACAUGAU	862	NM_008198.2_1748- 1770_as
AD-561253.1	AAUCAGUUAUGAA GACCACAU	818	NM_008198.2_1422- 1442_A21U_s	AUGUGGTCUUCAUAA CUGAUUUG	863	NM_008198.2_1420- 1442_U1A_as
AD-561959.1	GAAGGAUGUCAA GCUCUGUU	819	NM_008198.2_2274- 2294_s	AACAGAGCUUUGACA UCCUUCAC	864	NM_008198.2_2272- 2294_as
AD-561573.1	AUGUUUUCUACCAA AUGAUUU	820	NM_008198.2_1787- 1807_G21U_s	AAAUCATUUGGUAGA AAACAUC	865	NM_008198.2_1785- 1807_C1A_as

AD-561651.1	CAAGCCAAGAUCUC AGUCACU	821	NM_008198.2_1885- 1905_s	AGUGACTGAGAUCUU GGCUUGCC	866	NM_008198.2_1883- 1905_as
AD-561148.1	ACCAACUUGAUUGA GAAGGUU	822	NM_008198.2_1279- 1299_G21U_s	AACCUUCUCAAUCAA GUUGGUGA	867	NM_008198.2_1277- 1299_C1A_as
AD-561962.1	GGAUGUCAAAAGCUC UGUUUGU	823	NM_008198.2_2277- 2297_s	ACAAACAGAGCUUUG ACAUCCUU	868	NM_008198.2_2275- 2297_as
AD-562237.1	AGAUGAGGAUUUG GGUUUUCU	824	NM_001710.5_2549- 2569_s	AGAAAACCCAAAUCC UCAUCUUU	869	NM_008198.2_2668- 2690_as
AD-561654.1	GCCAAGAUCUCAGU CACUCGU	825	NM_008198.2_1888- 1908_C21U_s	ACGAGUGACUGAGAU CUUGGCUU	870	NM_008198.2_1886- 1908_G1A_as
AD-562136.1	CCGCUUCAUUCAAG UUGGUGU	826	NM_008198.2_2526- 2546_s	ACACCAACUUGAAUG AAGCGGCU	871	NM_008198.2_2524- 2546_as
AD-562026.1	GCCAGUUGUGAGAG AGAUGCU	827	NM_008198.2_2359- 2379_s	AGCAUCTCUCUCACAA CUGGCUU	872	NM_008198.2_2357- 2379_as
AD-561101.1	UCCAUGAAUAUCUA CCUGGUU	828	NM_008198.2_1201- 1221_G21U_s	AACCAGGUAGAUUU CAUGGAGC	873	NM_008198.2_1199- 1221_C1A_as
AD-561539.1	GUGUUUAAAGUCA AGGAUAUU	829	NM_008198.2_1753- 1773_G21U_s	AAUAUCCUUGACUUU AAACACAU	874	NM_008198.2_1751- 1773_C1A_as
AD-561961.1	AGGAUGUCAAAAGCU CUGUUUU	830	NM_008198.2_2276- 2296_G21U_s	AAAACAGAGCUUUGA CAUCCUUC	875	NM_008198.2_2274- 2296_C1A_as
AD-561535.1	UCAUGUGUUUAAA GUCAAGGU	831	NM_008198.2_1749- 1769_A21U_s	ACCUUGACUUUAAAC ACAUGAUG	876	NM_008198.2_1747- 1769_U1A_as

AD-561652.1	AAGCCAAGAUCUCA GUCACUU	832	NM_008198.2_1886- 1906_C21U_s	AAGUGACUGAGAUCU UGGCUUGC	877	NM_008198.2_1884- 1906_G1A_as
AD-562260.1	UCAAAGAUGAGGA UUUGGGUU	833	NM_008198.2_2666- 2686_s	AACCCAAAUCCUCAUC UUUGAGC	878	NM_008198.2_2664- 2686_as
AD-557041.2	UGGUGCUAGAUGG AUCAGACU	72	NM_001710.5_1096- 1116_A21U_s	AGUCUGAUCCAUCUA GCACCAGG	158	NM_001710.5_1094- 1116_U1A_as
AD-561655.1	CCAAGAUCUCAGUC ACUCGCU	834	NM_008198.2_1889- 1909_C21U_s	AGCGAGTGACUGAGA UCUUGGCU	879	NM_008198.2_1887- 1909_G1A_as
AD-557043.1	GUGCUAGAUGGAUC AGACAGU	835	NM_001710.5_1098- 1118_C21U_s	ACUGUCTGAUCCAUCU AGCACCA	880	NM_001710.5_1096- 1118_G1A_as
AD-561603.1	CAAAUCUCUGAGUC UCUGUGU	836	NM_008198.2_1815- 1835_G21U_s	ACACAGAGACUCAGA GAUUUGGU	881	NM_008198.2_1813- 1835_C1A_as
AD-557044.1	UGCUAGAUGGAUCA GACAGCU	837	NM_001710.5_1099- 1119_A21U_s	AGCUGUCUGAUCCAU CUAGCACC	882	NM_001710.5_1097- 1119_U1A_as
AD-561266.1	GACCACAAGCUGAA GUCAGGU	838	NM_008198.2_1435- 1455_G21U_s	ACCUGACUUCAGCUU GUGGUCUU	883	NM_008198.2_1433- 1455_C1A_as
AD-561541.1	GUUUAAAGUCAAG GAUAUGGU	839	NM_008198.2_1755- 1775_A21U_s	ACCAUATCCUUGACUU UAAACAC	884	NM_008198.2_1753- 1775_U1A_as
AD-562257.1	AGCUCAAAGAUGAG GAUUUGU	840	NM_008198.2_2663- 2683_G21U_s	ACAAAUCCUCAUCUU UGAGCUUG	885	NM_008198.2_2661- 2683_C1A_as
AD-560538.1	GAGGGAGUAGAGA UCAAAGGU	841	NM_008198.2_517- 537_C21U_s	ACCUUGAUCUCUAC UCCCUCCA	886	NM_008198.2_515- 537_G1A_as

AD-561579.1	UCUACCAAAUGAUU GAUGAAU	842	NM_008198.2_1793- 1813_A21U_s	AUUCAUCAUCAUU GGUAGAAA	887	NM_008198.2_1791- 1813_U1A_as
AD-562259.1	CUCAAAGAUGAGGA UUUGGGU	843	NM_008198.2_2665- 2685_s	ACCCAAAUCCUCAUCU UUGAGCU	888	NM_008198.2_2663- 2685_as
AD-560968.1	CUGCCAAGAUUCCU UCAUGUU	844	NM_008198.2_1050- 1070_A21U_s	AACAUGAAGGAAUCU UGGCAGGA	889	NM_008198.2_1048- 1070_U1A_as
AD-561647.1	AUGGCAAGCCAAGA UCUCAGU	845	NM_008198.2_1881- 1901_s	ACUGAGAUCUUGGCU UGCCAUGG	890	NM_008198.2_1879- 1901_as
AD-561469.1	CCUGGAUGUGUAUG UGUUUGU	846	NM_008198.2_1665- 1685_G21U_s	ACAAACACAUAACACA UCCAGGUA	891	NM_008198.2_1663- 1685_C1A_as
AD-561540.1	UGUUUAAAGUCAA GGAUAUGU	847	NM_008198.2_1754- 1774_G21U_s	ACAUAUCCUUGACUU UAAACACA	892	NM_008198.2_1752- 1774_C1A_as
AD-562135.1	GCCGCUUCAUUCAA GUUGGUU	848	NM_008198.2_2525- 2545_G21U_s	AACCAACUUGAAUGA AGCGGCUU	893	NM_008198.2_2523- 2545_C1A_as

Таблица 7

Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК-агентов фактора комплемента 3

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательности антисмысловой цепи от 5' к 3'	SE Q ID NO:	Последовательность мРНК-мишени	SEQ ID NO:
AD-560969.1	usgsccaaGfaUfUfCfcuucauguau L96	894	asUfsacau(Ggn)aaggaaUfcUfuggca sgsg	939	CCUGCCAAGAUUCCU UCAUGUAU	984
AD-	asusguguUfuAfAfAfgucaaggauu	895	asAfsuccu(Tgn)gacuuuAfaAfcacau	940	UCAUGUGUUUAAAG	985

561537.1	L96		sgsa		UCAAGGAUA	
AD- 562262.1	asasagauGfaGfGfAfuuggguuuu L96	896	asAfsaacc(Cgn)aaauccUfcAfucuuu sgsa	941	UCAAAGAUGAGGAU UUGGGUUUU	986
AD- 561960.1	asasggauGfCfAfAfagcucuguuu L96	897	asAfsacag(Agn)gcuuugAfcAfuccu uscsa	942	UGAAGGAUGUCAA GCUCUGUUU	987
AD- 561580.1	csusaccaAfaUfGfAfuugaugaaau L96	898	asUfsuuca(Tgn)caaucaUfuUfgguag sasa	943	UUCUACCAAUGAU UGAUGAAAC	988
AD- 561254.1	asuscaguUfaUfGfAfagaccacaau L96	899	asUfsugug(Ggn)ucucaUfaAfcuga ususu	944	AAAUCAGUUAUGAA GACCACAAG	989
AD- 561578.1	ususcuaCfaAfAfUfgauugaugau L96	900	asUfsauc(Agn)aucauUfgGfuagaa sasa	945	UUUUCUACCAAUG AUUGAUGAA	990
AD- 561538.1	usgsuguuUfaAfAfGfucaaggauau L96	901	asUfsaucc(Tgn)ugacuuUfaAfacaca susg	946	CAUGUGUUUAAAGU CAAGGAUUAU	991
AD- 561252.1	asasaucGfuUfAfUfgaagaccacu L96	902	asGfsuggu(Cgn)uucuaAfcUfgauu usgsg	947	CCAAUCAGUUAUG AAGACCACA	992
AD- 561963.1	gsasugucAfaAfGfCfucuguuuguu L96	903	asAfscaaa(Cgn)agagcuUfuGfacauc scsu	948	AGGAUGUCAAGCU CUGUUUGUA	993
AD- 562027.1	cscsaguuGfuGfAfGfagagaugcuu L96	904	asAfsgc(Cgn)ucucucAfcAfacugg scsu	949	AGCCAGUUGUGAGA GAGAUGCUA	994
AD- 561653.1	asgsccaaGfaUfCfUfcagucacucu L96	905	asGfsagug(Agn)cugagaUfcUfuggc ususg	950	CAAGCCAAGAUCUCA GUCACUCG	995
AD-	csgscuucAfuUfCfAfaguugguguu	906	asAfsacc(Agn)acuugaAfuGfaagcg	951	GCCGCUUCAUUCAAG	996

562137.1	L96		sgsc		UUGGUGUG	
AD- 561536.1	csasugugUfuUfAfAfagucaaggau L96	907	asUfscuu(Ggn)acuuuaAfaCfcaug sas	952	AUCAUGUGUUUAAA GUCAAGGAU	997
AD- 561253.1	asasucagUfuUfGfaagaccacau L96	908	asUfsgugg(Tgn)cuucauAfaCfugauu susg	953	CAAUCAGUUAUGA AGACCACAA	998
AD- 561959.1	gsasaggaUfgUfCfAfaagcucuguu L96	909	asAfscaga(Ggn)cuuugaCfaUfcuuc sasc	954	GUGAAGGAUGUCAA AGCUCUGUU	999
AD- 561573.1	asusguuuUfcUfAfCfcaaugauuu L96	910	asAfsauca(Tgn)uugguaGfaAfaacau susc	955	GAAUGUUUUCUACC AAAUGAUUG	1000
AD- 561651.1	csasagccAfaGfAfUfcucagucacu L96	911	asGfsugac(Tgn)gagauUfuGfgcuug scsc	956	GGCAAGCCAAGAUCU CAGUCACU	1001
AD- 561148.1	ascscacUfuGfAfUfugagaagguu L96	912	asAfsccuu(Cgn)ucaaucAfaGfuuggu sgsa	957	UCACCAACUUGAUUG AGAAGGUG	1002
AD- 561962.1	gsgsauguCfaAfAfGfcucuguuugu L96	913	asCfsaaac(Agn)gagcuUfgAfcaucc susu	958	AAGGAUGUCAAGC UCUGUUUGU	1003
AD- 562237.1	asgsaugaGfgAfUfUfuggguuuuc uL96	914	asGfsaaaa(Cgn)ccaaauCfcUfcaucus usu	959	AAGAUGAGGAUUUG GGUUUUCU	1004
AD- 561654.1	gscscaagAfuCfUfCfagucacucgu L96	915	asCfsgagu(Ggn)acugagAfuCfuugg csusu	960	AAGCCAAGAUCUCAG UCACUCGC	1005
AD- 562136.1	cscsgcuuCfaUfUfCfaaguuggugu L96	916	asCfsacca(Agn)cuugaaUfgAfagcgg scsu	961	AGCCGCUUCAUUCAA GUUGGUGU	1006
AD-	gscscaguUfgUfGfAfagagauugu	917	asGfscauc(Tgn)cucucaCfaAfcuggc	962	AAGCCAGUUGUGAG	1007

562026.1	L96		susu		AGAGAUGCU	
AD- 561101.1	uscsaugAfaUfAfUfcuaccugguu L96	918	asAfscag(Ggn)uagauaUfuCfaugga sgsc	963	GCUCCAUGAAUAUCU ACCUGGUG	1008
AD- 561539.1	gsusguuuAfaAfGfUfcaaggauuu L96	919	asAfsuac(Cgn)uugacuUfuAfaacac sas	964	AUGUGUUUAAAGUC AAGGAUAUG	1009
AD- 561961.1	asgsgaugUfcAfAfAfgcucuguuuu L96	920	asAfsaaca(Ggn)agcuuuGfaCfauccu susc	965	GAAGGAUGUCAAG CUCUGUUUG	1010
AD- 561535.1	uscsauguGfuUfUfAfaagucaaggu L96	921	asCfscuug(Agn)cuuuAfcAfauga susg	966	CAUCAUGUGUUUAA AGUCAAGGA	1011
AD- 561652.1	asasgccaAfgAfUfCfucagucacuu L96	922	asAfsguga(Cgn)ugagauCfuUfggcu usgsc	967	GCAAGCCAAGAUCUC AGUCACUC	1012
AD- 562260.1	uscsaaagAfuGfAfGfgauuuggguu L96	923	asAfsccca(Agn)auccucAfuCfuuga sgsc	968	GCUCAAAGAUGAGG AUUUGGGUU	1013
AD- 557041.2	usgsgugcUfaGfAfUfggaucagacu L96	244	asGfsucug(Agn)uccaucUfaGfcacca sgsg	330	CCUGGUGCUAGAUG GAUCAGACA	416
AD- 561655.1	cscsaagaUfcUfCfAfgucacucgu L96	924	asGfscgag(Tgn)gacugaGfaUfcuugg scsu	969	AGCCAAGAUCUCAGU CACUCGCC	1014
AD- 557043.1	gsusgcuaGfaUfGfGfaucagacagu L96	925	asCfsuguc(Tgn)gauccaUfcUfagcac scsa	970	UGGUGCUAGAUGGA UCAGACAGC	1015
AD- 561603.1	csasaucUfcUfGfAfgucucugugu L96	926	asCfsacag(Agn)gacucaGfaGfauuug sgsu	971	ACCAAUCUCUGAGU CUCUGUGG	1016
AD-	usgscuagAfuGfGfAfucagacagcu	927	asGfscugu(Cgn)ugauccAfuCfuagca	972	GGUGCUAGAUGGAU	1017

557044.1	L96		scsc		CAGACAGCA	
AD- 561266.1	gsasccacAfaGfCfUfgaagucaggu L96	928	asCfscuga(Cgn)uucagcUfuGfugguc susu	973	AAGACCACAAGCUGA AGUCAGGG	1018
AD- 561541.1	gsusuuuaAfgUfCfAfaggauauggu L96	929	asCfscaua(Tgn)ccuugaCfuUfuaaac sasc	974	GUGUUUAAAGUCA GGAUAUGGA	1019
AD- 562257.1	asgscucaAfaGfAfUfgaggauuugu L96	930	asCfsaaau(Cgn)cucaucUfuUfgagcu susg	975	CAAGCUCAAAGAUG AGGAUUUGG	1020
AD- 560538.1	gsasgggaGfuAfGfAfgaucaaaggu L96	931	asCfscuuu(Ggn)aucucuAfcUfccuc scsa	976	UGGAGGGAGUAGAG AUCAAAGGC	1021
AD- 561579.1	uscsuaccAfaAfUfGfauugaugaau L96	932	asUfsucau(Cgn)aaucuuUfuGfguaga sasa	977	UUUCUACCAAAUGA UUGAUGAAA	1022
AD- 562259.1	csuscaaaGfaUfGfAfggauuugggu L96	933	asCfsccaa(Agn)uccucaUfcUfuugag scsu	978	AGCUCAAAGAUGAG GAUUUGGGU	1023
AD- 560968.1	csusgccaAfgAfUfUfccuucauguu L96	934	asAfscaug(Agn)aggaauCfuUfggcag sgsa	979	UCCUGCCAAGAUUCC UUCAUGUA	1024
AD- 561647.1	asusggcaAfgCfCfAfagaucucagu L96	935	asCfsugag(Agn)ucuuggCfuUfgcca usgsg	980	CCAUGGCAAGCCAAG AUCUCAGU	1025
AD- 561469.1	cscsuggaUfgUfGfUfauguguuug uL96	936	asCfsaaac(Agn)cauacaCfaUfccaggs usa	981	UACCUGGAUGUGUA UGUGUUUGG	1026
AD- 561540.1	usgsuuuaAfaGfUfCfaaggauaugu L96	937	asCfsauau(Cgn)cuugacUfuUfaaaca scsa	982	UGUGUUUAAAGUCA AGGAUAUGG	1027
AD-	gscscgcuUfcAfUfUfcaaguugguu	938	asAfsccaa(Cgn)uugaauGfaAfgcggc	983	AAGCCGCUUCAUCA	1028

562135.1	L96		susu		AGUUGGUG	
----------	-----	--	------	--	----------	--

Таблица 8

Скрининг однократной дозы фактора комплемента В in vitro в клетках Нер3В

ID дуплекса	10 нМ % оставшейся мРНК	1нМ % оставшейся мРНК	0,1 нМ % оставшейся мРНК
AD- 557072.1	4,99	8,87	40,99
AD- 558097.1	5,00	11,75	45,33
AD- 557068.1	9,00	22,78	53,22
AD- 557774.1	6,55	17,23	52,48
AD- 557070.1	7,33	21,06	54,78
AD- 558225.1	19,10	29,43	106,87
AD- 558065.1	12,21	24,28	61,24
AD- 557853.1	9,39	35,28	55,01
AD-	20,01	27,64	138,66

556919.1			
AD- 557859.1	13,46	25,92	104,56
AD- 557069.1	11,26	29,35	54,36
AD- 558068.1	14,59	21,63	48,67
AD- 557422.1	14,87	27,15	55,45
AD- 558096.1	10,81	26,65	76,39
AD- 557084.1	28,07	54,88	138,96
AD- 558076.1	13,06	24,15	42,77
AD- 558063.1	20,24	28,87	54,49
AD- 558069.1	17,70	27,78	53,41
AD- 558061.1	19,59	36,04	48,88
AD-	23,98	44,12	51,72

558066.1			
AD- 556581.1	22,46	67,53	186,97
AD- 557079.1	9,97	41,07	71,40
AD- 558012.1	17,26	35,39	112,72
AD- 556701.1	9,91	23,66	62,85
AD- 557782.1	13,23	45,66	53,87
AD- 557498.1	28,16	56,57	131,91
AD- 556788.1	33,88	58,98	118,02
AD- 557078.1	18,18	50,25	80,91
AD- 557852.1	40,94	60,36	167,53
AD- 557353.1	23,37	44,41	62,52
AD-	26,00	87,78	110,85

557041.1			
AD- 556786.1	51,74	66,59	90,96
AD- 556734.1	29,10	54,88	70,13
AD- 557475.1	26,95	50,54	65,87
AD- 557972.1	63,07	77,45	71,99
AD- 556390.1	31,40	46,72	72,19
AD- 556963.1	42,99	68,75	146,93
AD- 558078.1	30,67	83,78	62,14
AD- 557204.1	40,18	69,41	199,62
AD- 556962.1	67,05	92,06	80,95
AD- 556733.1	34,07	61,86	62,03
AD-	43,85	114,37	225,16

556724.1			
AD- 557067.1	42,27	59,20	67,56
AD- 557602.1	39,99	70,66	155,25
AD- 557345.1	45,66	91,09	186,86
AD- 557969.1	70,94	72,23	72,25
AD- 557867.1	43,92	108,43	178,41
AD- 557860.1	49,94	63,71	134,13
AD- 557868.1	52,22	99,81	112,51
AD- 558064.1	61,63	72,39	59,83
AD- 556725.1	45,46	62,37	68,67
AD- 556787.1	58,40	102,98	163,60
AD-	55,53	70,65	156,02

558062.1			
AD- 556874.1	83,34	90,67	62,04
AD- 557066.1	75,61	93,55	168,75
AD- 556791.1	64,56	74,17	75,36
AD- 557450.1	56,23	68,84	77,40
AD- 557865.1	66,83	94,99	153,50
AD- 556961.1	69,87	93,70	206,00
AD- 556920.1	52,86	81,48	188,46
AD- 558074.1	74,73	132,35	71,18
AD- 556738.1	72,67	123,81	206,91
AD- 558004.1	100,55	103,41	190,48
AD-	85,53	97,13	199,73

