



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,  
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



**(11) BR 112016013148-7 B1**

**(22) Data do Depósito:** 12/12/2014

**(45) Data de Concessão:** 27/02/2024

**(54) Título:** ÁCIDO RIBONUCLEICO DE FITA DUPLA (DSRNA) PARA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR B DO COMPLEMENTO (CFB) EM UMA CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE UM GENE DO FATOR B DO COMPLEMENTO, SEU USO, E MÉTODO IN VITRO DE INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR B DO COMPLEMENTO (CFB) EM UMA CÉLULA

**(51) Int.Cl.:** C12N 15/113; C12N 15/11; A61P 25/28; A61P 43/00; A61P 37/06; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 12/12/2013 US 61/915,210.

**(73) Titular(es):** ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC..

**(72) Inventor(es):** ANNA BORODOVSKY; BRIAN BETTENCOURT.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2014069951 de 12/12/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/089368 de 18/06/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 08/06/2016

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÕES DE RNAi DE COMPONENTE DO COMPLEMENTO E MÉTODOS DE UTILIZAÇÃO DAS MESMAS. A presente invenção refere-se a RNAi, por exemplo, ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA), composições se dirigindo ao gene do fator B do complemento (CFB), ao gene do componente do complemento C3, e ao gene do componente do complemento C9 e métodos de uso de tal RNAi, por exemplo, dsRNA, composições para inibir a expressão de CFB, C9 e/ou C3 e para tratar indivíduos tendo uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, hemoglobinúria paroxística noturna e síndrome urêmica hemolítica atípica.

**Relatório Descritivo da Patente de Invenção para “ÁCIDO RIBONUCLEICO DE FITA DUPLA (dsRNA) PARA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR B DO COMPLEMENTO (CFB) EM UMA CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA PARA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE UM GENE DO FATOR B DO COMPLEMENTO, SEU USO, E MÉTODO *IN VITRO* DE INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DO FATOR B DO COMPLEMENTO (CFB) EM UMA CÉLULA”.**

### **Listagem de Sequências**

[001] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e é deste modo incorporada por referência na sua totalidade. A referida cópia ASCII, criada em 11 de dezembro, 2014, é chamada 121301-01120\_SL.txt e tem 266.080 bytes em tamanho.

### **Pedidos Relacionados**

[002] Este pedido reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório de Patente E.U.A. Nº.: 61/915,210, depositado a 12 de dezembro, 2013, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada a título de referência.

### **Antecedentes da Invenção**

[003] O complemento foi primeiramente descoberto nos 1890s quando se descobriu que auxiliava ou "complementava" a morte de bactérias por anticorpos estáveis quanto ao calor presentes em soro normal (Walport, M.J. (2001) *N Engl J Med.* 344:1058). O sistema complemento consiste em mais do que 30 proteínas que estão ou presentes como proteínas solúveis no sangue ou estão presentes como proteínas associadas à membrana. A ativação do complemento leva a uma cascata sequencial de reações enzimáticas, conhecidas como vias de ativação do complemento, resultando na formação das anafilatoxinas potentes C3a e C5a que provocam uma plethora de respostas fisiológicas que variam de quimioatração à apoptose. Inicialmente se pensava que

o complemento desempenhava um papel principal na imunidade inata onde uma resposta robusta e rápida é montada contra patogênios invasores. No entanto, recentemente, se está tornando crescentemente evidente que o complemento desempenha também um papel importante na imunidade adaptativa envolvendo células T e B que ajudam na eliminação de patogênios (Dunkelberger JR e Song WC. (2010) *Cell Res.* 20:34; Molina H, *et al.* (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3357), na manutenção de memória imunológica prevenindo a reinvasão patogênica, e está envolvido em numerosos estados patológicos humanos (Qu, H, *et al.* (2009) *Mol Immunol.* 47:185; Wagner, E. e Frank MM. (2010) *Nat Rev Drug Discov.* 9:43).

[004] Sabe-se que a ativação do complemento ocorre através de três diferentes vias: alternativa, clássica, e lectina (Figura 1), envolvendo proteínas que existem maioritariamente como zimogênios inativos que são depois sequencialmente clivados e ativados.

[005] A via clássica é muitas vezes ativada por complexos anticorpo-antígeno ou pela proteína C reativa (CRP), sendo que ambos interagem com o componente do complemento C1q. Além disso, a via clássica pode ser ativada por fosfatidilserina presente em corpos apoptóticos na ausência de complexos imunes.

[006] A via da lectina iniciada pelas lectinas ligadoras de manose (MBL) que se ligam aos resíduos de hidratos de carbono complexos na superfície de patogêneos. A ativação da via clássica ou da via da lectina conduz à ativação da C3 convertase (C4b2b).