556918.1			
AD- 557209.1	84,13	96,02	140,72
AD- 557861.1	66,07	84,41	120,27
AD- 557226.1	83,39	94,85	123,74
AD- 557856.1	84,68	85,69	137,01
AD- 557839.1	114,79	91,84	69,49
AD- 557873.1	84,73	102,93	65,71
AD- 557417.1	88,08	115,91	225,81
AD- 558106.1	95,90	110,10	217,75
AD- 557788.1	87,87	109,59	129,42
AD- 556917.1	79,04	71,81	78,26
AD-	87,37	115,81	70,32

556739.1			
AD- 556726.1	96,01	129,96	221,48
AD- 556790.1	109,55	118,05	193,15
AD- 557604.1	74,95	133,00	177,11
AD- 557495.1	96,32	130,00	254,48
AD- 557016.1	106,90	131,43	110,73
AD- 558105.1	77,28	73,82	85,07
AD- 557872.1	102,16	123,17	172,64
AD- 557346.1	113,18	138,10	228,78
AD- 557851.1	107,51	138,22	178,85
AD- 557786.1	117,86	149,34	168,00
AD-	118,52	127,67	145,90

557857.1			
----------	--	--	--

Таблица 9

Скрининг однократной дозы фактора комплемента В in vitro на клетках Нер3В

ID дуплекса	доза 10 нМ % оставшейся мРНК	STDE V	доза 1нМ % оставшейся мРНК	STDE V	доза 0,1 нМ % оставшейся мРНК	STDE V
AD-558657.1	4,81	0,55	6,98	1,27	24,75	5,46
AD-559020.1	5,18	0,75	7,21	1,31	17,95	3,88
AD-559023.1	7,71	0,93	9,85	2,87	32,65	5,12
AD-558860.1	8,35	1,69	14,34	1,97	33,70	7,41
AD-559143.1	8,57	1,09	11,19	1,02	28,52	7,22
AD-559021.1	8,65	3,21	13,97	4,56	42,99	5,93
AD-559144.1	9,25	0,94	16,75	3,32	33,52	2,97
AD-559435.1	10,47	0,85	13,57	1,00	38,94	5,33
AD-560019.1	10,57	0,67	12,96	1,19	17,67	1,23
AD-559722.1	11,24	1,35	19,04	1,63	42,16	2,85
AD-560016.1	11,42	1,30	17,54	2,39	28,72	3,63
AD-559008.1	11,51	3,34	17,60	0,78	45,58	15,60
AD-560018.1	11,76	1,89	16,87	2,51	28,83	4,60
AD-560045.1	12,13	1,71	28,22	11,60	53,32	14,16
AD-559375.1	12,45	1,28	21,86	1,78	61,75	7,34
AD-559142.1	13,01	2,52	20,98	3,88	43,82	6,89
AD-559160.1	13,06	3,15	19,02	1,35	47,19	7,99

AD-559374.1	13,17	3,28	27,58	5,37	72,78	11,80
AD-559369.1	13,75	0,79	25,72	0,58	62,74	6,62
AD-559148.1	13,81	1,72	25,39	1,60	53,03	5,36
AD-560163.1	14,11	0,87	20,31	1,31	49,05	4,99
AD-559398.1	14,23	3,97	18,11	2,34	46,53	6,07
AD-559060.1	14,39	3,41	32,15	3,07	62,25	5,65
AD-559392.1	14,69	3,59	21,68	2,40	55,88	8,59
AD-559451.1	14,84	3,18	25,50	3,19	43,71	5,05
AD-559721.1	15,23	3,73	23,03	3,34	51,33	10,51
AD-559146.1	15,26	5,05	28,14	1,99	71,88	8,41
AD-560165.1	15,74	2,70	25,08	2,14	65,45	14,31
AD-559921.1	15,99	1,86	19,91	4,59	38,78	9,90
AD-560021.1	16,02	3,62	37,73	4,08	58,59	3,73
AD-560164.1	16,23	2,00	22,73	3,67	63,13	4,12
AD-559614.1	16,27	4,70	31,75	4,73	49,34	6,16
AD-559393.1	16,46	3,99	31,63	4,04	61,56	10,13
AD-559717.1	16,68	1,69	20,78	3,33	42,46	10,02
AD-560017.1	16,71	2,32	28,04	3,35	57,72	16,22
AD-559440.1	16,90	1,64	27,94	4,84	50,75	9,54
AD-560166.1	17,02	4,84	20,01	3,95	58,88	13,01
AD-559059.1	17,61	5,82	33,74	3,87	59,15	7,45
AD-559300.1	17,90	5,18	34,67	2,86	67,79	6,31

AD-559946.1	18,11	1,61	36,74	5,04	62,70	7,20
AD-559147.1	18,33	2,11	47,39	7,94	85,39	10,23
AD-559755.1	19,99	5,12	26,88	2,30	52,33	10,49
AD-559446.1	20,58	2,25	30,84	7,47	64,13	7,62
AD-559026.1	21,11	2,49	41,40	14,50	65,91	11,08
AD-559714.1	22,71	0,91	32,56	2,47	69,69	6,49
AD-560160.1	22,85	5,07	28,30	2,24	65,27	9,41
AD-559437.1	25,76	4,50	44,87	12,58	78,13	8,91
AD-560162.1	25,95	4,26	43,29	5,64	71,14	20,99
AD-560161.1	26,34	3,19	38,91	4,83	68,19	5,53
AD-559924.1	26,34	8,91	36,46	3,90	57,07	6,32
AD-559865.1	27,49	2,47	47,05	6,32	75,04	14,94
AD-559449.1	28,57	3,20	54,33	4,83	70,39	14,64
AD-559788.1	28,70	6,51	62,57	7,45	79,25	8,07
AD-559617.1	29,43	9,48	67,18	6,78	88,54	10,81
AD-559719.1	30,38	3,11	55,82	5,69	83,18	12,99
AD-559718.1	32,51	3,42	57,77	8,99	82,88	18,79
AD-558697.1	32,69	5,66	44,32	3,45	58,56	7,73
AD-559357.1	33,33	3,84	33,06	4,91	59,41	16,08
AD-558965.1	35,13	2,66	34,85	11,29	51,66	15,94
AD-558267.1	37,43	7,93	35,43	6,56	40,76	7,84
AD-558639.1	37,99	5,49	46,82	7,78	44,37	7,45

AD-559925.1	39,15	17,96	74,82	7,86	75,18	4,17
AD-559450.1	40,47	6,34	63,09	4,35	53,12	12,34
AD-559302.1	41,61	5,63	59,86	3,32	79,54	9,58
AD-559074.1	41,79	3,21	57,94	3,73	62,36	5,75
AD-559947.1	43,30	2,71	66,78	11,57	73,55	7,33
AD-559442.1	47,58	8,47	69,78	10,91	92,36	7,58
AD-559359.1	48,10	2,37	86,83	11,09	102,01	6,31
AD-559616.1	50,68	6,63	93,13	11,78	88,54	12,26
AD-559864.1	63,01	11,07	91,70	12,15	89,75	13,66
AD-559866.1	85,15	11,86	94,33	6,79	79,14	12,77

Таблица 10

**Скрининг однократной дозы фактора комплемента В in vitro на первичных
гепатоцитах мыши (РМН)**

ID дуплекса	доза 10 нМ % оставшейся мРНК	STDE V	доза 1нМ % оставшейся мРНК	STDE V	доза 0,1 нМ % оставшейся мРНК	STDE V
AD-558860.1	10,33	2,38	40,10	5,03	94,64	11,07
AD-560018.1	13,28	3,25	64,35	11,23	114,97	8,99
AD-560019.1	18,44	3,65	75,46	18,65	118,42	14,85
AD-	19,42	3,01	47,55	4,18	125,03	7,48

559160.1						
AD- 559921.1	20,12	3,89	67,51	6,36	123,87	9,76
AD- 559755.1	20,65	5,45	77,24	11,02	117,00	9,54
AD- 560017.1	22,11	5,43	82,72	11,41	123,23	4,98
AD- 559614.1	23,18	7,36	67,15	7,61	123,18	19,54
AD- 559435.1	25,13	3,68	66,19	8,46	118,78	11,85
AD- 560016.1	25,40	5,70	91,81	22,08	128,76	16,87
AD- 559451.1	27,47	9,44	71,89	12,25	137,27	20,14
AD- 559617.1	29,70	10,00	84,66	4,39	140,37	6,69
AD- 560021.1	32,74	4,65	91,51	4,21	126,40	12,31
AD- 559449.1	37,90	5,63	82,95	9,33	130,52	19,04
AD-	38,55	8,96	87,87	22,39	129,90	7,64

559450.1						
AD- 559925.1	38,62	3,39	90,35	10,90	104,75	5,55
AD- 559440.1	39,15	5,87	82,63	10,21	124,84	7,74
AD- 559788.1	42,67	7,18	114,25	12,73	138,37	4,54
AD- 559437.1	45,26	10,40	94,10	7,91	130,12	11,84
AD- 559369.1	47,64	10,56	83,98	9,74	136,96	5,52
AD- 559446.1	49,32	10,27	104,76	13,05	141,33	23,45
AD- 559924.1	56,47	10,68	101,50	14,50	131,17	5,61
AD- 558965.1	58,30	14,89	94,61	10,27	109,17	5,25
AD- 560045.1	68,96	6,99	94,93	5,17	98,24	5,15
AD- 559946.1	74,67	7,51	116,30	7,12	108,08	6,00
AD-	79,21	8,58	103,00	11,53	141,24	23,63

558697.1						
AD- 559008.1	79,41	8,78	103,11	8,12	103,48	5,21
AD- 559357.1	81,03	4,45	95,92	5,13	110,83	8,24
AD- 559020.1	82,26	11,63	98,50	12,69	102,20	4,21
AD- 559143.1	82,37	15,28	97,44	5,47	104,94	5,93
AD- 559374.1	85,24	7,46	89,59	3,03	130,94	10,46
AD- 560161.1	85,46	17,44	91,49	7,11	106,52	4,01
AD- 559947.1	86,06	13,19	115,94	7,06	118,65	5,89
AD- 559616.1	86,75	7,61	115,52	9,47	134,57	3,86
AD- 559142.1	87,22	10,07	88,47	5,77	96,92	5,92
AD- 558639.1	87,64	13,26	99,95	4,27	122,33	12,04
AD-	88,71	22,04	104,01	13,19	97,42	5,90

560166.1						
AD- 559359.1	89,05	14,80	104,69	7,55	123,70	6,43
AD- 558657.1	89,59	11,42	95,66	6,61	109,56	9,31
AD- 559442.1	90,05	26,12	107,09	17,30	152,65	17,71
AD- 559023.1	93,44	12,18	96,28	8,79	116,18	4,76
AD- 560160.1	93,98	12,77	106,07	14,37	96,30	1,99
AD- 559398.1	94,15	14,19	89,68	5,33	141,12	7,36
AD- 559722.1	94,20	7,15	114,34	13,25	128,86	17,84
AD- 559146.1	94,84	7,07	94,68	6,79	150,36	18,96
AD- 558267.1	96,73	10,58	101,69	8,01	107,42	7,77
AD- 559074.1	99,75	10,40	91,77	6,74	132,38	20,72
AD-	100,49	17,85	98,34	9,70	99,71	7,13

560162.1						
AD- 559021.1	102,22	20,82	100,57	9,81	143,53	24,85
AD- 559144.1	105,28	4,70	98,16	9,44	149,08	20,99
AD- 559147.1	106,45	27,57	89,01	4,30	147,67	22,58
AD- 560164.1	106,73	13,72	97,25	8,25	103,76	7,45
AD- 559714.1	107,80	24,01	130,26	16,11	139,71	8,34
AD- 560165.1	108,93	14,81	100,31	4,51	95,90	5,35
AD- 559300.1	111,25	11,78	90,58	4,56	134,36	10,29
AD- 559866.1	112,76	7,74	123,50	10,25	143,37	8,58
AD- 559302.1	113,89	12,96	90,69	3,34	112,12	19,35
AD- 560163.1	114,10	15,54	92,44	9,83	107,52	5,99
AD-	114,19	9,34	139,34	10,12	143,95	10,17

559718.1						
AD- 559721.1	115,30	17,06	116,42	5,04	143,90	13,34
AD- 559026.1	115,85	15,27	95,64	12,87	132,32	13,74
AD- 559719.1	116,22	12,55	130,31	6,06	150,76	26,42
AD- 559060.1	117,05	20,30	95,06	4,36	141,26	25,56
AD- 559864.1	118,44	9,57	134,91	10,92	143,92	22,59
AD- 559059.1	120,63	14,40	94,88	3,85	154,23	9,79
AD- 559865.1	123,03	9,71	134,45	14,17	142,24	10,43
AD- 559148.1	123,28	10,25	91,36	4,38	156,95	14,94
AD- 559375.1	125,42	7,77	96,09	8,53	148,89	19,81
AD- 559393.1	126,82	14,36	97,97	6,13	142,67	16,86
AD-	131,20	6,00	131,80	6,57	148,89	12,67

559717.1						
AD- 559392.1	134,26	21,19	96,35	2,77	130,60	8,29

Таблица 11

**Скрининг однократной дозы фактора комплемента В in vitro на первичных
гепатоцитах мыши (PMH)**

ID дуплекса	доза 10 нМ % оставшейся мРНК	STDE V	доза 1нМ % оставшейся мРНК	STDE V	доза 0,1 нМ % оставшейся мРНК	STDE V
AD- 560969.1	1,76	0,44	12,85	2,32	72,08	7,11
AD- 561537.1	1,97	0,30	13,11	1,38	57,66	1,85
AD- 562262.1	2,07	0,40	14,20	2,60	54,79	3,33
AD- 561960.1	2,82	0,45	15,86	1,84	76,74	10,88
AD- 561580.1	2,88	1,59	18,55	1,98	69,39	11,71
AD- 561254.1	2,89	0,86	15,62	4,05	61,84	5,51
AD- 561578.1	2,95	0,42	25,93	1,50	76,75	7,73
AD- 561538.1	3,50	0,97	4,45	1,11	31,69	5,04
AD-	3,60	1,65	16,00	2,58	59,33	6,64

561252.1						
AD- 561963.1	3,62	0,30	29,50	8,22	81,62	4,93
AD- 562027.1	3,89	0,78	23,89	5,04	70,54	7,81
AD- 561653.1	4,01	0,74	23,82	3,53	80,62	7,07
AD- 562137.1	4,14	1,55	24,06	11,00	69,61	6,62
AD- 561536.1	4,21	1,10	29,07	5,79	80,38	5,28
AD- 561253.1	5,04	1,15	27,31	6,10	68,27	12,61
AD- 561959.1	5,17	1,81	50,97	13,35	90,71	8,16
AD- 561573.1	5,38	0,27	33,50	11,42	91,06	13,14
AD- 561651.1	6,36	1,01	49,06	2,79	92,69	9,37
AD- 561148.1	6,36	0,87	38,00	1,38	89,30	12,00
AD-	7,16	1,19	36,21	6,11	91,19	5,39

561962.1						
AD- 562237.1	8,80	2,07	53,16	6,31	86,16	11,24
AD- 561654.1	9,91	1,61	55,56	7,65	101,67	5,04
AD- 562136.1	10,27	0,81	62,46	9,28	97,86	7,44
AD- 562026.1	11,34	1,47	60,69	2,81	89,22	3,89
AD- 561101.1	11,78	2,75	62,67	4,18	84,92	9,50
AD- 561539.1	12,00	1,31	53,65	10,81	84,80	12,57
AD- 561961.1	14,01	2,50	58,58	7,03	101,01	6,13
AD- 561535.1	14,27	3,13	70,96	10,08	103,90	12,70
AD- 561652.1	16,40	3,40	64,57	7,97	96,09	9,38
AD- 562260.1	19,73	4,82	77,55	5,09	91,07	8,78
AD-	25,76	5,84	50,26	6,69	93,59	0,72

557041.2						
AD- 561655.1	26,16	3,41	80,98	7,80	102,69	10,61
AD- 557043.1	27,03	3,02	69,48	3,50	95,16	3,84
AD- 561603.1	31,99	4,57	78,55	6,25	86,39	7,35
AD- 557044.1	38,05	3,97	53,45	3,97	90,84	7,63
AD- 561266.1	38,64	2,80	79,00	6,75	89,14	5,01
AD- 561541.1	45,60	6,83	92,73	1,82	107,60	8,31
AD- 562257.1	52,27	2,66	93,01	8,78	100,58	4,10
AD- 560538.1	57,85	5,71	92,26	2,62	102,77	6,06
AD- 561579.1	65,71	10,54	91,74	8,83	101,05	6,91
AD- 562259.1	66,28	3,34	91,38	7,85	96,23	5,92
AD-	73,08	6,97	87,16	9,40	100,89	2,47

560968.1						
AD- 561647.1	74,09	6,95	96,10	5,34	103,62	8,94
AD- 561469.1	78,98	10,38	91,17	7,11	102,25	6,72
AD- 561540.1	84,14	6,35	95,72	4,13	104,96	9,90
AD- 562135.1	87,86	10,90	102,43	11,38	102,47	11,43

Таблица 12

Скрининг однократной дозы фактора комплемента В in vitro на клетках Нер3В

ID дуплекса	доза 10 нМ % оставшейся мРНК	STDEV	доза 1нМ % оставшейся мРНК	STDE V	доза 0,1 нМ % оставшейся мРНК	STDE V
AD- 560969.1	29,34	1,71	71,22	4,40	88,98	14,10
AD- 561537.1	86,96	7,93	84,92	6,56	97,67	11,01
AD- 562262.1	19,99	1,52	43,30	9,67	77,20	2,33
AD- 561960.1	101,89	7,12	93,06	6,78	86,95	11,28
AD-	77,04	4,88	72,79	13,33	99,51	7,87

561580.1						
AD- 561254.1	47,27	3,23	59,31	9,89	80,05	5,60
AD- 561578.1	17,62	1,52	54,39	5,50	86,17	9,50
AD- 561538.1	14,90	6,97	24,45	3,87	42,19	9,11
AD- 561252.1	93,27	11,00	96,17	6,74	78,24	13,72
AD- 561963.1	40,07	4,40	63,17	10,68	84,66	8,57
AD- 562027.1	77,41	4,07	84,74	1,64	95,86	11,49
AD- 561653.1	44,48	8,74	68,46	11,39	101,86	10,10
AD- 562137.1	12,14	2,49	35,01	5,57	63,19	12,92
AD- 561536.1	81,78	6,45	107,20	6,41	72,90	5,20
AD- 561253.1	83,43	9,54	84,78	15,70	70,37	8,01
AD-	78,06	6,19	70,68	2,99	89,62	9,10

561959.1						
AD- 561573.1	62,25	8,08	74,47	7,81	69,74	13,65
AD- 561651.1	65,86	6,99	94,78	14,92	86,37	10,00
AD- 561148.1	85,70	6,64	93,17	12,36	96,96	10,73
AD- 561962.1	73,24	4,15	104,85	7,06	105,02	11,38
AD- 562237.1	35,58	3,42	62,94	2,85	82,87	12,89
AD- 561654.1	68,27	6,59	84,86	8,20	88,86	16,82
AD- 562136.1	43,50	5,85	96,79	6,07	97,96	8,53
AD- 562026.1	78,57	11,58	92,78	9,79	100,53	12,79
AD- 561101.1	80,42	8,87	88,94	8,58	78,42	5,79
AD- 561539.1	73,75	9,48	70,46	13,02	81,45	11,45
AD-	93,29	14,09	102,04	3,89	82,92	14,39

561961.1						
AD- 561535.1	90,31	7,87	100,89	9,09	89,58	10,53
AD- 561652.1	99,83	14,12	86,03	11,59	99,32	15,07
AD- 562260.1	72,75	4,48	93,46	5,11	91,71	18,08
AD- 557041.2	18,62	0,85	50,98	12,96	78,19	10,26
AD- 561655.1	81,07	2,83	92,73	6,74	73,97	11,80
AD- 557043.1	28,86	4,75	81,11	7,28	91,72	10,13
AD- 561603.1	46,27	14,44	99,22	11,97	86,19	7,73
AD- 557044.1	23,45	2,59	74,62	9,75	79,77	7,73
AD- 561266.1	105,79	5,46	95,99	11,36	99,59	2,26
AD- 561541.1	100,77	11,65	98,43	4,85	93,30	4,25
AD-	101,31	9,81	97,55	15,36	95,26	7,79

562257.1						
AD- 560538.1	103,91	11,00	104,39	8,70	86,71	20,47
AD- 561579.1	87,65	10,59	80,92	11,54	83,54	7,48
AD- 562259.1	86,75	12,13	98,75	19,03	90,33	10,56
AD- 560968.1	94,61	7,70	107,14	4,84	88,97	10,45
AD- 561647.1	99,94	9,55	110,74	11,11	98,97	13,25
AD- 561469.1	84,71	4,50	88,17	6,08	82,50	8,92
AD- 561540.1	84,25	4,08	88,70	14,19	110,80	11,10
AD- 562135.1	89,38	4,70	95,02	2,81	98,61	12,79

Пример 3. Скрининг *in vivo* дуплексов дцРНК на мышах

Представляющие интерес дуплексы, идентифицированные в ходе вышеуказанных исследований *in vitro*, оценивали *in vivo*.

В частности, 6-8-недельным мышам дикого типа (C57BL/6) вводили 100 мл раствора 2×10^{11} вирусных частиц/мл вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего фактор комплемента человека В (hCFB AAV) внутривенной инъекцией в хвостовую вену на сутки -14.

На сутки 0 мышам подкожно вводили разовую дозу 2 мг/кг представляющего интерес дуплекса или PBS, который использовали в

качестве контроля (n=3/группа). В таблице 13 представлены дуплексы, которые вводили мышам.

На сутки 0; 7 и 14 после введения дозы отбирали образцы крови и готовили плазму для анализа ELISA. На сутки 14 после введения дозы животных подвергали эвтаназии, отбирали образцы печени и быстро замораживали в жидком азоте, после чего экстрагировали тканевую мРНК.

Уровень белка CFB человека определяли сэндвич-вариантом количественного иммуноферментного анализа (AssayMax™, набор для постановки ELISA для определения фактора комплемента В человека). В таблице 14 показано, что уровни белка человеческого CFB снижались при обработке однократной дозой миРНК, нацеленной на hCFB, 2 мг/кг.

Уровень экспрессии человеческого CFB измеряли с использованием ОТ-кПЦР, как описано выше. Уровни мРНК CFB человека сравнивали с уровнем мРНК гена домашнего хозяйства GAPDH. Затем значения нормализовали к среднему значению для контрольной группы с введением носителя PBS. Данные выражали в процентах от исходного значения и представляли как среднее значение плюс стандартное отклонение. Как показано в таблице 15, уровни мРНК CFB человека снижались при обработке однократной дозой миРНК, нацеленной на hCFB, 2 мг/кг.

Таблица 13

Скрининг дуплексов дцРНК in vivo

ИД дуплекса	ИД олигонуклеотида	Цепь	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон NM_001710.5
AD-558657.2	A-1072067.1	смысловая	gsusgaguGfaUfGfAfgaucucuuuuL96	629	643-665
	A-1075535.1	антисмысловая	asAfsaagAfgAfUfcucaUfcAfcucacsas u	700	
AD-559020.2	A-1072793.1	смысловая	asasaaguGfuCfUfAfgucaacuauL96	619	1145-1167
	A-1075898.1	антисмысловая	asUfsaagUfuGfAfcuagAfcAfcuuuuu sg	690	
AD-559023.2	A-1072799.1	смысловая	asgsugucUfaGfUfCfaacuuaauuuL96	631	1148-1170
	A-1075901.1	антисмысловая	asAfsauuAfaGfUfugacUfaGfacacusu su	702	
AD-558860.2	A-1072473.1	смысловая	usgsccaaGfaCfUfCfcuucauguauL96	591	928-950
	A-1075738.1	антисмысловая	asUfsacaUfgAfAfggagUfcUfuggcasg sg	662	
AD-560019.2	A-1074791.1	смысловая	asgsagaaGfuCfGfUfucauucaauL96	593	2396-2418
	A-1076897.1	антисмысловая	asUfsugaAfuGfAfaacgAfcUfucucusu sg	664	
AD-560016.2	A-1074785.1	смысловая	ascsaagaGfaAfGfUfcguuucuuuuL96	600	2393-2415
	A-1076894.1	антисмысловая	asAfsaugAfaAfCfgacuUfcUfcuugusg sa	671	

AD-559008.2	A-1072769.1	смысловая	uscsacagGfaGfCfCfaaaaaguguuL96	617	1133-1155
	A-1075886.1	антисмысловая	asAfscacUfuUfUfuggcUfcCfugugasa sg	688	
AD-559717.2	A-1074187.1	смысловая	csasggaaUfuCfCfUfgaauuuuuuuL96	660	1976-1998
	A-1076595.1	антисмысловая	asAfsuaaAfaUfUfcaggAfaUfuccugsc su	731	
AD-557072.2	A-1072789.1	смысловая	csasaaaaGfuGfUfCfuagucaacuuL96	191	1143-1165
	A-1072790.1	антисмысловая	asAfsguug(Agn)cuagacAfcUfuuuugs gsc	277	
AD-558097.2	A-1074839.1	смысловая	usasguggAfuGfUfCfugcaaaaacuL96	192	2438-2460
	A-1074840.1	антисмысловая	asGfsuuuu(Tgn)gcagacAfuCfcacuasc su	278	
AD-557774.2	A-1074193.1	смысловая	gsasauucCfuGfAfAfuuuuugacuL96	193	1979-2001
	A-1074194.1	антисмысловая	asGfsucau(Agn)aaaauucAfgGfaauucsc su	279	
AD-557070.2	A-1072785.1	смысловая	gscscaaaAfaGfUfGfucuagucaauL96	194	1141-1163
	A-1072786.1	антисмысловая	asUfsugac(Tgn)agacacUfuUfuuggcsu sc	280	
AD-558065.2	A-1074775.1	смысловая	asgsuucacCfaAfGfAfgaagucguuuL96	199	2388-2410
	A-1074776.1	антисмысловая	asAfsacga(Cgn)uucucuUfgUfgaacusa su	285	
AD-557853.2	A-1074351.1	смысловая	asgsggaaCfaAfCfUfcgagcuuuguL96	208	2078-2100

	A-1074352.1	антисмысловая	asCfsaaag(Cgn)ucgaguUfgUfucccusc sg	294	
AD-557079.2	A-1072803.1	смысловая	usgsucuaGfuCfAfAfcuuaauugauL96	211	1150-1172
	A-1072804.1	антисмысловая	asUfscaau(Tgn)aaguugAfcUfagacasc su	297	

Таблица 14

Скрининг миРНК CFB человека in vivo

	Результаты ELISA на сутки 7		Результаты ELISA на сутки 14	
	Среднее значение оставшегося белка hCFB	SD	Среднее значение оставшегося белка hCFB	SD
PBS	110,13	22,47	104,31	17,38
Наивные	96,75	21,00	92,31	6,54
AD- 558657.2	29,32	8,38	24,76	5,08
AD- 559020.2	24,26	4,07	25,05	1,22
AD- 559023.2	28,56	7,34	26,35	3,44
AD- 558860.2	52,69	4,25	50,31	17,27
AD- 560019.2	26,68	8,43	20,07	6,59
AD- 560016.2	44,06	2,59	45,94	2,69
AD- 559008.2	46,07	6,47	34,55	5,26
AD- 559717.2	57,72	11,41	51,14	13,28
AD- 557072.2	34,29	8,88	22,19	6,45
AD- 558097.2	31,01	9,59	29,55	10,60
AD- 557774.2	70,26	6,03	64,26	12,89
AD- 557070.2	91,58	21,23	71,11	18,76

AD-558065.2	120,96	14,77	82,66	44,55
AD-557853.2	94,22	24,50	81,47	18,23
AD-557079.2	101,05	17,40	97,09	15,44

Таблица 15

Скрининг миРНК CFB человека *in vivo*

Результаты кПЦР на сутки 14		
	% оставшейся мРНК	SD
PBS	100,19	7,12
Наивные	88,59	6,21
AD-558657.2	37,82	11,34
AD-559020.2	56,19	2,64
AD-559023.2	37,50	3,28
AD-558860.2	65,89	10,68
AD-560019.2	22,01	1,70
AD-560016.2	68,31	5,22
AD-559008.2	53,91	12,03
AD-559717.2	63,13	7,55
AD-557072.2	39,39	1,21
AD-558097.2	43,35	11,63
AD-557774.2	81,10	4,79
AD-557070.2	83,09	13,83
AD-558065.2	86,18	9,28
AD-557853.2	84,42	6,60
AD-557079.2	98,00	15,34

Пример 4. Скрининг *in vivo* дуплексов дцРНК на мышах

Дополнительные представляющие интерес дуплексы, идентифицированные в ходе вышеуказанных исследований *in vitro*, оценивали *in vivo*.

В частности, 6-8-недельным мышам дикого типа (C57BL/6) вводили 100 мл раствора 2×10^{11} вирусных частиц/мл вектора на основе аденоассоциированного вируса 8 (AAV8), кодирующего фактор комплемента В человека (hCFB AAV) путем внутривенной инъекции в хвостовую вену на сутки -14.

На сутки 0 мышам подкожно вводили разовую дозу 2 мг/кг представляющего

интерес дуплекса или PBS, который использовали в качестве контроля (n=3/группа). В таблице 16 представлены дуплексы, которые вводили мышам.

На сутки 0; 7 и 14 после введения дозы отбирали образцы крови и готовили плазму для анализа ELISA. На сутки 14 после введения дозы животных подвергали эвтаназии, отбирали образцы печени и быстро замораживали в жидком азоте, после чего экстрагировали тканевую мРНК.

Уровень белка CFB человека определяли сэндвич-вариантом количественного иммуноферментного анализа (AssayMax™, набор для постановки ELISA для определения фактора комплемента В человека). В таблице 17 показано, что уровни белка человеческого CFB снижались при обработке однократной дозой миРНК, нацеленной на hCFB, 2 мг/кг.

Уровень экспрессии человеческого CFB измеряли с помощью ОТ-кПЦР, как описано выше. Уровни мРНК CFB человека сравнивали с уровнем мРНК гена домашнего хозяйства GAPDH. Затем значения нормализовали к среднему значению для контрольной группы с введением носителя PBS. Данные выражали в процентах от исходного значения и представляли как среднее значение плюс стандартное отклонение. Как показано в таблице 18, уровни мРНК CFB человека снижались при обработке однократной дозой миРНК, нацеленной на hCFB, 2 мг/кг.

Таблица 16

Дуплексы дцРНК для скрининга in vivo

ID дуплекса	ID олигонуклеотида	Цепь	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Диапазон NM_001710.5
AD-560018.2	A- 1074789.1	смысловая	asasgagaAfgUfCfGfuuucauucau L96	592	2395-2417
	A- 1076896.1	антисмысловая	asUfsgaaUfgAfAfacgaCfuUfcucuusgsu	663	
AD-559375.2	A- 1073503.1	смысловая	asuscuggAfuGfUfCfuauguguuuuu L96	658	1541-1563
	A- 1076253.1	антисмысловая	asAfsaacAfcAfUfagacAfuCfcagausasa	729	
AD-559160.2	A- 1073073.1	смысловая	usasugaaGfaCfCfAfcaaguugaauL96	594	1306-1328
	A- 1076038.1	антисмысловая	asUfsucaAfcUfUfguggUfcUfucauasasu	665	
AD-559374.2	A- 1073501.1	смысловая	usasucugGfaUfGfUfcuauguguuuu L96	621	1540-1562
	A- 1076252.1	антисмысловая	asAfsacaCfaUfAfgacaUfcCfagauasasu	692	
AD-559060.2	A- 1072873.1	смысловая	usgsguguGfaAfGfCfcaagauaugu L96	653	1185-1207

	A- 1075938.1	антисмысл овая	asCfsauaUfcUfUfggcuUfcAfcacc asusa	724	
AD-559721.2	A- 1074195.1	смысловая	asasuuccUfgAfAfUfuuuauagacuu L96	650	1980-2002
	A- 1076599.1	антисмысл овая	asAfsgucAfuAfAfaauuCfaGfgaa uuscs	721	
AD-559026.2	A- 1072805.1	смысловая	gsuscuagUfcAfAfCfuuaauugagu L96	651	1151-1173
	A- 1075904.1	антисмысл овая	asCfsucaAfuUfAfaguuGfaCfuag acsasc	722	
AD-558225.2	A- 1075095.1	смысловая	usgsaauuAfaAfAfCfagcugcgacu L96	207	2602-2624
	A- 1075096.1	антисмысл овая	asGfsucgc(Agn)gcuguuUfuAfauu casasu	293	
AD-557069.2	A- 1072783.1	смысловая	asgsccaaAfaAfGfUfgucuagucauL 96	206	1140-1162
	A- 1072784.1	антисмысл овая	asUfsgacu(Agn)gacacuUfuUfugg cuscs	292	
AD-558068.2	A- 1074781.1	смысловая	uscsacaaGfaGfAfAfgucguuucau L96	195	2391-2413
	A- 1074782.1	антисмысл овая	asUfsgaaa(Cgn)gacuucUfcUfugu gasasc	281	

AD-557422.2	A- 1073489.1	смысловая	gsasggauUfaUfCfUfggaugucuau L96	202	1534-1556
	A- 1073490.1	антисмысл овая	asUfsagac(Agn)uccagaUfaAfucc ucscsc	288	
AD-558063.2	A- 1074771.1	смысловая	asusaguuCfaCfAfAfgagaagucgu L96	205	2386-2408
	A- 1074772.1	антисмысл овая	asCfsgacu(Tgn)cucuugUfgAfacu auscsa	291	
AD-558066.2	A- 1074777.1	смысловая	gsusucacAfaGfAfGfaagucguuuu L96	212	2389-2411
	A- 1074778.1	антисмысл овая	asAfsaacg(Agn)cuucucUfuGfuga acsusa	298	
AD-556701.2	A- 1072047.1	смысловая	csusacuaCfaAfUfGfugagugaugu L96	197	633-655
	A- 1072048.1	антисмысл овая	asCfsauca(Cgn)ucacauUfgUfagu agsgsg	283	

Таблица 17

Скрининг миРНК CFB человека in vivo

	Результаты ELISA на сутки 7		Результаты ELISA на сутки 14	
	Среднее значений оставшегося белка hCFB	SD	Среднее значение оставшегося белка hCFB	SD
PBS	115,67	31,44	117,68	25,52
Naïve	110,11	4,46	108,16	15,25
AD-560018.2	16,29	2,97	15,23	4,63
AD-559375.2	42,43	8,09	44,31	14,32
AD-559160.2	39,66	10,78	49,87	3,52
AD-559374.2	43,88	10,14	41,19	9,12
AD-559060.2	63,43	15,73	50,37	6,51
AD-559721.2	30,89	2,80	28,32	5,76
AD-559026.2	70,20	7,55	53,71	3,75
AD-558225.2	42,06	1,30	41,12	6,52
AD-557069.2	94,78	13,32	71,48	6,01
AD-558068.2	94,83	9,22	97,31	20,15
AD-557422.2	74,07	1,97	63,49	9,48
AD-558063.2	77,64	3,66	81,77	4,84
AD-558066.2	76,19	5,77	65,77	8,00
AD-556701.2	69,44	3,28	62,51	21,07

Скрининг миРНК CFB человека *in vivo*

Результаты кПЦР на сутки 14		
	% оставшейся мРНК	SD
PBS	100,4	9,3
Наивные	77,4	13,2
AD-560018.2	20,0	1,7
AD-559375.2	66,4	10,1
AD-559160.2	60,4	6,4
AD-559374.2	38,3	12,3
AD-559060.2	67,7	4,4
AD-559721.2	38,6	7,2
AD-559026.2	69,5	22,8
AD-558225.2	58,7	12,7
AD-557069.2	74,2	20,7
AD-558068.2	56,4	18,2
AD-557422.2	92,5	10,5
AD-558063.2	91,9	26,6
AD-558066.2	62,3	8,2
AD-556701.2	58,4	3,2

Пример 5. Конструирование и синтез дополнительных дуплексов дцРНК

Были сконструированы, синтезированы и подвергнуты отжигу дополнительные миРНК с использованием методов, известных в данной области и описанных выше в примере 1.

Подробные списки дополнительных немодифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей CFB приведены в таблице 19. Подробные списки модифицированных нуклеотидных последовательностей смысловой и антисмысловой цепей CFB приведены в таблице 20.

Скрининг однократных доз этих агентов *in vitro* и *in vivo* на клетках HepG2 проводили, как описано в приведенных выше примерах. Вкратце, клетки HepG2 трансфектировали добавлением 5 мкл Opti-MEM плюс 0,25 мкл липофектамин RNAiMax из расчета на одну лунку (Invitrogen, Carlsbad CA, номер по каталогу 13778-150) к 5 мкл каждого дуплекса миРНК в отдельной лунке в 96-луночном планшете. Затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем к смеси миРНК добавляли 40 мкл минимальной эссенциальной среды Игла (ATCC, номер по каталогу 30-2003), содержащей $\sim 2 \times 10^4$ клеток HepG2. Клетки инкубировали в течение 24 ч перед

выделением РНК. Эксперименты с однократной дозой проводили при 10 нМ. Анализы были выполнены в виде четырехкратной повторности.

Результаты скрининга однократных доз дцРНК-агентов, приведенных в таблицах 19 и 20, на клетках НерG2 показаны в таблице 21. Результаты представлены в виде среднего процента оставшейся мРНК.

Таблица 19

Немодифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК-агентов фактора комплемента 3

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательности антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Стартовый сайт в NM_001710.5	Конечный сайт в NM_001710.5	Область	Экзон
AD-558312	AAGGGAAUGUGACCAGGUCUU	1029	AAGACCUGGUCACAUUCCCUUCC	1121	153	175	5'UTR	1
AD-558336	CUGGAGUUUCAGCUUGGACAU	43	AUGUCCAAGCUGAAACUCACAGAC	129	177	199	5'UTR	1
AD-558361	CCAAGCAGACAAGCAAAGCAU	1030	AUGCUUUGCUUGUCUGCUUGGCU	1122	202	224	5'UTR	1
AD-558382	GCCAGGACACACCAUCCUGCU	1031	AGCAGGAUGGUGUGUCCUGGCUU	1123	223	245	5'UTR	1
AD-558389	CCAGCUUCUCUCCUGCCUUCU	1032	AGAAGGCAGGAGAGAAGCUGGGC	1124	250	272	5'UTR	1
AD-558407	UGCCUGAUGCCCUUUUAUCUUU	1033	AAAGAUAAAGGGCAUCAGGCAGA	1125	304	326	CDS	1
AD-558426	UGGGCCUCUUGUCUGGAGGUU	1034	AACCUCCAGACAAGAGGCCCAAG	1126	323	345	CDS	1-2
AD-558450	CCACCACUCCAUGGUCUUUGU	1035	ACAAAGACCAUGGAGUGGUGGUC	1127	347	369	CDS	2

AD-558482	UCCUUCCGACUUCUCCA AGAU	1036	AUCUUGGAGAAGUCGGAA GGAGC	112 8	418	440	CDS	2
AD-558507	AGGCACUGGAGUACGUG UGUU	1037	AACACACGUACUCCAGUG CCUGG	112 9	443	465	CDS	2
AD-558522	UGUGUCCUUCUGGGCUUC UACU	1038	AGUAGAAGCCAGAAGGAC ACACG	113 0	458	480	CDS	2
AD-558539	UACCCGUACCCUGUGCA GACU	1039	AGUCUGCACAGGGUACGG GUAGA	113 1	475	497	CDS	2
AD-558555	AGACACGUACCUGCAGA UCUU	1040	AAGAUCUGCAGGUACGUG UCUGC	113 2	491	513	CDS	2
AD-558579	AGACUCAAGACCAAAAG ACUU	1041	AAGUCUUUUGGUCUUGAG UCUUC	113 3	533	555	CDS	2
AD-558612	AGUGCAGAGCAAUCCAC UGUU	1042	AACAGUGGAUUGCUCUGC ACUCU	113 4	566	588	CDS	2-3
AD-558637	ACCACACGACUUCGAGA ACGU	1043	ACGUUCUCGAAGUCGUGU GGUCU	113 5	591	613	CDS	3
AD-558646	CCUACUACAAUGUGAGU GAUU	1044	AAUCACUCACAUUGUAGU AGGGA	113 6	632	654	CDS	3
AD-558662	UGAUGAGAUCUCUUUCC ACUU	1045	AAGUGGAAAGAGAUCA UCACU	113 7	648	670	CDS	3
AD-558679	ACUGCUAUGACGGUAC ACUU	52	AAGUGUAACCGUCAUAGC AGUGG	138	665	687	CDS	3

AD-558701	CACCUGCCAAGUGAAUG GCCU	1046	AGGCCAUUCACUUGGCAG GUGCG	113 8	705	727	CDS	3
AD-558737	AGCGAUCUGUGACAACG GAGU	66	ACUCCGUUGUCACAGAUC GCUGU	113 9	741	763	CDS	3-4
AD-558747	CAUUGGCACAAGGAAGG UGGU	1047	ACCACCUUCCUUGUGCCA AUGGG	114 0	789	811	CDS	4
AD-558778	CGCCUUGAAGACAGCGU CACU	1048	AGUGACGCUGUCUUCAAG GCGGU	114 1	820	842	CDS	4
AD-558813	GGCGAACGUGUCAGGAA GGUU	1049	AACCUUCCUGACACGUUC GCCGC	114 2	881	903	CDS	4
AD-558859	CUGCCAAGACUCCUUCA UGUU	1050	AACAUGAAGGAGUCUUGG CAGGA	114 3	927	949	CDS	4-5
AD-558879	GCCGAAGCUUCCUGUC UUCU	1051	AGAAGACAGGAAAGCUUC GGCCA	114 4	967	989	CDS	5
AD-558896	UUCCCUGACAGAGACCA UAGU	1052	ACUAUGGUCUCUGUCAGG GAAGA	114 5	984	1006	CDS	5
AD-558918	GGAGUCGAUGCUGAGGA UGGU	1053	ACCAUCCUCAGCAUCGAC UCCUU	114 6	1006	1028	CDS	5
AD-558935	CAACAGAAGCGGAAGAU CGUU	1054	AACGAUCUCCGCUUCUG UUGUU	114 7	1042	1064	CDS	6
AD-558965	UCAGGCUCCAUGAACAU CUAU	471	AUAGAUGUUCAUGGAGCC UGAAG	542	1072	1094	CDS	6