[007] A via alternativa é ativada pela ligação de C3b, que é espontaneamente gerada pela hidrólise de C3, em superfícies orientadas. Esta C3b ligada à superfície é em seguida reconhecido pelo fator B, formando o complexo C3bB. O complexo C3bB, por sua vez, é clivado pelo fator D, para se obter a forma ativa da C3 convertase de AP (C3bBb). Ambos os tipos de C3 convertases vão clivar C3, dando

origem a C3b. C3b se liga então a mais fator B, aumentando a ativação do complemento através de AP (a chamada alça alternativa ou de amplificação), ou conduz à formação da C5 convertase ativa (C3bBbC3b ou C4bC2bC3b), que cliva C5 e desencadeia eventos tardios que resultam na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (C5b-9).

[008] A ativação inapropriada do sistema do complemento é responsável pela propagação e/ou início da patologia em muitas doenças diferentes, incluindo, por exemplo, hemoglobinúria paroxística noturna, síndrome urêmica hemolítica atípica, artrite reumatoide, lesão de isquemia-reperfusão e doenças neurodegenerativas.

[009] Até à data, somente um terapêutico que tem como alvo o eixo C5-C5a está disponível para o tratamento de doenças associadas ao componente do complemento, o anticorpo anti-C5, eculizumab (Soliris®). Embora se tenha mostrado que o eculizumab era eficaz para o tratamento de hemoglobinúria paroxística noturna (PNH) e síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS) e está sendo correntemente avaliado em ensaios clínicos quanto a doenças associadas ao componente do complemento adicionais, a terapia com eculizumab requer infusões de elevada dose semanais seguidas por infusões de manutenção bissemanais a um custo elevado. Além disso, aproximadamente 50% dos indivíduos com PNH tratados com eculizumab têm baixo nível de hemólise e requerem transfusões residuais (Hill A, *et al.* (2010) *Haematologica* 95(4):567-73). Logo, existe uma necessidade na técnica de terapias e terapias de combinação alternativas para indivíduos tendo uma doença associada ao componente do complemento.

### **Sumário da Invenção**

[0010] A presente invenção fornece composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos de RNA de um gene CFB. O gene CFB pode

estar dentro de uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um ser humano.

[0011] A presente invenção fornece composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos de RNA de um gene C3. O gene C3 pode estar dentro de uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um humano.

[0012] Adicionalmente, a presente invenção fornece composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos de RNA de um gene C9. O gene C9 pode estar dentro de uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um ser humano.

[0013] A presente invenção fornece também métodos e terapias de combinação para tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria de inibição ou redução da expressão de um gene CFB, C3 e/ou C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, tal como hemoglobinúria paroxística noturna (PNH) e síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS) usando composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos de RNA de um gene CFB, C3 e/ou C9 para inibição da expressão de um gene CFB, C3 e/ou C9.

[0014] Em conformidade, em um aspecto a presente invenção fornece um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão do fator B do complemento (CFB) em uma célula, em que o dsRNA compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID N<sup>os</sup>:1-5, 27 e 30, e a fita antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer

uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID N<sup>os</sup>:12-16, 33 e 36.

[0015] Em um outro aspecto a presente invenção fornece um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão do fator B do complemento (CFB) em uma célula, em que o dsRNA compreende uma fita senso e uma fita antissenso, compreendendo a fita antissenso uma região de complementaridade que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências antissenso listadas nas Tabelas 3 e 4.

[0016] Em uma modalidade, as fitas senso e antissenso compreendem sequências selecionadas do grupo que consiste em AD-60304, AD-60331 e AD-60344 e qualquer um dos agentes listados nas Tabelas 3 e 4.

[0017] Em uma modalidade a região de complementaridade consiste nas sequências de nucleotídeos de uma das sequências antissenso de qualquer uma das Tabelas 3 e 4.

[0018] Em uma modalidade, o dsRNA compreende uma fita senso consistindo em uma sequência de nucleotídeo de fita senso selecionada das sequências de qualquer uma das Tabelas 3 e 4, e uma fita antissenso consistindo em uma sequência de nucleotídeo de uma sequência antissenso selecionada das sequências de qualquer uma das Tabelas 3 e 4.

[0019] Em um outro aspecto a presente invenção fornece um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão do componente do complemento C3 em uma célula, em que o dsRNA compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID N<sup>os</sup>:6-8, 28 e 31, e a fita antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não

mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID N<sup>os</sup>:17-19, 34 e 37.

[0020] Em um outro aspecto a presente invenção fornece um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão do componente do complemento C3 em uma célula, em que o dsRNA compreende uma fita senso e uma fita antissenso, compreendendo a fita antissenso uma região de complementaridade que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências antissenso listadas nas Tabelas 5 e 6.