AD-558993	UAGAUGGAUCAGACAGC AUUU	1055	AAAUGCUGUCUGAUCCAUCUAGC	1148	1100	1122	CDS	6
AD-558998	GCCAGCAACUUCACAGG AGCU	1056	AGCUCCUGUGAAGUUGCU GGCCC	1149	1123	1145	CDS	6
AD-559023	AGUGUCUAGUCAACUUA AUUU	489	AAAUUAAGUUGACUAGAC ACUUU	560	1148	1170	CDS	6
AD-559040	AUUGAGAAGGUGGCAAG UUAU	1057	AUAACUUGCCACCUUCUC AAUUA	1150	1165	1187	CDS	6-7
AD-559059	AUGGUGUGAAGCCAAGA UAUU	513	AAUAUCUUGGCUUCACAC CAUAA	584	1184	1206	CDS	7
AD-559074	GAUAUGGUCUAGUGACA UAUU	495	AAUAUGUCACUAGACCAU AUCUU	566	1199	1221	CDS	7
AD-559089	AUUUGGGUCAAGUGUC UGAU	1058	AUCAGACACUUUGACCCA AAUUU	1151	1234	1256	CDS	7
AD-559112	AGACAGCAGUAAUGCAG ACUU	1059	AAGUCUGCAUUACUGCUG UCUGC	1152	1257	1279	CDS	7
AD-559143	CAGCUCAAUGAAAUCAA UUAU	478	AUAAUUGAUUUCAUUGAG CUGCU	549	1288	1310	CDS	7
AD-559163	GAAGACCACAAGUUGAA GUCU	1060	AGACUUCAACUUGUGGUC UUCAU	1153	1309	1331	CDS	7-8
AD-559184	GGGACUAACACCAAGAA GGCU	1061	AGCCUUCUUGGUGUUAGU CCCUG	1154	1330	1352	CDS	8

AD- 559208	CAGGCAGUGUACAGCAU GAUU	1062	AAUCAUGCUGUACACUGC CUGGA	115 5	1354	1376	CDS	8
AD- 559233	GGCCAGAUGACGUCCCU CCUU	1063	AAGGAGGGACGUCAUCUG GCCAG	115 6	1379	1401	CDS	8
AD- 559274	UGUCAUCAUCCUCAUGA CUGU	1064	ACAGUCAUGAGGAUGAUG ACAUG	115 7	1422	1444	CDS	8
AD- 559290	ACUGAUGGAUUGCACAA CAUU	1065	AAUGUUGUGCAAUCCAUC AGUCA	115 8	1438	1460	CDS	8-9
AD- 559306	UUACUGUCAUUGAUGAG AUCU	1066	AGAUCUCAUCAUGACAG UAAUU	115 9	1472	1494	CDS	9
AD- 559329	GACUUGCUAUACAUUGG CAAU	1067	AUUGCCAAUGUAUAGCAA GUCCC	116 0	1495	1517	CDS	9
AD- 559359	AACCCAAGGGAGGAUUA UCUU	486	AAGAUAAUCCUCCCUUGG GUUUU	557	1525	1547	CDS	9
AD- 559374	UAUCUGGAUGUCUAUGU GUUU	479	AAACACAUAGACAUCCAG AUAAU	550	1540	1562	CDS	9-10
AD- 559383	GGGCCUUUGGUGAACCA AGUU	1068	AACUUGGUUCACCAAAGG CCCGA	116 1	1567	1589	CDS	10
AD- 559398	CAAGUGAACAUCAAUGC UUUU	491	AAAAGCAUUGAUGUUCAC UUGGU	562	1582	1604	CDS	10
AD- 559421	UUCCAAGAAAGACAAUG AGCU	45	AGCUCAUUGUCUUUCUUG GAAGC	116 2	1605	1627	CDS	10

AD-559438	AGCAACAUGUGUUCAAA GUCU	1069	AGACUUUGAACACAUGUU GCUCA	116 3	1622	1644	CDS	10
AD-559455	GUCAAGGAUAUGGAAAA CCUU	1070	AAGGUUUUCCAUAUCCUU GACUU	116 4	1639	1661	CDS	10
AD-559476	GAAGAUGUUUUCUACCA AAUU	1071	AAUUUGGUAGAAAACAUC UUCCA	116 5	1660	1682	CDS	10
AD-559497	AUCGAUGAAAGCCAGUC UCUU	1072	AAGAGACUGGCUUUCAUC GAUCA	116 6	1681	1703	CDS	10-11
AD-559512	UCUCUGAGUCUCUGUGG CAUU	1073	AAUGCCACAGAGACUCAG AGACU	116 7	1696	1718	CDS	11
AD-559536	UGGGAACACAGGAAGGG UACU	1074	AGUACCCUUCCUGUGUUC CCAAA	116 8	1720	1742	CDS	11
AD-559556	CGAUUACCACAAGCAAC CAUU	1075	AAUGGUUGCUUGUGGUAA UCGGU	116 9	1740	1762	CDS	11
AD-559590	UCAGUCAUUCGCCCUUC AAAU	1076	AUUUGAAGGGCGAAUGAC UGAGA	117 0	1774	1796	CDS	11-12
AD-559610	GGGACACGAGAGCUGUA UGGU	1077	ACCAUACAGCUCUCGUGU CCCUU	117 1	1794	1816	CDS	12
AD-559616	GUGGUGUCUGAGUACUU UGUU	482	AACAAAGUACUCAGACAC CACAG	553	1819	1841	CDS	12
AD-559641	CAGCAGCACAUUGUUUC ACUU	1078	AAGUGAAACAAUGUGCUG CUGUC	117 2	1844	1866	CDS	12

AD-559670	AAGGAACACUCAAUCAA GGUU	1079	AACCUUGAUUGAGUGUUC CUUGU	117 3	1873	1895	CDS	12
AD-559704	UAGAAGUAGUCCUAUUU CACU	1080	AGUGAAAUAGGACUACUU CUAUC	117 4	1925	1947	CDS	13
AD-559706	CAACUACAACAUUAAUG GGAU	1081	AUCCCAUUA AUGUUGUAG UUGGG	117 5	1947	1969	CDS	13
AD-559722	AUUCCUGAAUUUUAUGA CUAU	492	AUAGUCAUAAAAUUCAGG AAUUC	563	1981	2003	CDS	13
AD-559740	UAUGACGUUGCCCUGAU CAAU	1082	AUUGAUCAGGGCAACGUC AUAGU	117 6	1999	2021	CDS	13
AD-559760	GCUCAAGAAUAAGCUGA AAUU	1083	AAUUUCAGCUUAUUCUUG AGCUU	117 7	2019	2041	CDS	13
AD-559788	ACUAUCAGGCCCAUUUG UCUU	466	AAGACAAAUGGGCCUGAU AGUCU	537	2047	2069	CDS	13-14
AD-559799	AGGGAACAACUCGAGCU UUGU	36	ACAAAGCUCGAGUUGUUC CCUCG	122	2078	2100	CDS	14
AD-559823	UUCCUCCAACUACCACU UGCU	1084	AGCAAGUGGUAGUUGGAG GAAGC	117 8	2102	2124	CDS	14
AD-559838	CUUGCCAGCAACAAAAG GAAU	1085	AUUCCUUUUGUUGCUGGC AAGUG	117 9	2117	2139	CDS	14-15
AD-559873	CAGGAUAUCAAGCUCU GUUU	1086	AAACAGAGCUUUGAUUAUC CUGUG	118 0	2152	2174	CDS	15

AD-559892	UUGUGUCUGAGGAGGAG AAAU	1087	AUUUCUCCUCCUCAGACA CAAAC	118 1	2171	2193	CDS	15
AD-559926	GGAGGUCUACAUCAAGA AUGU	1088	ACAUUCUUGAUGUAGACC UCCUU	118 2	2205	2227	CDS	15
AD-559946	GUGAGAGAGAUGCUCAA UAUU	473	AAUAUUGAGCAUCUCUCU CACAG	544	2243	2265	CDS	16
AD-559958	GACAAAGUCAAGGACAU CUCU	37	AGAGAUGUCCUUGACUUU GUCAU	123	2275	2297	CDS	16
AD-559973	UCGGUUCCUUUGUACUG GAGU	1089	ACUCCAGUACAAAGGAAC CGAGG	118 3	2310	2332	CDS	16
AD-559993	GAGUGAGUCCCUAUGCU GACU	1090	AGUCAGCAUAGGGACUCA CUCCU	118 4	2330	2352	CDS	16
AD-559998	UACUUGCAGAGGUGAUU CUGU	1091	ACAGAAUCACCUCUGCAA GUAUU	118 5	2355	2377	CDS	16-17
AD-560011	AGUUCACAAGAGAAGUC GUUU	27	AAACGACUUCUCUUGUGA ACUAU	113	2388	2410	CDS	17
AD-560031	UCAUUCAAGUUGGUGUA AUCU	1092	AGAUUACACCAACUUGAA UGAAA	118 6	2408	2430	CDS	17-18
AD-560040	GAGUAGUGGAUGUCUGC AAAU	1093	AUUUGCAGACAUCCACUA CUCCC	118 7	2435	2457	CDS	18
AD-560060	AACCAGAAGCGGCAAAA GCAU	1094	AUGCUUUUGCCGCUUCUG GUUUU	118 8	2455	2477	CDS	18

AD- 560099	GACUUUCACAUCAACCU CUUU	1095	AAAGAGGUUGAUGUGAAA GUCUC	118 9	2494	2516	CDS	18
AD- 560114	CUCUUUCAAGUGCUGCC CUGU	1096	ACAGGGCAGCACUUGAAA GAGGU	119 0	2509	2531	CDS	18
AD- 560138	AAGGAGAAACUCCAAGA UGAU	1097	AUCAUCUUGGAGUUUCUC CUUCA	119 1	2533	2555	CDS	18
AD- 560156	GAGGAUUUGGGUUUUCU AUAU	1098	AUAUAGAAAACCCAAAUC CUCAU	119 2	2551	2573	CDS	18
AD- 560163	CGUGGGAUUGAAUUA ACAU	506	AUGUUUAAUUCAAUCCC ACGCC	577	2594	2616	3'UTR	18
AD- 558378	GCAAGCCAGGACACACC AUCU	1099	AGAUGGUGUGUCCUGGCU UGCUU	119 3	219	241		
AD- 558393	CUUCUCUCCUGCCUCC AACU	1100	AGUUGGAAGGCAGGAGAG AAGCU	119 4	254	276		
AD- 558424	CUUGGGCCUCUUGUCUG GAGU	1101	ACUCCAGACAAGAGGCC AAGAU	119 5	321	343		
AD- 558466	AGAGAUCAAAGGCGGCU CCUU	1102	AAGGAGCCGCCUUUGAUC UCUAC	119 6	402	424		
AD- 558511	ACUGGAGUACGUGUGUC CUUU	1103	AAAGGACACACGUACUCC AGUGC	119 7	447	469		
AD- 558574	CCUGAAGACUCAAGACC AAAU	1104	AUUUGGUCUUGAGUCUUC AGGGU	119 8	528	550		

AD- 558595	GACUGUCAGGAAGGCAG AGUU	1105	AACUCUGCCUCCUGACA GUCUU	119 9	549	571		
AD- 558750	UGGCACAAGGAAGGUGG GCAU	1106	AUGCCCACCUUCCUUGUG CCAAU	120 0	792	814		
AD- 558777	CCGCCUUGAAGACAGCG UCAU	1107	AUGACGCUGUCUUCAAGG CGGUA	120 1	819	841		
AD- 559105	CUGAAGCAGACAGCAGU AAUU	1108	AAUUACUGCUGUCUGCUU CAGAC	120 2	1250	1272		
AD- 559124	UGCAGACUGGGUCACGA AGCU	1109	AGCUUCGUGACCCAGUCU GCAUU	120 3	1269	1291		
AD- 559189	UAACACCAAGAAGGCCC UCCU	1110	AGGAGGGCCUUCUUGGUG UUAGU	120 4	1335	1357		
AD- 559226	AUGAGCUGGCCAGAUGA CGUU	1111	AACGUCAUCUGGCCAGCU CAUCA	120 5	1372	1394		
AD- 559330	ACUUGCUAUACAUUGGC AAGU	1112	ACUUGCCAAUGUAUAGCA AGUCC	120 6	1496	1518		
AD- 559486	UCUACCAAUAUGAUCGAU GAAU	1113	AUUCAUCGAUCAUUUGGU AGAAA	120 7	1670	1692		
AD- 559532	GGUUUGGGAACACAGGA AGGU	1114	ACCUUCCUGUGUCCCAA ACCAU	120 8	1716	1738		
AD- 559573	CAUGGCAGGCCAAGAUC UCAU	1115	AUGAGAUCUUGGCCUGCC AUGGU	120 9	1757	1779		

AD- 559609	AGGGACACGAGAGCUGU AUGU	1116	ACAUACAGCUCUCGUGUC CCUUU	121 0	1793	1815		
AD- 559668	ACAAGGAACACUCAAUC AAGU	1117	ACUUGAUUGAGUGUCCU UGUCA	121 1	1871	1893		
AD- 559688	AAGCGGGACCUGGAGAU AGAU	1118	AUCUAUCUCCAGGUCCG CUUCU	121 2	1909	1931		
AD- 559882	AAAGCUCUGUUUGUGUC UGAU	1119	AUCAGACACAAACAGAGC UUUGA	121 3	2161	2183		
AD- 560132	UGGCUGAAGGAGAAACU CCAU	1120	AUGGAGUUUCUCCUUCAG CCAGG	121 4	2527	2549		

Таблица 20

Модифицированные последовательности смысловой и антисмысловой цепи дцРНК-агентов фактора комплемента 3

Название дуплекса	Последовательность смысловой цепи от 5' к 3''	SEQ ID NO:	Последовательности антисмысловой цепи от 5' к 3'	SEQ ID NO:	Последовательность мРНК-мишени	SEQ ID NO:
AD-558312	asasgggaAfuGfUfGfaccaggucuuL96	1215	asAfsgacCfuGfGfucacAfuUfccc uuscsc	1307	GGAAGGGAATGTG ACCAGGTCTA	1406
AD-558336	csusggagUfuUfCfAfgcuuggacauL96	215	asUfsgucCfaAfGfcugaAfaCfucca gsasc	1308	GTCTGGAGTTTCA GCTTGGACAC	1407
AD-558361	cscsaagcAfgAfCfAfagcaaagcauL96	1216	asUfsgcuUfuGfCfuuguCfuGfcuu ggscsu	1309	AGCCAAGCAGACA AGCAAAGCAA	1408
AD-558382	gscscaggAfcAfCfAfccauccugcuL96	1217	asGfscagGfaUfGfguguGfuCfcug gcsusu	1310	AAGCCAGGACACA CCATCCTGCC	1409
AD-558389	cscsagcuUfcUfCfUfccugccuucuL96	1218	asGfsaagGfcAfGfgagaGfaAfgcu ggsgsc	1311	GCCCAGCTTCTCTC CTGCCTTCC	1410
AD-558407	usgscugAfuGfCfCfcuuuauuuuL96	1219	asAfsagaUfaAfAfgggcAfuCfagg casgsa	1312	TCTGCCTGATGCCC TTTATCTTG	1411
AD-558426	usgsggccUfcUfUfGfucuggagguuL96	1220	asAfscuUfcAfGfacaGfaGfgccc asag	1313	CTTGGGCCTCTTGT CTGGAGGTG	1412
AD-558450	cscsaccaCfuCfCfAfuggucuuuguL96	1221	asCfsaaaGfaCfCfauggAfgUfggu ggsusc	1314	GACCACCACTCCA TGGTCTTTGG	1413
AD-558482	uscscuucCfgAfCfUfuccaagauL96	1222	asUfscuuGfgAfGfaaguCfgGfaag gasgsc	1315	GCTCCTTCCGACTT CTCCAAGAG	1414

AD-558507	asgsgcacUfgGfAfGfuacguguguuL 96	1223	asAfscacAfcGfUfacucCfaGfugcc usgsg	1316	CCAGGCACTGGAG TACGTGTGTC	1415
AD-558522	usgsugucCfuUfCfUfgguucuacuL 96	1224	asGfsuagAfaGfCfcagaAfgGfacac ascsg	1317	CGTGTGTCCTTCTG GCTTCTACC	1416
AD-558539	usascccgUfaCfCfCfugugcagacuL9 6	1225	asGfsucuGfcAfCfagggUfaCfggg uasgsa	1318	TCTACCCGTACCCT GTGCAGACA	1417
AD-558555	asgsacacGfuAfCfCfugcagauuuL9 6	1226	asAfsgauCfuGfCfagguAfcGfugu cusgsc	1319	GCAGACACGTACC TGCAGATCTA	1418
AD-558579	asgsacucAfaGfAfCfcaaaagacuuL9 6	1227	asAfsgucUfuUfUfggucUfuGfagu cususc	1320	GAAGACTCAAGAC CAAAGACTG	1419
AD-558612	asgsugcaGfaGfCfAfauccacuguuL 96	1228	asAfscagUfgGfAfuugcUfcUfgca cuscsu	1321	AGAGTGCAGAGCA ATCCACTGTC	1420
AD-558637	ascscacaCfgAfCfUfucgagaacguL9 6	1229	asCfsguuCfuCfGfaaguCfgUfgug guscsu	1322	AGACCACACGACT TCGAGAACGG	1421
AD-558646	cscsuacuAfcAfAfUfgugagugauuL 96	1230	asAfsucaCfuCfAfcuuGfuAfgua ggsgsa	1323	TCCCTACTACAAT GTGAGTGATG	1422
AD-558662	usgsaugaGfaUfCfUfcuuuccacuuL 96	1231	asAfsgugGfaAfAfgagaUfcUfcu cascsu	1324	AGTGATGAGATCT CTTTCCACTG	1423
AD-558679	ascsugcuAfuGfAfCfpguuacacuuL 96	224	asAfsgugUfaAfCfcgucAfuAfgca gusgsg	1325	CCACTGCTATGAC GGTTACACTC	1424
AD-558701	csasccugCfcAfAfGfugaauaggccuL 96	1232	asGfsgccAfuUfCfacuuGfgCfagg ugscsg	1326	CGCACCTGCCAAG TGAATGGCCG	1425

AD-558737	asgscgauCfuGfUfGfacaacggaguL 96	238	asCfsuccGfuUfGfucacAfgAfucg cusgsu	1327	ACAGCGATCTGTG ACAACGGAGC	1426
AD-558747	csasuuggCfaCfAfAfggaaggugguL 96	1233	asCfscacCfuUfCfcuugUfgCfcaau gsgsg	1328	CCCATTGGCACAA GGAAGGTGGG	1427
AD-558778	csgscuuGfaAfGfAfcagcgucacuL 96	1234	asGfsugaCfgCfUfgucuUfcAfagg cgsgsu	1329	ACCGCCTTGAAGA CAGCGTCACC	1428
AD-558813	gsgscgaaCfgUfGfUfcaggaagguuL 96	1235	asAfscuUfcCfUfgacaCfgUfucgc csgsc	1330	GCGGCGAACGTGT CAGGAAGGTG	1429
AD-558859	csusgccaAfgAfCfUfccuucaguL 96	1236	asAfscuGfaAfGfgaguCfuUfggc agsgsa	1331	TCCTGCCAAGACT CCTTCATGTA	1430
AD-558879	gscscgaaGfcUfUfUfccugucuucL 96	1237	asGfsaagAfcAfGfgaaaGfcUfucg gcscsa	1332	TGGCCGAAGCTTT CCTGTCTTCC	1431
AD-558896	ususccuGfaCfAfGfagaccuaguL9 6	1238	asCfsuauGfgUfCfucugUfcAfggg aasgsa	1333	TCTTCCCTGACAG AGACCATAGA	1432
AD-558918	gsgsagucGfaUfGfCfugaggaugguL 96	1239	asCfscuCfcUfCfagcaUfcGfacuc csusu	1334	AAGGAGTCGATGC TGAGGATGGG	1433
AD-558935	csasacagAfaGfCfGfgaagaucguL9 6	1240	asAfscgaUfcUfUfccgcUfuCfugu ugsusu	1335	AACAACAGAAGCG GAAGATCGTC	1434
AD-558965	uscsaggcUfcCfAfUfgaacaucuL9 6	613	asUfsagaUfgUfUfcaugGfaGfccu gasasg	684	CTTCAGGCTCCAT GAACATCTAC	1435
AD-558993	usasgaugGfaUfCfAfgacagcauuL 96	1241	asAfsaugCfuGfUfcugaUfcCfauc uasgsc	1336	GCTAGATGGATCA GACAGCATTG	1436