[0021] Em uma modalidade, as fitas senso e antissenso compreendem sequências selecionadas do grupo que consiste em AD-60169 e qualquer um dos agentes listados nas Tabelas 5 e 6.

[0022] Em uma modalidade a região de complementaridade consiste nas sequências de nucleotídeos de uma das sequências antissenso de qualquer uma das Tabelas 5 e 6.

[0023] Em uma modalidade, o dsRNA compreende uma fita senso consistindo em uma sequência de nucleotídeo de fita senso selecionada das sequências de qualquer uma das Tabelas 5 e 6, e uma fita antissenso consistindo em uma sequência de nucleotídeo de uma sequência antissenso selecionada das sequências de qualquer uma das Tabelas 5 e 6.

[0024] Em um outro aspecto a presente invenção fornece um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão do componente do complemento C9 em uma célula, em que o dsRNA compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID N<sup>os</sup>:9-11, 29 e 32, e a fita antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não

mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID N<sup>os</sup>:20-22, 35 e 38.

[0025] Em um outro aspecto a presente invenção fornece um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão do componente do complemento C9 em uma célula, em que o dsRNA compreende uma fita senso e uma fita antissenso, compreendendo a fita antissenso uma região de complementaridade que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências antissenso listadas nas Tabelas 7 e 8.

[0026] Em uma modalidade, as fitas senso e antissenso compreendem sequências selecionadas do grupo que consiste em qualquer um dos agentes listados nas Tabelas 7 e 8.

[0027] Em uma modalidade a região de complementaridade consiste nas sequências de nucleotídeos de uma das sequências antissenso de qualquer uma das Tabelas 7 e 8.

[0028] Em uma modalidade, o dsRNA compreende uma fita senso consistindo em uma sequência de nucleotídeo de fita senso selecionada das sequências de qualquer uma das Tabelas 7 e 8, e uma fita antissenso consistindo em uma sequência de nucleotídeo de uma sequência antissenso selecionada das sequências de qualquer uma das Tabelas 7 e 8.

[0029] O dsRNA pode incluir pelo menos um nucleotídeo modificado, por exemplo, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo compreendendo um grupo 5'-fosforotioato, um nucleotídeo deóxi, um nucleotídeo de deóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleótido modificado por 2'-fluoro, um nucleótido modificado por 2'-deóxi, um nucleotídeo terminal ligado a um derivado de colesterol ou um grupo bisdecilamida do ácido dodecanoico, um nucleótido modificado por 2'-deóxi-2'-fluoro, um

nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo conformacionalmente restrito, um nucleotídeo de etila limitado, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetrahidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidro-hexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo mímico de 5'-fosfato.

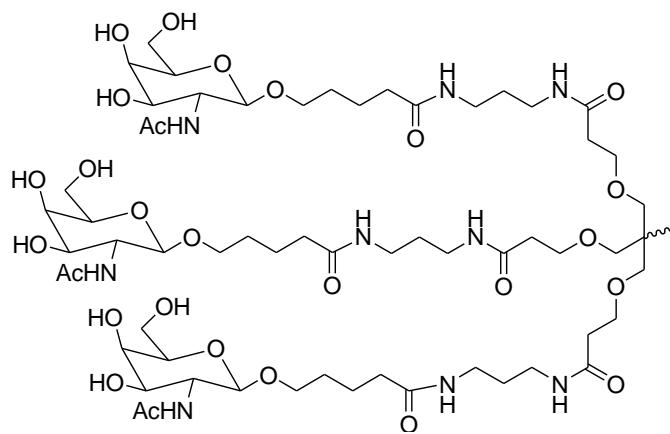
[0030] Em uma modalidade, substancialmente todos os nucleotídeos da fita senso e da fita antissenso são nucleotídeos modificados. Em uma outra modalidade, todos os nucleotídeos da fita senso e da fita antissenso são nucleotídeos modificados.

[0031] A região de complementaridade pode ter pelo menos 17 nucleotídeos em comprimento, tal como 19 nucleotídeos em comprimento, ou não mais do que 30 nucleotídeos em comprimento.

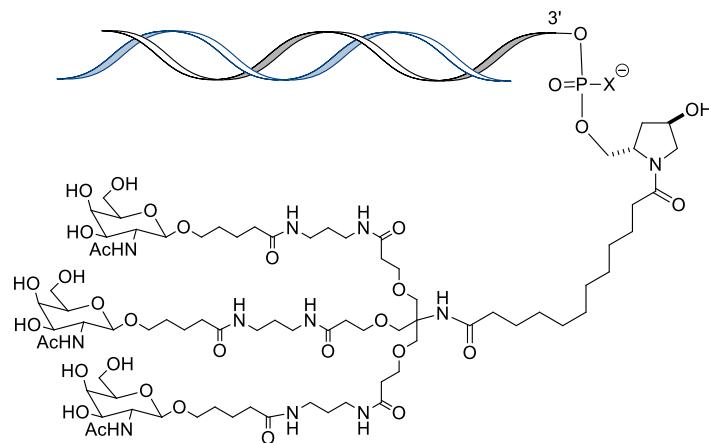
[0032] A região de complementaridade pode ter entre 19 e 21 nucleotídeos em comprimento.