AD-558998	gscscagcAfaCfUfUfcacaggagcuL9 6	1242	asGfscucCfuGfUfgaagUfuGfcug gscscsc	1337	GGGCCAGCAACTT CACAGGAGCC	1437
AD-559023	asgsugucUfaGfUfCfaacuuaauuuL 96	631	asAfsauuAfaGfUfugacUfaGfaca cususu	702	AAAGTGTCTAGTC AACTTAATTG	1438
AD-559040	asusugagAfaGfGfUfggcaaguauL 96	1243	asUfsaacUfuGfCfcaccUfuCfucaa ususa	1338	TAATTGAGAAGGT GGCAAGTTAT	1439
AD-559059	asusggugUfgAfAfGfccaagauuuL 96	655	asAfsuauCfuUfGfgcuuCfaCfacca usasa	726	TTATGGTGTGAAG CCAAGATATG	1440
AD-559074	gsasuaugGfuCfUfAfgugacauuuL 96	637	asAfsuauGfuCfAfcuagAfcCfaua ucsusu	708	AAGATATGGTCTA GTGACATATG	1441
AD-559089	asusuuggGfuCfAfAfagugucugauL 96	1244	asUfscagAfcAfCfuugAfcCfcaaa ususu	1339	AAATTTGGGTCAA AGTGTCTGAA	1442
AD-559112	asgsacagCfaGfUfAfaugcagacuuL9 6	1245	asAfsgucUfgCfAfuuacUfgCfugu cusgsc	1340	GCAGACAGCAGTA ATGCAGACTG	1443
AD-559143	csasgcucAfaUfGfAfaaucauuauL9 6	620	asUfsaauUfgAfUfuucaUfuGfage ugscsu	691	AGCAGCTCAATGA AATCAATTAT	1444
AD-559163	gsasagacCfaCfAfAfguugaagucuL 96	1246	asGfsacuUfcAfAfcuugUfgGfucu ucsasu	1341	ATGAAGACCACAA GTTGAAGTCA	1445
AD-559184	gsgsgacuAfaCfAfCfcaagaaggcuL9 6	1247	asGfscuUfcUfUfggugUfuAfguc ccsusg	1342	CAGGGACTAACAC CAAGAAGGCC	1446
AD-559208	csasggcaGfuGfUfAfcagcaugauuL 96	1248	asAfsucaUfgCfUfguacAfcUfgcc ugsgsa	1343	TCCAGGCAGTGTA CAGCATGATG	1447

AD-559233	gsgsccagAfuGfAfCfguccuccuuL 96	1249	asAfsggaGfgGfAfcgucAfuCfugg ccsasg	1344	CTGGCCAGATGAC GTCCCTCCTG	1448
AD-559274	usgsucauCfaUfCfCfugaugacuguL 96	1250	asCfsaguCfaUfGfaggaUfgAfuga casusg	1345	CATGTCATCATCCT CATGACTGA	1449
AD-559290	ascsugauGfgAfUfUfgcacaacauuL 96	1251	asAfsuguUfgUfGfcaauCfcAfuca guscsa	1346	TGACTGATGGATT GCACAACATG	1450
AD-559306	ususacugUfcAfUfUfgaugagaucuL 96	1252	asGfsaucUfcAfUfcaauGfaCfagua asusu	1347	AATTACTGTCATTG ATGAGATCC	1451
AD-559329	gsascuugCfuAfUfAfcauuggcaauL 96	1253	asUfsugcCfaAfUfguauAfgCfaag ucscsc	1348	GGGACTTGCTATA CATTGGCAAG	1452
AD-559359	asascccaAfgGfGfAfggauuauuuL 96	628	asAfsgauAfaUfCfcuccCfuUfggg uususu	699	AAAACCCAAGGGA GGATTATCTG	1453
AD-559374	usasucugGfaUfGfUfcuauguguuuL 96	621	asAfsacaCfaUfAfgacaUfcCfagau asasu	692	ATTATCTGGATGTC TATGTGTTT	1454
AD-559383	gsgsgccuUfuGfGfUfgaaccaaguL 96	1254	asAfscuuGfgUfUfcaccAfaAfggc ccsgsa	1349	TCGGGCCTTTGGT GAACCAAGTG	1455
AD-559398	csasagugAfaCfAfUfcaaugcuuuuL 96	633	asAfsaagCfaUfUfgaugUfuCfacu ugsgsu	704	ACCAAGTGAACAT CAATGCTTTG	1456
AD-559421	ususccaaGfaAfAfGfacaugagcuL9 6	217	asGfscucAfuUfGfucuuUfcUfugg aasgsc	1350	GCTTCCAAGAAAG ACAATGAGCA	1457
AD-559438	asgscaacAfuGfUfGfuucaaagucuL 96	1255	asGfsacuUfuGfAfacacAfuGfuug cuscsa	1351	TGAGCAACATGTG TTCAAAGTCA	1458

AD-559455	gsuscaagGfaUfAfUfggaaaaccuuL 96	1256	asAfsgguUfuUfCfcauaUfcCfuug acsusu	1352	AAGTCAAGGATAT GGAAAACCTG	1459
AD-559476	gsasagauGfuUfUfUfcuaccaaauuL 96	1257	asAfsuuuGfgUfAfgaaaAfcAfucu ucscsa	1353	TGGAAGATGTTTT CTACCAAATG	1460
AD-559497	asuscgauGfaAfAfGfccagucucuuL 96	1258	asAfsgagAfcUfGfgcuuUfcAfucg auscsa	1354	TGATCGATGAAAG CCAGTCTCTG	1461
AD-559512	uscsucugAfgUfCfUfcugugcauuL 96	1259	asAfsugcCfaCfAfgagaCfuCfagag ascsu	1355	AGTCTCTGAGTCTC TGTGGCATG	1462
AD-559536	usgsggaaCfaCfAfGfgaaggguacluL 96	1260	asGfsuacCfcUfUfccugUfgUfucc casasa	1356	TTTGGGAACACAG GAAGGGTACC	1463
AD-559556	csgsauuaCfcAfCfAfagcaaccauuL9 6	1261	asAfsuggUfuGfCfuuguGfgUfaau cgsgsu	1357	ACCGATTACCACA AGCAACCATG	1464
AD-559590	uscsagucAfuUfCfGfccuuaaaauL9 6	1262	asUfsuugAfaGfGfgcgaAfuGfacu gasgsa	1358	TCTCAGTCATTCGC CCTTCAAAG	1465
AD-559610	gsgsgacaCfgAfGfAfgcuguaugguL 96	1263	asCfscauAfcAfGfcucuCfgUfguc ccsusu	1359	AAGGGACACGAGA GCTGTATGGG	1466
AD-559616	gsusggugUfcUfGfAfguacuuuguuL 96	624	asAfscaaAfgUfAfcucaGfaCfacca csasg	695	CTGTGGTGTCTGA GTACTTTGTG	1467
AD-559641	csasgcagCfaCfAfUfuguuucacuuL 96	1264	asAfsgugAfaAfCfaaugUfgCfuge ugsusc	1360	GACAGCAGCACAT TGTTTCACTG	1468
AD-559670	asasggaaCfaCfUfCfaaucaagguuL9 6	1265	asAfscuUfgAfUfugagUfgUfucc uusgsu	1361	ACAAGGAACACTC AATCAAGGTC	1469

AD-559704	usasgaagUfaGfUfCfcuaauucacuL 96	1266	asGfsugaAfaUfAfggacUfaCfuuc uasusc	1362	GATAGAAGTAGTC CTATTTACC	1470
AD-559706	csasacuaCfaAfCfAfuuaugggauL9 6	1267	asUfscceAfuUfAfauguUfgUfagu ugsgsg	1363	CCCAACTACAACA TTAATGGGAA	1471
AD-559722	asusuccuGfaAfUfUfuuaugacuauL 96	634	asUfsaguCfaUfAfaauUfcAfgga aususc	705	GAATTCCTGAATTT TATGACTAT	1472
AD-559740	usasugacGfuUfGfCfcugaucaauL 96	1268	asUfsugaUfcAfGfggcaAfcGfuca uasgsu	1364	ACTATGACGTTGC CCTGATCAAG	1473
AD-559760	gscsucaaGfaAfUfAfacugaaaauL 96	1269	asAfsuuuCfaGfCfuauUfcUfuga gcsusu	1365	AAGCTCAAGAATA AGCTGAAATA	1474
AD-559788	ascsuauCafGfCfCfcuuugucuuL 96	608	asAfsagacAfaAfUfgggcCfuGfaua guscsu	679	AGACTATCAGGCC CATTTGTCTC	1475
AD-559799	asgsggaaCfaAfCfUfcgagcuuuguL 96	208	asCfsaaaGfcUfCfgaguUfgUfuccc uscsu	1366	CGAGGGAACAACACT CGAGCTTTGA	1476
AD-559823	ususccucCfaAfCfUfaccacuugcuL9 6	1270	asGfscaaGfuGfGfuaguUfgGfagg aasgsc	1367	GCTTCCTCCAACATA CCACTTGCC	1477
AD-559838	csusugccAfgCfAfAfaaaaggaauL9 6	1271	asUfsuccUfuUfUfguugCfuGfgca agsusg	1368	CACTTGCCAGCAA CAAAGGAAG	1478
AD-559873	csasggauAfuCfAfAfacucuguuuL 96	1272	asAfsacaGfaGfCfuugAfuAfucc ugsusg	1369	CACAGGATATCAA AGCTCTGTTT	1479
AD-559892	ususguguCfuGfAfGfgaggagaaauL 96	1273	asUfsuucUfcCfUfccucAfgAfcaca asasc	1370	GTTTGTGTCTGAG GAGGAGAAAA	1480

AD-559926	gsgsagguCfuAfCfAfucaagaauL 96	1274	asCfsauuCfuUfGfauguAfgAfccu ccsusu	1371	AAGGAGGTCTACA TCAAGAATGG	1481
AD-559946	gsusgagaGfaGfAfUfgcucaauauL 96	615	asAfsuauUfgAfGfcaucUfcUfcuc acsasg	686	CTGTGAGAGAGAT GCTCAATATG	1482
AD-559958	gsascaaaGfuCfAfAfggacaucucuL 96	209	asGfsagaUfgUfCfcuugAfcUfuug ucsasu	1372	ATGACAAAGTCAA GGACATCTCA	1483
AD-559973	uscsgguuCfcUfUfUfguacuggaguL 96	1275	asCfsuccAfgUfAfcaaaGfgAfaccg asgsg	1373	CCTCGGTTCTTTG TACTGGAGG	1484
AD-559993	gsasgugaGfuCfCfCfuaugcugacuL 96	1276	asGfsucaGfcAfUfagggAfcUfcac ucscsu	1374	AGGAGTGAGTCCC TATGCTGACC	1485
AD-559998	usascuugCfaGfAfGfgugauucuguL 96	1277	asCfsagaAfuCfAfccucUfgCfaagu asusu	1375	AATACTTGCAGAG GTGATTCTGG	1486
AD-560011	asgsuucCfaAfGfAfgaagucguuuL 96	199	asAfsacgAfcUfUfcucuUfgUfgaa cusasu	1376	ATAGTTCACAAGA GAAGTCGTTT	1487
AD-560031	uscsauucAfaGfUfUfgguguaauL 96	1278	asGfsauuAfcAfCfcaacUfuGfaau gasasa	1377	TTTCATTCAAGTTG GTGTAATCA	1488
AD-560040	gsasguagUfgGfAfUfgucugcaauL 96	1279	asUfsuugCfaGfAfcaucCfaCfuacu cscsc	1378	GGGAGTAGTGGAT GTCTGCAAAA	1489
AD-560060	asasccagAfaGfCfGfgcaaaagcauL 96	1280	asUfsgcuUfuUfGfccgcUfuCfugg uususu	1379	AAAACCAGAAGCG GCAAAAGCAG	1490
AD-560099	gsascuuuCfaCfAfUfcaaccucuuuL 96	1281	asAfsagaGfgUfUfgaugUfgAfaag ucsusc	1380	GAGACTTTCACAT CAACCTCTTT	1491

AD-560114	csuscuuuCfaAfGfUfgcugcccuguL 96	1282	asCfsaggGfcAfGfcacuUfgAfaag agsgsu	1381	ACCTCTTTCAAGTG CTGCCCTGG	1492
AD-560138	asasggagAfaAfCfUfccaagaugauL9 6	1283	asUfscauCfuUfGfgaguUfuCfucc uuscsa	1382	TGAAGGAGAAACT CCAAGATGAG	1493
AD-560156	gsasggauUfuGfGfGfuuuucuauauL 96	1284	asUfsauaGfaAfAfacccAfaAfuccu csasu	1383	ATGAGGATTGTTGGG TTTTCTATAA	1494
AD-560163	csgsugggAfuUfGfAfauuaaaacauL 96	648	asUfsguuUfuAfAfuucaAfuCfcca cgscsc	719	GGCGTGGGATTGA ATTAAAACAG	1495
AD-558378	gscsaagcCfaGfGfAfcacaccaucuL9 6	1285	asGfsaugGfuGfUfguccUfgGfcuu gcsusu	1384	AAGCAAGCCAGGA CACACCAUCC	1496
AD-558393	csusucucUfcCfUfGfccuuccaacuL9 6	1286	asGfsuugGfaAfGfgcagGfaGfaga agscsu	1385	AGCUUCUCUCCUG CCUUCCAACG	1497
AD-558424	csusugggCfcUfCfUfugucuggaguL 96	1287	asCfsuccAfgAfCfaagaGfgCfcca gsasu	1386	AUCUUGGGCCUCU UGUCUGGAGG	1498
AD-558466	asgsagauCfaAfAfGfgcggcuccuuL 96	1288	asAfsaggGfcCfGfccuuUfgAfucu cusasc	1387	GUAGAGAUCAAAG GCGGCUCCUU	1499
AD-558511	ascsuggaGfuAfCfGfuguguccuuuL 96	1289	asAfsaggAfcAfCfacguAfcUfcca gusgsc	1388	GCACUGGAGUACG UGUGUCCUUC	1500
AD-558574	cscsugaaGfaCfUfCfaagaccaaauL9 6	1290	asUfsuugGfuCfUfugagUfcUfuca ggsgsu	1389	ACCCUGAAGACUC AAGACCAAAA	1501
AD-558595	gsascuguCfaGfGfAfaggcagaguL 96	1291	asAfscucUfgCfCfuuccUfgAfcag ucsusu	1390	AAGACUGUCAGGA AGGCAGAGUG	1502

AD-558750	usgsgcacAfaGfGfAfaggugggcauL 96	1292	asUfsgccCfaCfCfuuccUfuGfugcc asasu	1391	AUUGGCACAAGGA AGGUGGGCAG	1503
AD-558777	cscsgccuUfgAfAfGfacagcgcauL 96	1293	asUfsgacGfcUfGfucuuCfaAfggc ggsusa	1392	UACCGCCUUGAAG ACAGCGUCAC	1504
AD-559105	csusgaagCfaGfAfCfagcaguaauuL9 6	1294	asAfsuuaCfuGfCfugucUfgCfuuc agsasc	1393	GUCUGAAGCAGAC AGCAGUAAUG	1505
AD-559124	usgscagaCfuGfGfGfucacgaagcuL 96	1295	asGfscuuCfgUfGfaccAfgUfcug casusu	1394	AAUGCAGACUGGG UCACGAAGCA	1506
AD-559189	usasacacCfaAfGfAfaggcccuccuL9 6	1296	asGfsgagGfgCfCfuucuUfgGfugu uasgsu	1395	ACUAAACACCAAGA AGGCCCUCCA	1507
AD-559226	asusgagcUfgGfCfCfagaugacguuL 96	1297	asAfscguCfaUfCfuggcCfaGfcuca uscsa	1396	UGAUGAGCUGGCC AGAUGACGUC	1508
AD-559330	ascsuugcUfaUfAfCfauuggcaaguL 96	1298	asCfsuugCfcAfAfuguaUfaGfcaa guscsc	1397	GGACUUGCUAUAC AUUGGCAAGG	1509
AD-559486	uscsuaccAfaAfUfGfaucgaugaauL 96	1299	asUfsucaUfcGfAfucuuUfuGfgua gasasa	1398	UUUCUACCAAUG AUCGAUGAAA	1510
AD-559532	gsgsuuugGfgAfAfCfacaggaagguL 96	1300	asCfscuuCfcUfGfuguuCfcCfaaac csasu	1399	AUGGUUUGGGAAC ACAGGAAGGG	1511
AD-559573	csasuggcAfgGfCfCfaagaucucauL9 6	1301	asUfsgagAfuCfUfuggcCfuGfcca ugsgsu	1400	ACCAUGGCAGGCC AAGAUCUCAG	1512
AD-559609	asgsggacAfcGfAfGfagcuguauguL 96	1302	asCfsauaCfaGfCfucucGfuGfucce ususu	1401	AAAGGGACACGAG AGCUGUAUGG	1513

AD-559668	ascsaaggAfaCfAfCfucaaucaaguL9 6	1303	asCfsuugAfuUfGfagugUfuCfcuu guscsa	1402	UGACAAGGAACAC UCAAUCAAGG	1514
AD-559688	asasgcggGfaCfCfUfggagauagauL 96	1304	asUfscuaUfcUfCfcaggUfcCfcgcu uscsu	1403	AGAAGCGGGACCU GGAGAUAGAA	1515
AD-559882	asasagcuCfuGfUfUfugugucugauL 96	1305	asUfscagAfcAfCfaaacAfgAfgcu uusgsa	1404	UCAAAGCUCUGUU UGUGUCUGAG	1516
AD-560132	usgsgcugAfaGfGfAfgaaacuccauL 96	1306	asUfsggaGfuUfUfcuccUfuCfagc casgsg	1405	CCUGGCUGAAGGA GAAACUCCAA	1517

Таблица 21

Скрининг однократной дозы *in vitro* на клетках HepG2

Название дуплекса	CFB/GAPDH		
	10 нМ		
	% средней оставшейся мРНК	SD	Область-мишень NM_001710.5
AD- 560132.1	9,927	1,092	2527-2549
AD- 560099.1	9,213	1,335	2494-2516
AD- 559998.1	11,297	1,165	2355-2377
AD- 559993.1	11,852	1,080	2330-2352
AD- 559973.1	53,866	5,431	2310-2332
AD- 559882.1	10,290	1,623	2161-2183
AD- 559706.1	11,537	1,805	1947-1969
AD- 559704.1	15,239	3,563	1924-1947
AD- 559688.1	38,443	9,924	1909-1931
AD- 559668.1	10,169	0,593	1871-1893
AD- 559641.1	29,195	3,820	1844-1866
AD- 559609.1	88,678	6,099	1793-1815
AD- 559590.1	35,152	4,022	1774-1796
AD- 559573.1	38,212	6,701	1757-1779

AD-559532.1	74,766	13,877	1716-1738
AD-559486.1	24,644	9,120	1670-1692
AD-559330.1	95,265	4,050	1496-1518
AD-559274.1	13,751	2,733	1422-1444
AD-559226.1	102,524	5,658	1372-1394
AD-559208.1	16,066	2,069	1354-1376
AD-559189.1	16,100	2,031	1335-1357
AD-559124.1	15,423	2,069	1269-1291
AD-559105.1	9,673	1,193	1250-1272
AD-559089.1	10,663	2,329	1234-1256
AD-558935.1	13,757	1,222	1042-1064
AD-558879.1	14,752	3,406	967-989
AD-558777.1	14,623	2,074	819-841
AD-558750.1	16,390	2,306	792-814
AD-558637.1	24,702	7,767	591-613
AD-558612.1	12,506	1,594	566-588
AD-558595.1	11,413	1,630	549-571

AD-558574.1	12,253	1,051	528-550
AD-558555.1	12,550	1,821	491-513
AD-558511.1	10,434	4,050	447-469
AD-558482.1	47,746	10,594	418-440
AD-558466.1	17,794	3,389	402-424
AD-558450.1	11,521	2,865	347-369
AD-558424.1	23,751	5,256	321-343
AD-558407.1	14,394	1,584	304-326
AD-558393.1	14,017	1,825	254-276
AD-558378.1	18,296	0,945	219-241
AD-558361.1	15,926	1,921	202-224
AD-558312.1	27,703	7,359	153-175

Пример 6. Комбинации дцРНК-агентов, нацеленных на комбинации компонентов комплемента

Для определения того, насколько возможно эффективно подавить гемолитическую активность, используя комбинацию дцРНК-агента, нацеленного на компонент комплемента C3 (C3), и дцРНК-агента, нацеленного на компонент комплемента C5 (C5), или дцРНК-агента, нацеленного на фактор компонента комплемента В (CFB), по сравнению с использованием одних дцРНК, нацеленных только на C3, C5 или CFB, были проведены исследования с двойным восстановлением *in vitro*.

Вкратце, моделирование комбинации комплемента *in vitro* проводили с использованием сыворотки, лишенной двух компонентов комплемента, и с добавлением отдельных белков обратно в различных концентрациях. Все реагенты были приобретены у Complement Technology (Tyler, Texas), если не указано иное. Анализ гемолиза

альтернативного пути (АН) выполняли восстановлением человеческой сыворотки, обедненной компонентами комплемента C3 и CFB, с диапазоном концентраций белка C3 и CFB. Десятипроцентную восстановленную сыворотку добавляли к GVBE и 5 mM MgEGTA с 25% эритроцитов кролика (Er). Образцы инкубировали при 37°C в течение одного часа при встряхивании. Гемолиз останавливали добавлением к образцам GVBE в соотношении 1:1. Образцы центрифугировали, супернатанты переносили и измеряли оптическую плотность при длине волны 541 нм. Гемолитическую активность рассчитывали вычитанием показателя для образца отрицательного контроля и нормализацией к показателям для образцов положительного контроля, где отрицательный контроль представлял собой буфер и только Er, и положительный контроль представлял собой воду и только Er.

Результаты двойного нацеливания на C3 и CFB приведены на фиг. 2А. В частности, гемолитическая активность (гемолиз альтернативного пути, АН) в сыворотке крови человека, лишенной C3 и CFB, показана в виде тепловой карты, где более высокие уровни гемолиза обозначены средне-серым цветом (верхний левый угол, «нормальный диапазон»), и более низкие - более темным серым цветом. Концентрация C3 отложена по оси Y, и концентрация CFB - на оси X.

Нормальные уровни CFB и C3 обеспечивали полную гемолитическую активность. Снижение уровня либо C3, либо CFB приводило к снижению гемолитической активности. Введение миРНК приматам, отличным от человека, показало, что уровни C3 могут быть снижены до уровней 200 мкг/мл; предполагается, что аналогичное снижение будет иметь место в сыворотке крови человека. Принимая 200 мкг/мл за начальный уровень C3, на фиг. 2А показано, что подавление CFB примерно до 40 мкг/мл (примерно 80% сайленсинг) снижает гемолитическую активность до уровней ниже 10%. Следовательно, двойное воздействие на C3 и CFB может обеспечить почти полное подавление АН.

Следует отметить, что подавление CFB не влияет на гемолиз классического пути (СН), поэтому данные по комбинации для СР не получали.

На фиг. 2В представлены результаты ответа на двойную дозу C3 и C5 в истощенной сыворотке, восстановленной различными концентрациями C3 и C5 и анализированной на АН, как описано выше. C3 откладывали на оси Y, и C5 - на оси X. Нормальные уровни как C3, так и C5 обеспечивали высокие уровни гемолитической активности; снижение уровня C5 снижало АН. Зависимость доза-ответ для C3 также наблюдалась. Хотя известно, что введение дцРНК-агента, нацеленного на C5, цемдисирана, людям может привести к сайленсингу C5 в диапазоне примерно 1-3 мкг/мл, дальнейшее снижение гемолитической активности может быть достигнуто за счет одновременного снижения уровня белка C3.

Эффект двойного нацеливания на C3 и C5 на гемолитическую активность классического пути также оценивали с использованием анализа гемолиза классического пути (СН). Человеческая сыворотка, обедненная C3 и C5, была восстановлена с использованием ряда концентраций белков C3 и C5. Восстановленную сыворотку (0,7%) добавляли к GVB⁺⁺ с 13,4% сенсibilизированными антителами бараньих эритроцитов (ЕА). Образцы инкубировали при 37°C в течение одного часа при встряхивании. Образцы

центрифугировали, супернатанты переносили и измеряли оптическую плотность при длине волны 541 нм. Гемолитическую активность рассчитывали вычитанием показателя для образца отрицательного контроля и нормализацией к показателям для образцов положительного контроля, где отрицательный контроль представлял собой буфер и только Ег, и положительный контроль представлял собой воду и только Ег.

На фиг. 2С представлены результаты экспериментов с восстановлением C3 и C5 СН; они демонстрируют, что нацеливание как на C3, так и на C5 приводило к положительному эффекту на СН. Наблюдаемый эффект подавления C3 на активность СН, когда C5 составляет ≤ 3 мкг/мл, не может быть оценен путем определения уровня образования активного C5b-9 для оценки активности гемолиза классического пути с использованием анализа комплемента классического пути Wieslab® (CCP) (фиг. 2D). Анализ CCP (Wieslab® COMPL CP310, IBL America) проводили в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, моделирование комбинации комплемента *in vitro* проводили с использованием сыворотки, лишенной двух компонентов комплемента, и с добавлением отдельных белков обратно в различных концентрациях. Человеческую сыворотку, лишенную компонентов комплемента C3 и C5, восстанавливали с использованием ряда концентраций белка C3 и C5. Восстановленные обедненные сыворотки разводили до конечной концентрации сыворотки 1:101. Образцы добавляли в лунки, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали три раза, после чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора конъюгата. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем трижды промывали. В каждую лунку добавляли раствор субстрата (100 мкл) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 5 мМ ЭДТА и измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм. Активность рассчитывали вычитанием холостого контроля из всех значений и последующей нормализацией к положительному контролю.

Способность комбинации дцРНК-агента, нацеленного на компонент комплемента C3 (C3), и дцРНК-агента, нацеленного на компонент комплемента C5 (C5) или фактор компонента комплемента В (CFB), дополнительно подавлять гемолитическую активность по сравнению с использованием каждой одной дцРНК, нацеленной на C3, C5 или только CFB также оценивали *in vivo* на приматах, отличных от человека (NHP), яванских макаках (*Macaca fascicularis*).

Яванским макакам подкожно вводили однократную дозу 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3; или дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или дцРНК-агента, нацеленного на C5; или однократную дозу 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3, и дозу 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB; или однократную дозу 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3, и дозу 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C5; или однократную дозу 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB, и дозу 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C5, на сутки 1. Дизайн исследования показан в таблице ниже.

Группа	Мишень(и)	Тестируемый объект	Доза, путь	Доза (мг/кг)	Количество	Схема введения	Окончание исследования
--------	-----------	--------------------	------------	--------------	------------	----------------	------------------------

			введен ия	г)	животны х самцов		ия
2	C3	AD-570714	подкож ноQ	6	3	Сутки 1	Сутки 29
3	CFB	AD-560018	подкож ноQ	6	3	Сутки 1	Сутки 29
4	C5	AD-61679	подкож ноQ	6	3	Сутки 1	Сутки 29
5	C3 CFB	AD-570714 AD-560018	подкож ноQ	6 6	3	Сутки 1	Сутки 29
6	C3 C5	AD-570714 AD-61679	подкож ноQ	6 6	3	Сутки 1	Сутки 29
7	CFB C5	AD-560018 AD-61679	подкож ноQ	6 6	3	Сутки 1	Сутки 29

На сутки -6, до введения и на сутки 8, 15, 22 и 29 после введения дозы получали образцы сыворотки от NHP, и определяли уровни белков C3, C5 и CFB, а также гемолитическую активность альтернативного и классического с использованием Wieslab® CAP и CCP.

Уровень белка C3 определяли с использованием ELISA. Вкратце, белок C3 измеряли с помощью перекрестно-реактивного варианта ELISA для яванского макака (набор для ELISA для человеческого компонента комплемента C3, Hycult HK366) в соответствии с протоколом производителя. Сыворотку разводили в соотношении 1:40000. Уровни C3 нормализовали к уровням у отдельных животных до введения дозы для определения процента оставшегося C3.

Уровень белка C5 также определяли с использованием ELISA. Вкратце, C5 измеряли с помощью перекрестно-реактивного варианта ELISA для яванского макака (набор для ELISA для человеческого компонента комплемента C5, Abcam ab125963) в соответствии с протоколом производителя. Сыворотку разбавляли в соотношении 1:20000 для образцов до введения дозы и на сутки 8, и 1:5000 для образцов с сайленсингом на сутки 12, 22 и 29. Уровни C5 нормализовали к уровням у отдельных животных до введения дозы для определения оставшегося % C5.

CFB в сыворотке измеряли в разведении 1:20 с использованием количественного анализа вестерн-блоттинга с использованием гелей Bis-Tris 4-12% и визуализировали на Li-Cor Odyssey CLx. (1°: ProteinTech 10170-1-AP 1:50, 2°: антикроличьи козы HRP антитела).

Определяли гемолитическую активность альтернативного и классического пути. Анализ гемолиза альтернативного пути у NHP выполняли, как кратко описано. Сыворотку (5,6%) добавляли к GVB° (Complement Technology, Tyler, Texas) и 5 mM MgEGTA с 25% эритроцитами кролика (Er, Complement Technology, Tyler, Texas). Образцы инкубировали

при 37°C в течение 1 ч при встряхивании. Гемолиз останавливали добавлением к образцам GVBE (Complement Technology, Tyler, Texas) в соотношении 1:1. Образцы центрифугировали, супернатанты переносили и измеряли оптическую плотность при длине волны 541 нм. Гемолитическую активность рассчитывали вычитанием показателя для образца отрицательного контроля и нормализацией к показателям для образцов положительного контроля, где отрицательный контроль представлял собой буфер и только Ег, и положительный контроль представлял собой воду и только Ег. Затем образцы отдельных животных нормализовали к средним показателям их образцов до введения дозы. Анализ гемолиза классического пути у NHP проводили, как кратко описано. 1,77% сыворотки добавляли к GVB++ (Complement Technology, Tyler, Texas) с 13,4% сенсibilizированными антителами овечьих эритроцитов (ЕА, Complement Technology, Tyler, Texas). Образцы инкубировали при 37°C в течение 1 ч при встряхивании. Образцы центрифугировали, супернатанты переносили и измеряли оптическую плотность при длине волны 541 нм. Гемолитическую активность рассчитывали вычитанием показателя для образца отрицательного контроля и нормализацией к показателям для образцов положительного контроля, где отрицательный контроль представлял собой буфер и только Ег, и положительный контроль представлял собой воду и только Ег. Затем образцы отдельных животных нормализовали к средним показателям для их образцов до введения дозы.

Уровень образования активного C5b-9 для оценки гемолитической активности альтернативного пути и гемолитической активности классического пути также определяли с использованием анализа классического пути комплемента Wieslab® (CCP), как описано выше, и анализа альтернативного пути комплемента Wieslab® (CAP). Анализ CAP (COMPL AP330 RUO, IBL America) проводили в соответствии с протоколом производителя. Сыворотки разводили до конечной концентрации сыворотки 1:18. Образцы добавляли в лунки, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали 3 раза, после чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора конъюгата. Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем промывали 3 раза. В каждую лунку добавляли раствор субстрата (100 мкл) и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 5 мМ ЭДТА и измеряли оптическую плотность при длине волны 405 нм. Активность рассчитывали вычитанием холостого контроля из всех значений и последующей нормализацией к положительному контролю. Затем значения активности как для CAP, так и для CCP нормализовали к среднему показателю у отдельных животных до введения дозы.

Результаты этих анализов приведены на фиг. 3А-3Е. В частности, на фиг. 3А показано, что однократная доза 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3, подавляла белок C3 до 90% (~ 110 мкг/мл) в сыворотке. Как и ожидалось, подавление CFB дцРНК-агентом, нацеленным на CFB, вызывало незначительное увеличение уровней белка C3. На фиг. 3А также показано, что сайленсинг C5 дцРНК-агентом, нацеленным на C5, не повлиял на уровни белка C3 и что ни дцРНК-агент, нацеленный на C3, ни дцРНК-агент, нацеленный на

CFB, не оказали влияния на уровни белка C5.

На фиг. 3B показано, что однократная доза дцРНК-агента 6 мг/кг, нацеленная на C3, или однократная доза дцРНК-агента 6 мг/кг, нацеленная на CFB, показала одинаковое подавление гемолиза альтернативного пути (супрессия примерно 60%), и комбинация однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3, и дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на CFB, подавляла гемолиз альтернативного пути примерно на 90%. На фиг. 3C показано, что комбинация однократной дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C3, и дозы 6 мг/кг дцРНК-агента, нацеленного на C5, оказывает наибольшее влияние на гемолиз классического пути.

Как показано на фиг. 3D, с использованием анализа альтернативного пути комплемента Wieslab® (CAP) сайленсинг либо CFB, либо C3, либо сайленсинг CFB и C3, CFB и C5, а также C3 и C5 приводил к ингибированию активности альтернативного пути. Сайленсинг C5 сам по себе имел промежуточный эффект в анализе Wieslab® CAP.

На фиг. 3E показано, что подавление C3 или CFB не дает преимуществ в подавлении активности классического пути, кроме подавления C5.

Таким образом, комбинация дцРНК-агента, нацеленного на C3, и дцРНК-агента, нацеленного на CFB, эффективно подавляла активность гемолиза альтернативного пути менее чем примерно до 10%, в то время как комбинация дцРНК-агента, нацеленного на C3, и дцРНК-агента, нацеленного на C5, эффективно подавляла активность гемолиза классического пути.

Эквиваленты

Специалисты в данной области знают или смогут установить, используя не более чем обычное экспериментирование, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления и способов, описанных в настоящем документе. Полагается, что такие эквиваленты охватываются объемом следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где антисмысловая цепь содержит область комплементарности к мРНК, кодирующей CFB, и где область комплементарности содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на 3 нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей антисмысловой цепи, представленных в любой из таблиц 2-7, 13, 16, 19 и 20.

2. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 633-665, 1133-1185, 1133-1173, 1133-1167, 1143-1173, 1540-1563, 1976-2002, 2386-2438, 2386-2418, 2386-2413 и 2389-1418 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8, где замещение Т на U в либо SEQ ID NO: 1, либо SEQ ID NO: 8 не рассматривается в качестве различия.

3. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 633-655, 643-665, 928-950, 1133-1155, 1140-1162, 1141-1163, 1143-1165, 1145-1167, 1148-1170, 1150-1172, 1151-1173, 1185-1207, 1306-1328, 1534-1556, 1540-1562, 1541-1563, 1976-1998, 1979-2001, 1980-2002, 2078-23860, 2078-23860, 2388-2410, 2389-2411, 2391-2413, 2393-2415, 2395-2417, 2396-2418, 2438-2460 и 2602-2624 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO:8, где замещение Т на U либо в SEQ ID NO:1, либо в SEQ ID NO:8 не рассматривается в качестве различия.

4. дцРНК-агент по любому из пп.1-3, где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей дуплекса антисмысловой цепи, выбранного из группы, состоящей из AD-560018, AD-559375, AD-559160, AD-559374, AD-559060, AD-559721, AD-559026, AD-558225, AD-557069, AD-558068, AD-557422, AD-558063, AD-558066, AD-556701, AD-558657, AD-559020, AD-559023, AD-558860, AD-560019, AD-560016, AD-559008, AD-559717, AD-557072, AD-558097, AD-557774, AD-557070, AD-558065, AD-557853, AD-557079.

5. Двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (дцРНК) для ингибирования экспрессии фактора комплемента В (CFB) в клетке, где указанная дцРНК содержит смысловую цепь и антисмысловую цепь, образующие двухцепочечную область, где смысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающиеся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей нуклеотидов 153-175; 202-224; 219-241; 254-276; 304-326; 321-343; 347-369; 402-424; 418-440; 447-469; 491-513; 528-550; 549-571; 566-588; 591-613; 792-814; 819-841; 967-989; 1042-1064; 1234-1256; 1250-1272; 1269-1291; 1335-1357; 1354-1376; 1372-1394; 1422-1444; 1496-1518; 1670-1692; 1716-1738; 1757-1779; 1774-1796; 1793-1815; 1844-1866; 1871-1893; 1909-1931; 1924-1947; 1947-1969; 2161-2183; 2310-2332; 2330-2352; 2355-2377; 2494-2516 и 2527-2549 SEQ ID NO: 1, и антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов из соответствующей нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 8, где замещено Т на U либо в SEQ ID NO: 1, либо SEQ ID NO: 8 не рассматривается в качестве различия.

6. дцРНК-агент по пп.1 или 5, где антисмысловая цепь содержит, по меньшей мере, 15 последовательных нуклеотидов, отличающихся не более чем на три нуклеотида, из любой из нуклеотидных последовательностей дуплекса антисмысловой цепи, выбранного из группы, состоящей из AD-560132.1; AD-560099.1; AD-559998.1; AD-559993.1; AD-559973.1; AD-559882.1; AD-559706.1; AD-559704.1; AD-559688.1; AD-559668.1; AD-559641.1; AD-559609.1; AD-559590.1; AD-559573.1; AD-559532.1; AD-559486.1; AD-559330.1; AD-559274.1; AD-559226.1; AD-559208.1; AD-559189.1; AD-559124.1; AD-559105.1; AD-559089.1; AD-558935.1; AD-558879.1; AD-558777.1; AD-558750.1; AD-558637.1; AD-558612.1; AD-558595.1; AD-558574.1; AD-558555.1; AD-558511.1; AD-558482.1; AD-558466.1; AD-558450.1; AD-558424.1; AD-558407.1; AD-558393.1; AD-558378.1; AD-558361.1; AD-558312.1.

7. дцРНК-агент по любому из пп. 1-6, где дцРНК-агент содержит, по меньшей мере, один модифицированный нуклеотид.

8. дцРНК-агент по любому из пп.1-7, где по существу все нуклеотиды смысловой цепи; по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или по существу все нуклеотиды смысловой цепи и по существу все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

9. дцРНК-агент по любому из пп.1-8, где все нуклеотиды смысловой цепи содержат модификацию; все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию; или все нуклеотиды смысловой цепи и все нуклеотиды антисмысловой цепи содержат модификацию.

10. дцРНК-агент по любому из пп.7-9, 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'-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 фосфоротиоатную группу, нуклеотида, содержащего метилфосфонатную группу, нуклеотида, содержащего 2'-фосфат, нуклеотида, содержащего 5'-фосфат или миметик 5'-фосфата, термически дестабилизирующего нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида и 2'-О-(N-метилацетамид)-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

11. дцРНК-агент по любому из пп.7-9, где модификации нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из LNA, HNA, CeNA, 2'-метоксиэтил-, 2'-О-алкил-, 2'-О-аллил-, 2'-С-аллил-, 2'-фтор-, 2'-дезоксид-, 2'-гидроксил-модифицированного и гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA); и их комбинаций.

12. дцРНК по любому из пп.7-9, где, по меньшей мере, один из модифицированных нуклеотидов выбран из группы, состоящей из дезоксинуклеотида, 2'-О-метил-модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, 2'-дезоксид-модифицированного нуклеотида, гликоль-модифицированного нуклеотида (GNA), нуклеотида, содержащего 2'-фосфат, винилфосфонат-модифицированного нуклеотида и 2'-О-гексадецил-модифицированного нуклеотида; и их комбинаций.

13. дцРНК по любому из пп.7-9, где, по меньшей мере, одна из модификаций нуклеотидов представляет собой термически дестабилизирующую модификацию нуклеотида.

14. дцРНК по п.13, где термически дестабилизирующая модификация нуклеотида выбрана из группы, состоящей из абазической модификации; несовпадения с противоположным нуклеотидом в дуплексе; и дестабилизирующей модификации сахара, 2'-дезоксид-модификации, ациклического нуклеотида, разблокированной нуклеиновой кислоты (UNA) и глицериновой нуклеиновой кислоты (GNA).

15. дцРНК-агент по любому из пп.1-14, где двухцепочечная область имеет 19-30 пар нуклеотидов в длину.

16. дцРНК-агент по п.15, где двухцепочечная область имеет 19-25 пар нуклеотидов в длину.

17. дцРНК-агент по п.15, где двухцепочечная область имеет 19-23 пар нуклеотидов в длину.

18. дцРНК по п.15, где двухцепочечная область имеет 23-27 пар нуклеотидов в длину.

19. дцРНК-агент по п. 15, где двухцепочечная область имеет 21-23 пар нуклеотидов в длину.

20. дцРНК-агент по любому из пп.1-19, где каждая цепь независимо имеет не более 30 нуклеотидов в длину.

21. дцРНК-агент по любому из пп. 1-20, где смысловая цепь имеет 21 нуклеотид в длину, и антисмысловая цепь имеет 23 нуклеотида в длину.

22. дцРНК-агент по любому из пп.1-21, где область комплементарности имеет, по меньшей мере, 17 нуклеотидов в длину.

23. дцРНК-агент по любому из пп.1-22, где область комплементарности имеет 19-23 нуклеотида в длину.

24. дцРНК-агент по любому из пп.1-21, где область комплементарности имеет 19-21 нуклеотида в длину.

25. дцРНК-агент по любому из пп.1-24, где, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 1 нуклеотида.

26. дцРНК-агент по любому из пп. 1-24, где, по меньшей мере, одна цепь содержит 3'-выступ, по меньшей мере, из 2 нуклеотидов.

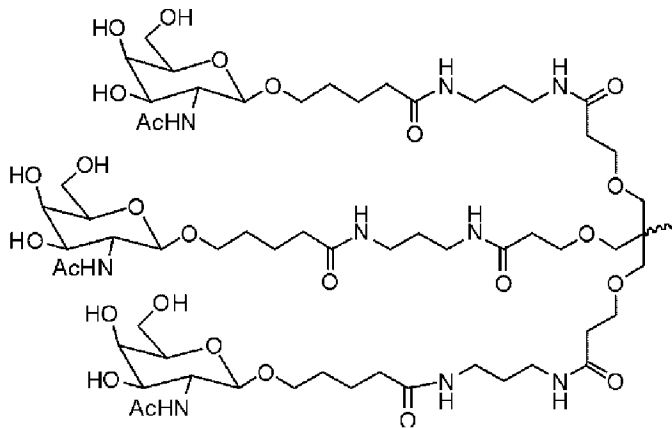
27. дцРНК-агент по любому из пп. 1-26, дополнительно содержащий лиганд.

28. дцРНК-агент по п.27, где лиганд конъюгирован с 3'-концом смысловой цепи дцРНК-агента.

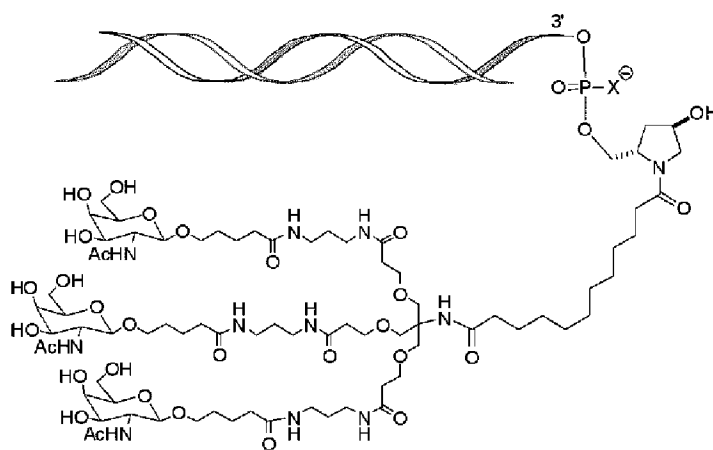
29. дцРНК-агент по п.27 или 28, где лиганд представляет собой производное N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

30. дцРНК-агент по любому из пп.27-29, где лиганд представляет собой одно или более производных GalNAc, присоединенных через одновалентный, двухвалентный или трехвалентный разветвленный линкер.

31. дцРНК-агент по п.29 или 30, где лиганд представляет собой:



32. дцРНК-агент по п.31, где дцРНК-агент конъюгирован с лигандом, как показано на следующей схеме:



и где X представляет собой O или S.

33. дцРНК-агент по п.32, где X представляет собой O.

34. дцРНК-агент по любому из пп.1-33, где дцРНК-агент дополнительно содержит, по меньшей мере, одну фосфоротиаатную или метилфосфонатную межнуклеотидную связь.

35. дцРНК-агент по п.34, где фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 3'-конце одной цепи.

36. дцРНК-агент по п.35, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

37. дцРНК-агент по п.35, где цепь представляет собой смысловую цепь.

38. дцРНК-агент по п.34, где фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится на 5'-конце одной цепи.

39. дцРНК-агент по п.38, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

40. дцРНК-агент по п.38, где цепь представляет собой смысловую цепь.

41. дцРНК-агент по п.34, где фосфоротиаатная или метилфосфонатная межнуклеотидная связь находится как на 5'-, так и на 3'-конце одной цепи.

42. дцРНК-агент по п.41, где цепь представляет собой антисмысловую цепь.

43. дцРНК-агент по любому из пп.1-42, где пара оснований в положении 1 от 5'-конца антисмысловой цепи дуплекса представляет собой пару оснований AU.

44. Клетка, содержащая дцРНК-агент по любому из пп.1-43.

45. Фармацевтическая композиция для ингибирования экспрессии гена, кодирующего фактор комплемента В (CFB), содержащая дцРНК-агент по любому из пп.1-43.

46. Фармацевтическая композиция по п.45, где дцРНК-агент находится в незабуферном растворе.

47. Фармацевтическая композиция по п.46, где незабуференный раствор представляет собой физиологический раствор или воду.

48. Фармацевтическая композиция по п.42, где указанный дцРНК-агент находится в буферном растворе.

49. Фармацевтическая композиция по п.48, где буферный раствор содержит ацетат, цитрат, проламин, карбонат или фосфат или любую их комбинацию.

50. Фармацевтическая композиция по п.49, где буферный раствор представляет собой забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS).

51. Способ ингибирования экспрессии гена фактора комплемента В (CFB) в клетке, включающий приведение клетки в контакт с дцРНК-агентом по любому из пп.1-43 или фармацевтической композицией по любому из пп.45-50, тем самым ингибируя экспрессию гена CFB в клетке.

52. Способ по п. 51, где клетка находится в организме субъекта.

53. Способ по п. 52, где субъектом является человек.

54. Способ по п.53, где у субъекта имеется расстройство, ассоциированное с фактором комплемента В (CFB).

55. Способ по любому из пп.51-54, где приведение в контакт клетки с дцРНК-агентом ингибирует экспрессию фактора комплемента В, по меньшей мере, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

56. Способ по любому из пп.51-55, где ингибирование экспрессии фактора комплемента В снижает уровень белка фактора комплемента В в сыворотке субъекта, по меньшей мере, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95%.

57. Способ лечения субъекта, имеющего расстройство, при котором было бы полезно снижение экспрессии фактора комплемента В, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества дцРНК-агента по любому из пп.1-43 или фармацевтической композиции по любому из пп.45-50, тем самым обеспечивая лечение субъекта, имеющего расстройство, при котором было бы полезно снижение экспрессии фактора В комплемента.

58. Способ профилактики, по меньшей мере, одного симптома у субъекта, имеющего расстройство, при котором было бы полезно снижение экспрессии фактора комплемента В, включающий введение субъекту профилактически эффективного количества дцРНК-агента по любому из пп.1-43, или фармацевтической композиции по любому из пп.45-50, тем самым обеспечивая профилактику, по меньшей мере, одного симптома у субъекта, имеющего расстройство, при котором было бы полезно снижение экспрессии фактора В комплемента.

59. Способ по п.57 или 58, где расстройство представляет собой расстройство, ассоциированное с фактором комплемента В.

60. Способ по п.59, где заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), астмы, ревматоидного артрита (РА); антифосфолипидного синдрома; волчаночного нефрита; ишемически-реперфузионного повреждения; типичного или инфекционного гемолитико-уремического синдрома (tHUS); болезни плотных отложений (DDD); оптиконевромиелита (NMO); мультифокальной моторной невропатии (MMN); рассеянного склероза (MS); макулярной дегенерации (например, возрастной макулярной дегенерации (AMD)); гемолиза, повышенной активности ферментов печени и синдрома низкого уровня тромбоцитов

(HELLP); тромботической тромбоцитопенической пурпуре (ТТП); спонтанной потери плода; малоиммунного васкулита; буллезного эпидермолиза; рецидивирующей потери плода; преэклампсии, черепно-мозговой травмы, миастении гравис, болезни холодových агглютининов, буллезного пемфигоида, дерматомиозита, гемолитико-уремического синдрома, ассоциированного с шига-токсин-продуцирующей *E. coli*, нейропатии С3, васкулита, ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (например, гранулематоза с полиангиитом (ранее известного как гранулематоз Вегенера), синдрома Черджа-Стросса и микроскопического полиангиита), гуморального и васкулярного отторжения трансплантата, дисфункции трансплантата, инфаркта миокарда (например, повреждения тканей и ишемии при инфаркте миокарда), аллогенного трансплантата, сепсиса (например, неблагоприятный исход при сепсисе), ишемической болезни сердца, дерматомиозита, болезни Грейвса, атеросклероза, болезни Альцгеймера, системного воспалительного ответа, сепсиса, септического шока, повреждения спинного мозга, гломерулонефрита, тиреоидита Хашимото, сахарного диабета I типа, псориаза, пемфигуса, аутоиммунной гемолитической анемии (АИНА), ИТР, синдрома Гудпасчера, болезни Дегоса, антифосфолипидного синдрома (APS), катастрофического APS (CAPS), сердечно-сосудистого расстройства, миокардита, цереброваскулярного расстройства, периферического (например, скелетно-мышечного) васкулярного расстройства, реноваскулярной болезни, мезентериального/кишечнососудистого расстройства, нефрита при пурпуре Шенлейна-Геноха, васкулита, ассоциированного с системной красной волчанкой, васкулита, ассоциированного с ревматоидным артритом, иммунного комплексного васкулита, болезни Такаясу, дилатационной кардиомиопатии, диабетической ангиопатии, болезни Кавасаки (артериита), венозной газовой эмболии (VGE) и рестеноза после установки стента, ротационной атерэктомии и чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (РТСА).

61. Способ по п.59, где заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии, поликистозной болезни почек, мембранозной нефропатии, возрастной макулярной дегенерации, атипичного гемолитико-уремического синдрома, тромботической микроангиопатии, миастении гравис, ишемии и реперфузионного повреждения, пароксизмальной ночной гемоглобинурии и ревматоидного артрита.

62. Способ по п.59, где заболевание, ассоциированное с фактором комплемента В, выбрано из группы, состоящей из гломерулопатии С3, системной красной волчанки (SLE), например, волчаночного нефрита, IgA-нефропатии, диабетической нефропатии и поликистозной болезни почек.

63. Способ по любому из пп.57-62, где субъектом является человек.

64. Способ по любому из пп.57-63, где дцРНК-агент вводят субъекту в дозе примерно от 0,01 мг/кг до 50 мг/кг или в дозе примерно 5 мг или 1000 мг.

65. Способ по любому из пп.57-64, где дцРНК-агент вводят субъекту подкожно.

66. Способ по любому из пп.57-65, дополнительно включающий введение субъекту средства для лечения заболевания, ассоциированного с CFB.

67. Способ по любому из пп.57-65, дополнительно включающий введение субъекту иРНК-агента, нацеленного на компонент комплемента C5, или иРНК-агента, нацеленного на компонент комплемента C3.

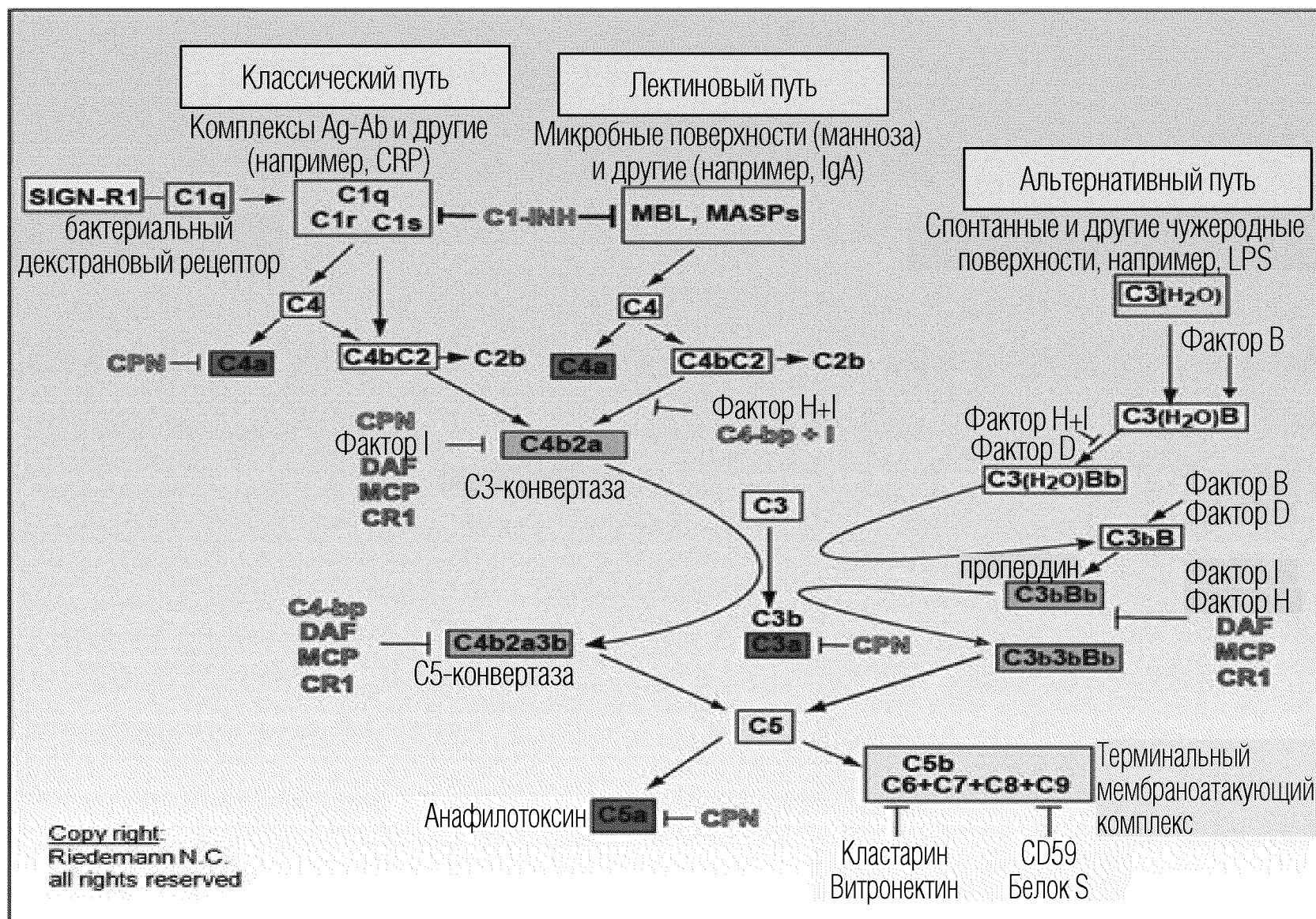
68. Способ по любому из пп.57-67, дополнительно включающий определение уровня фактора комплемента В в образце(ах) субъекта.

69. Способ по п. 68, где уровень фактора комплемента В в образце(ах) субъекта представляет собой уровень белка фактора комплемента В в образце(ах) крови или сыворотки.

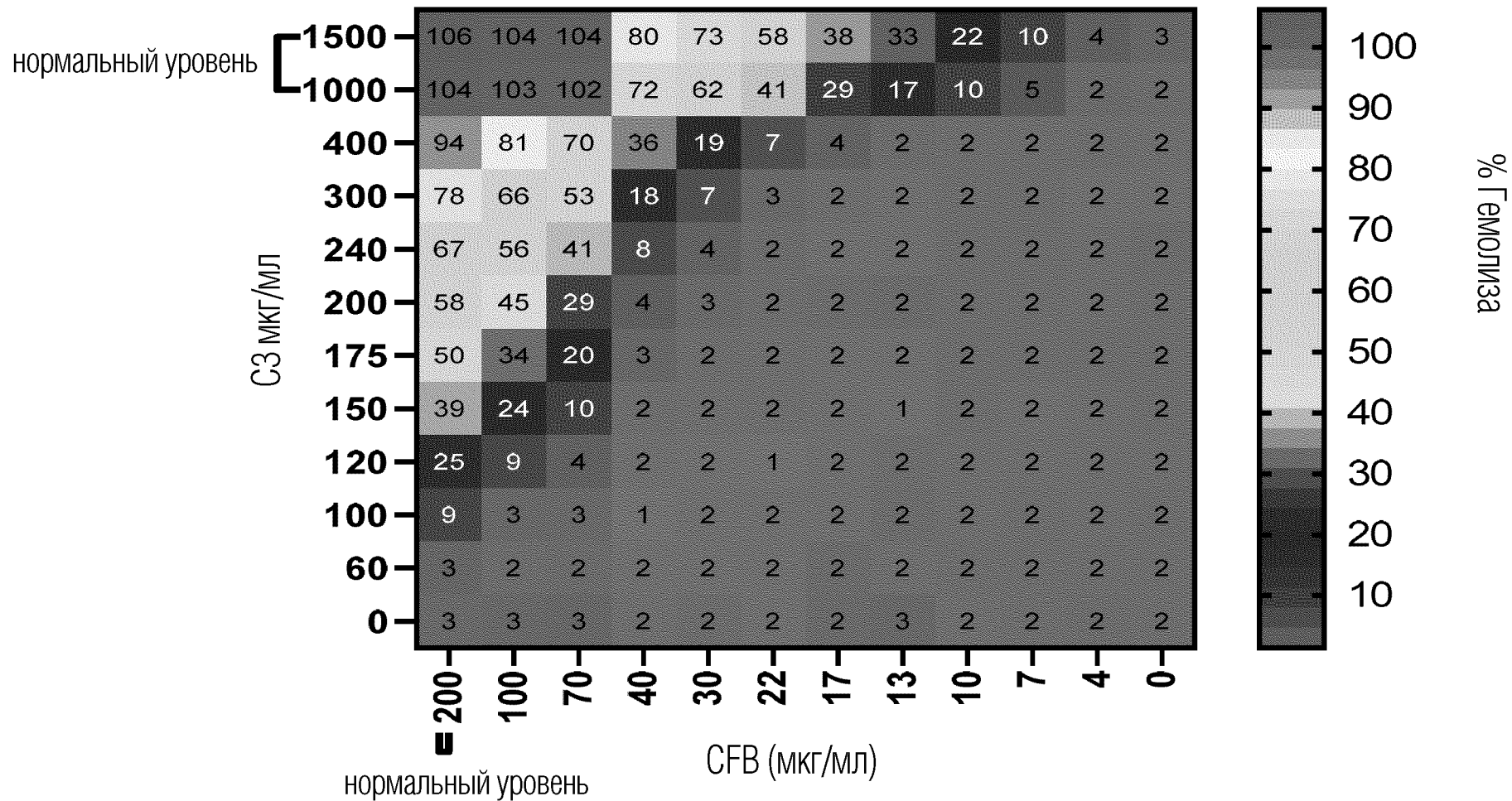
70. Набор, содержащий дцРНК-агент по любому из пп.1-43 или фармацевтическую композицию по любому из пп.45-50.

71. Флакон, содержащий дцРНК-агент по любому из пп.1-43 или фармацевтическую композицию по любому из пп.45-50.

72. Шприц, содержащий дцРНК-агент по любому из пп.1-43 или фармацевтическую композицию по любому из пп.45-50.

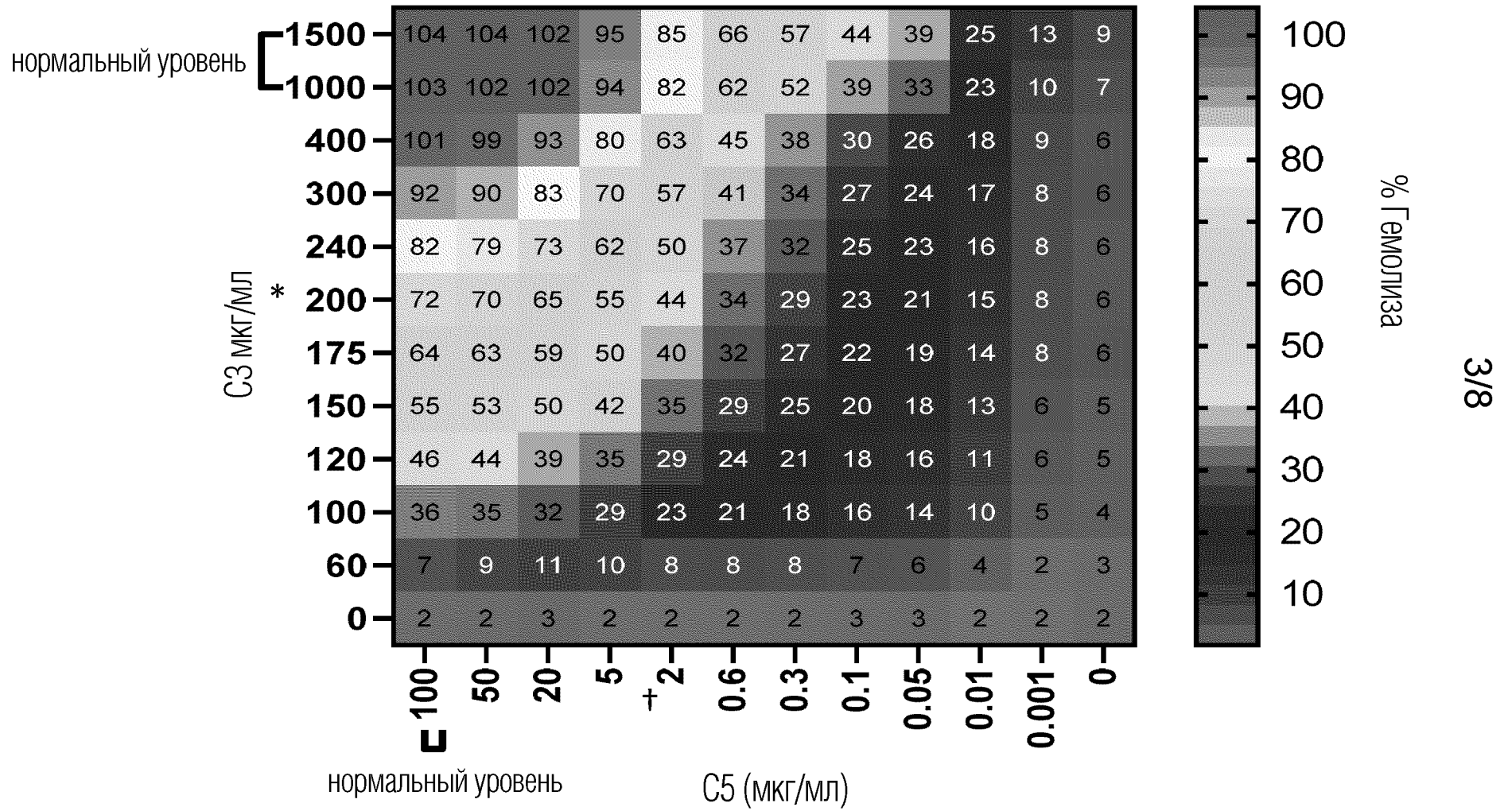


Гемолиз альтернативного пути (АН)



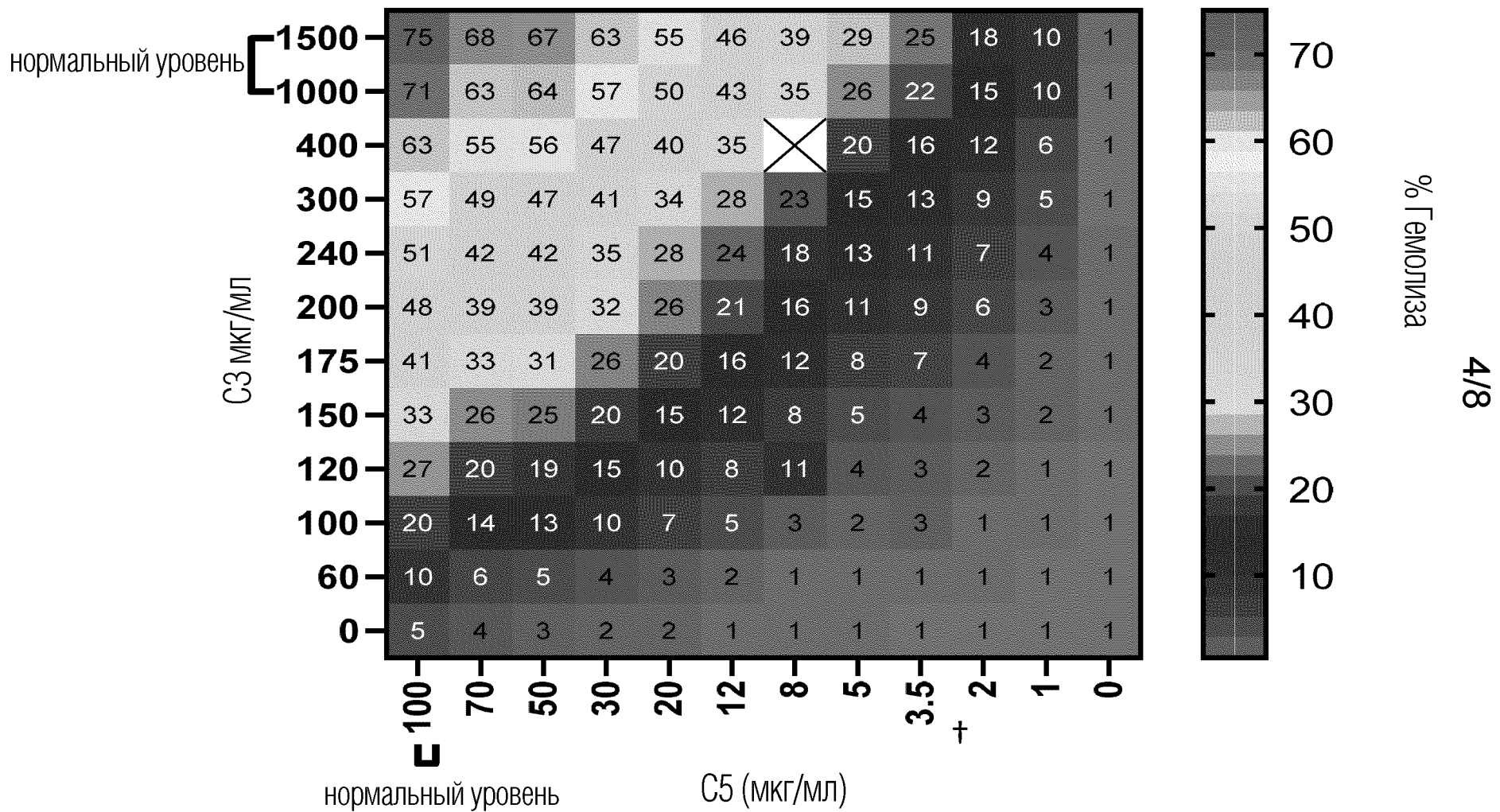
ФИГ. 2А

Гемолиз альтернативного пути (АН)



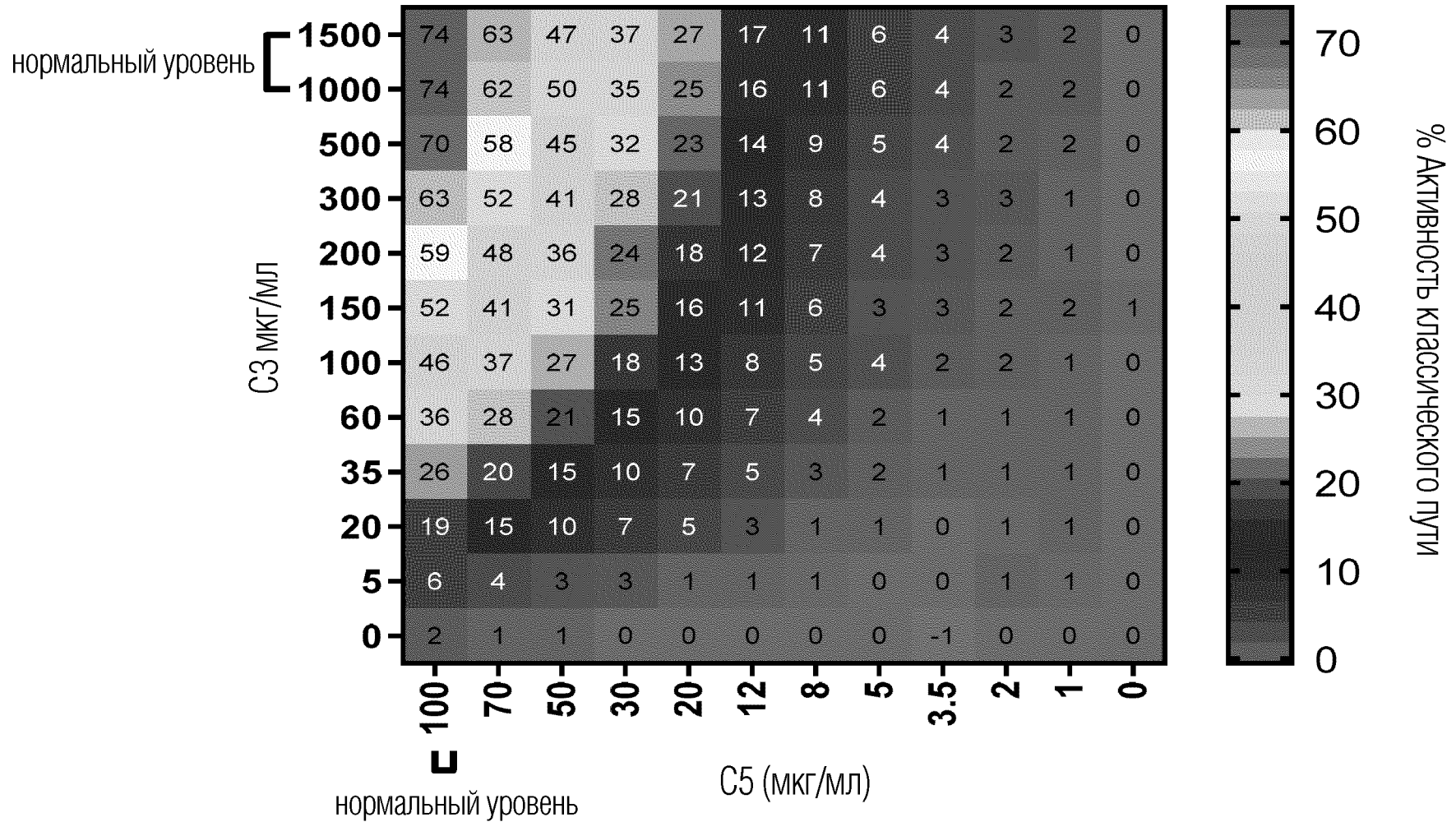
ФИГ. 2В

Гемолиз классического пути (CH)



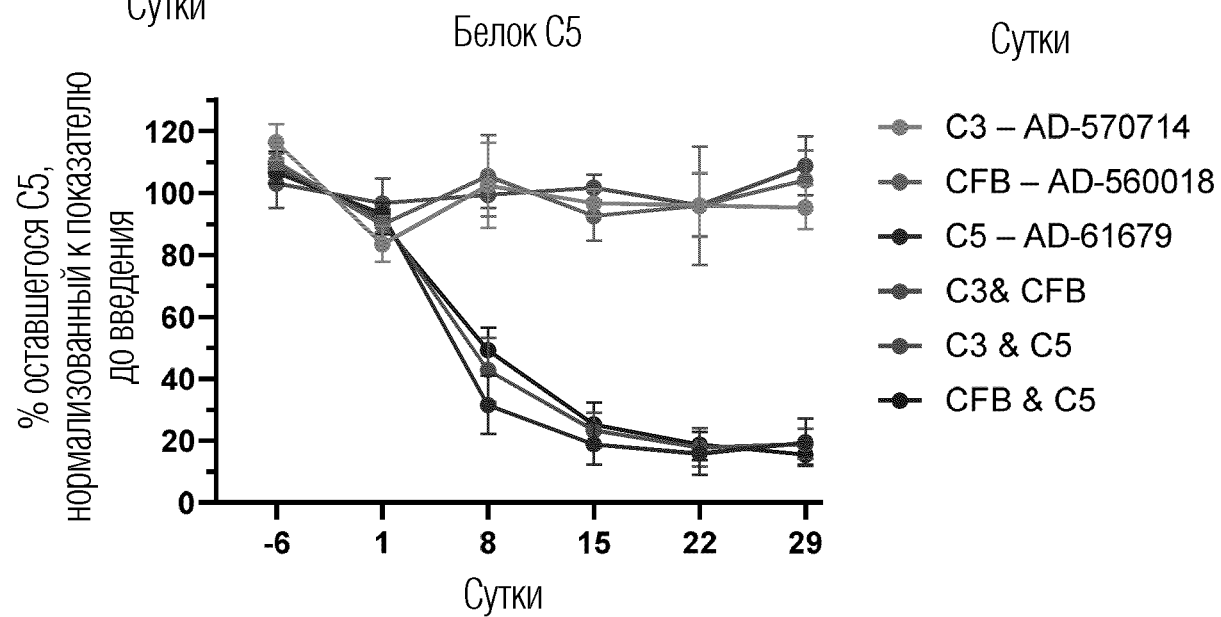
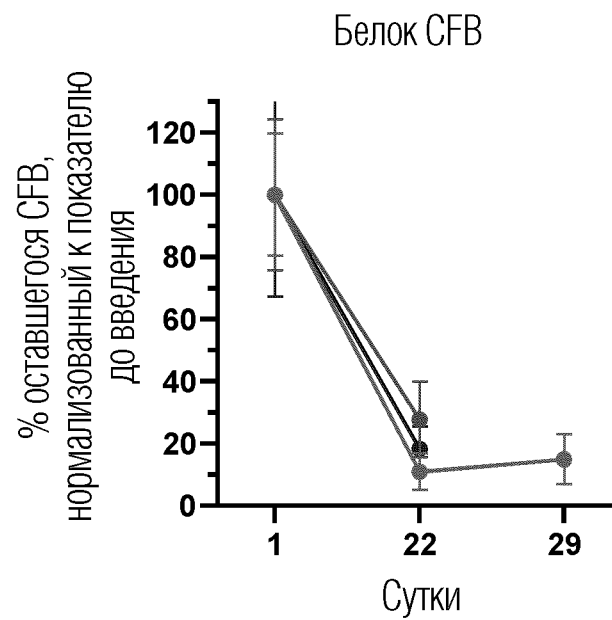
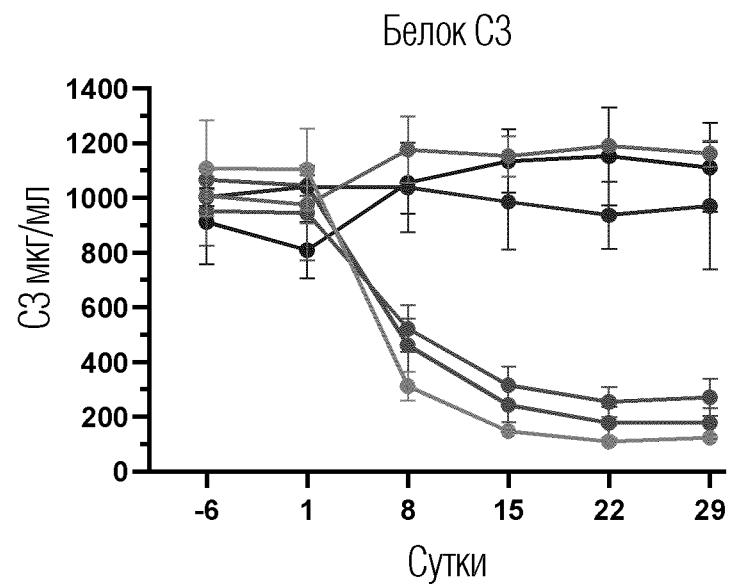
ФИГ. 2С

C3/C5 классический путь



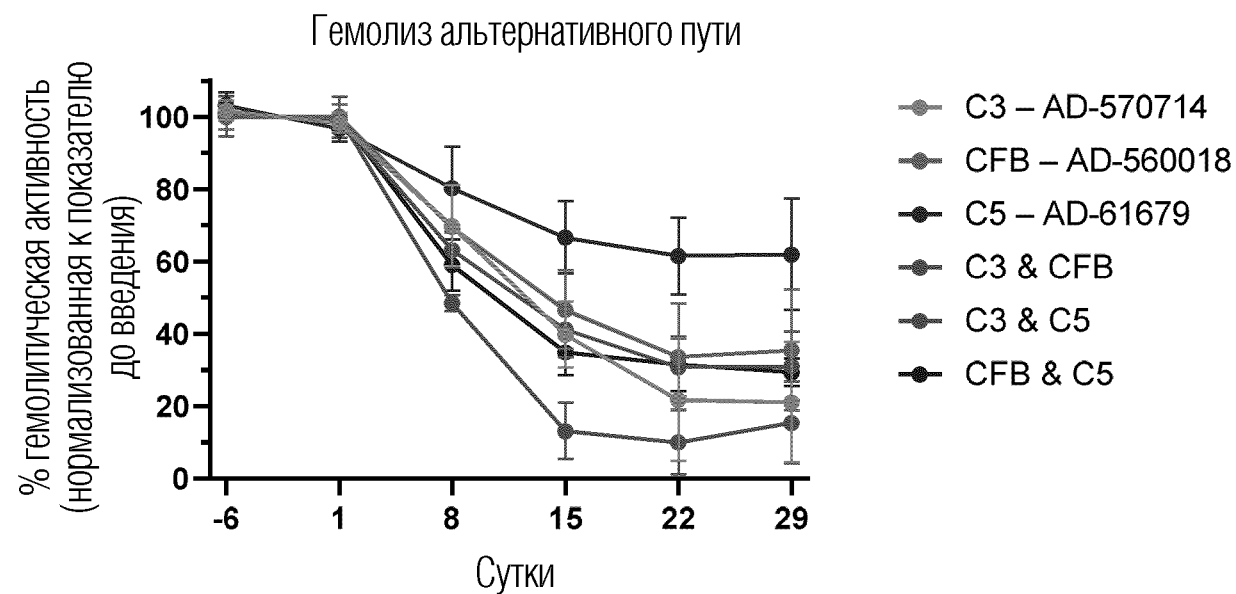
5/8

ФИГ. 2D

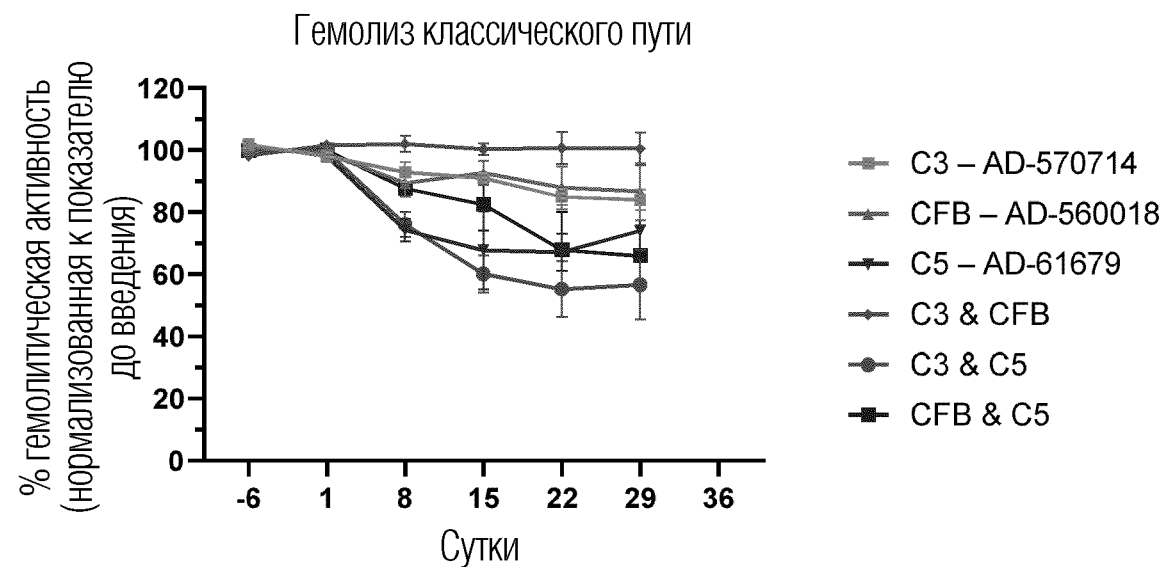


- C3 – AD-570714
- CFB – AD-560018
- C5 – AD-61679
- C3 & CFB
- C3 & C5
- CFB & C5

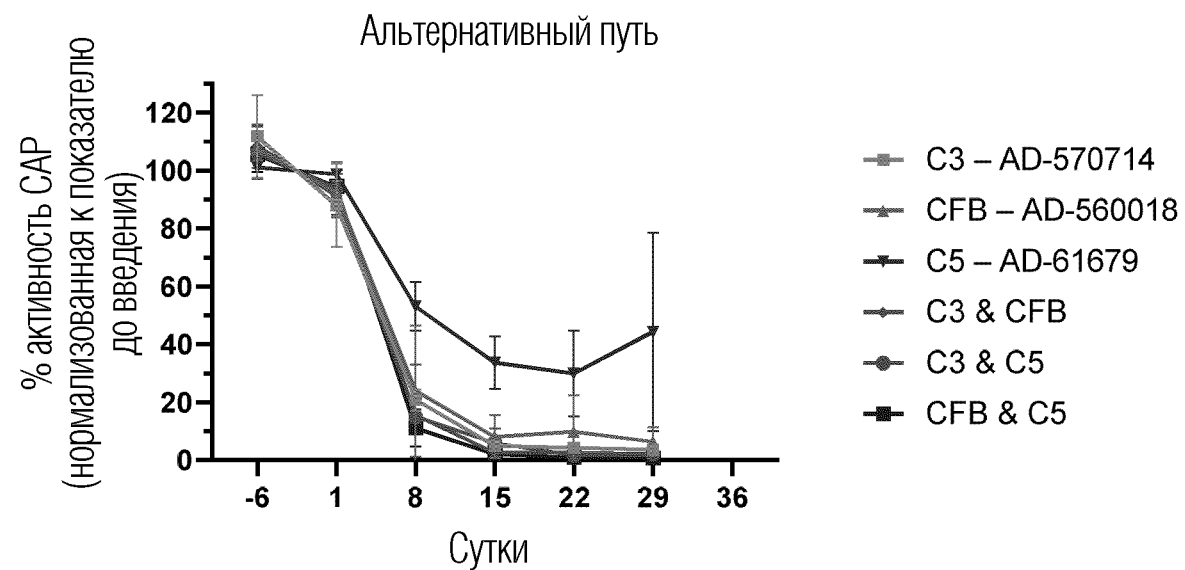
ФИГ. 3А



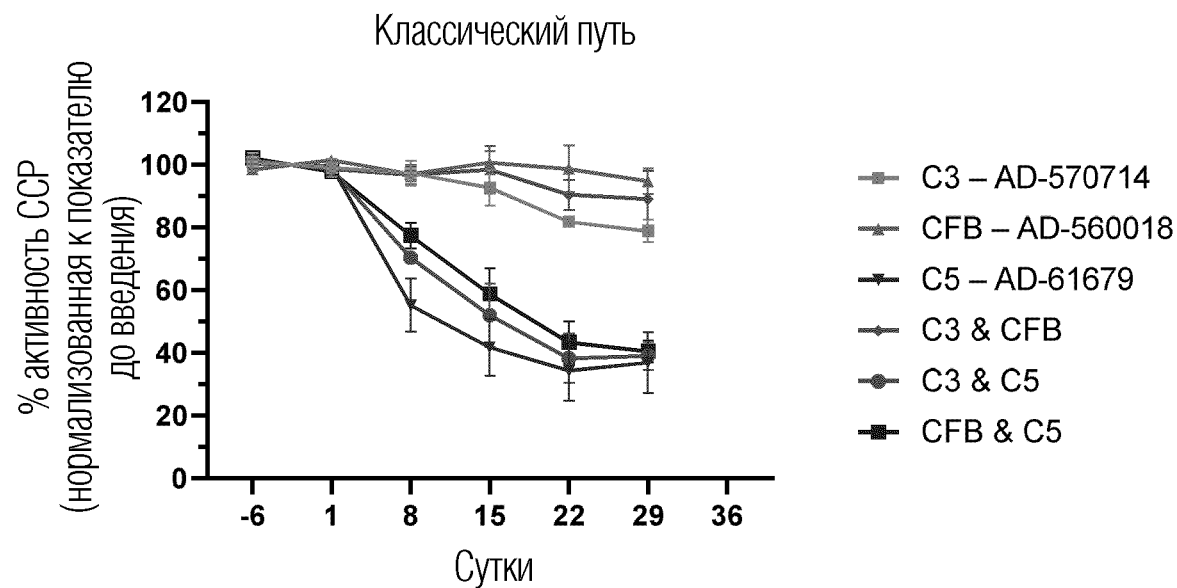
ФИГ. 3В



ФИГ. 3С



ФИГ. 3Д



ФИГ. 3Е