[0033] Pelo menos uma fita do dsRNA pode incluir uma saliência 3' de pelo menos 1 nucleotídeo ou pelo menos 2 nucleotídeos.

[0034] O dsRNA pode adicionalmente incluir um ligante. Em uma modalidade, o ligante está conjugado com a extremidade 3' da fita senso do dsRNA. Em uma modalidade, o ligante é um derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc). Em uma modalidade, o ligante é



[0035] Em uma modalidade, o dsRNA está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



e em que X é O ou S.

[0036] Em uma modalidade, o X é O.

[0037] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do fator B do complemento (CFB) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando CFB, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;  
 p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;  
 cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

cada np, np', nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos;

as modificações em Nb diferem da modificação em Y e as modificações em Nb' diferem da modificação em Y'; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0038] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do componente do complemento 3 (C3) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C3, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;  
 p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;  
 cada  $N_a$  e  $N_a'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada  $N_b$  e  $N_b'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

cada  $n_p$ ,  $n_p'$ ,  $n_q$ , e  $n_q'$ , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

$XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$ , e  $Z'Z'Z'$  representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos;

as modificações em  $N_b$  diferem da modificação em  $Y$  e as modificações em  $N_b'$  diferem da modificação em  $Y'$ ; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0039] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do componente do complemento 9 (C9) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso:  $5' n_p -N_a -(X X X) i-N_b -Y Y Y -N_b -(Z Z Z) j -N_a -n_q 3'$

antissenso:  $3' n_p' -N_a' -(X'X'X') k -N_b' -Y'Y'Y' -N_b' -(Z'Z'Z') l -N_a' -n_q' 5'$  (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;  
 p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;  
 cada  $Na$  e  $Na'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada  $Nb$  e  $Nb'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

cada  $np$ ,  $np'$ ,  $nq$ , e  $nq'$ , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da as-liência;

$XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$ , e  $Z'Z'Z'$  representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos;

as modificações em  $Nb$  diferem da modificação em  $Y$  e as modificações em  $Nb'$  diferem da modificação em  $Y'$ ; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0040] Em uma modalidade, i é 0; j é 0; i é 1; j é 1; ambos i e j são 0; ou ambos i e j são 1.

[0041] Em uma modalidade, k é 0; l é 0; k é 1; l é 1; ambos k e l são 0; ou ambos k e l são 1.

[0042] Em uma modalidade,  $XXX$  é complementar com  $X'X'X'$ ,  $YYY$  é complementar com  $Y'Y'Y'$ , e  $ZZZ$  é complementar com  $Z'Z'Z'$ .

[0043] Em uma modalidade, o motivo  $YYY$  ocorre no ou próximo do local de clivagem da fita senso.

[0044] Em uma modalidade, o motivo  $Y'Y'Y'$  ocorre nas posições 11, 12 e 13 da fita antissenso a partir da extremidade 5'.

[0045] Em uma modalidade, o  $Y'$  é 2'-O-metila.

[0046] Em uma modalidade, a fórmula (III) é representada pela fórmula (IIIa):

senso: 5' np -Na -Y Y Y -Na - nq 3'

antissenso: 3' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>- Y'Y'Y'- N<sub>a</sub>- n<sub>q</sub> 5' (IIIa).

[0047] Em uma modalidade, a fórmula (III) é representada pela fórmula (IIIb):

senso: 5' np -Na -Y Y Y -Nb -Z Z Z -Na - nq 3'

antissenso: 3' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>- Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>-Z'Z'Z'- N<sub>a</sub>- n<sub>q</sub> 5' (IIIb)

em que cada N<sub>b</sub> e N<sub>b</sub>" representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 1-5 nucleotídeos modificados.

[0048] Em uma modalidade, a fórmula (III) é representada pela fórmula (IIIc):

senso: 5' np -Na -X X X -Nb -Y Y Y -Na - nq 3'

antissenso: 3' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>- X'X'X'-N<sub>b</sub>- Y'Y'Y'- N<sub>a</sub>- n<sub>q</sub> 5' (IIIc)

em que cada N<sub>b</sub> e N<sub>b</sub>" representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 1-5 nucleotídeos modificados.

[0049] Em uma modalidade, a fórmula (III) é representada pela fórmula (IIId):

senso: 5' np -Na -X X X- Nb -Y Y Y -Nb -Z Z Z -Na - nq 3'

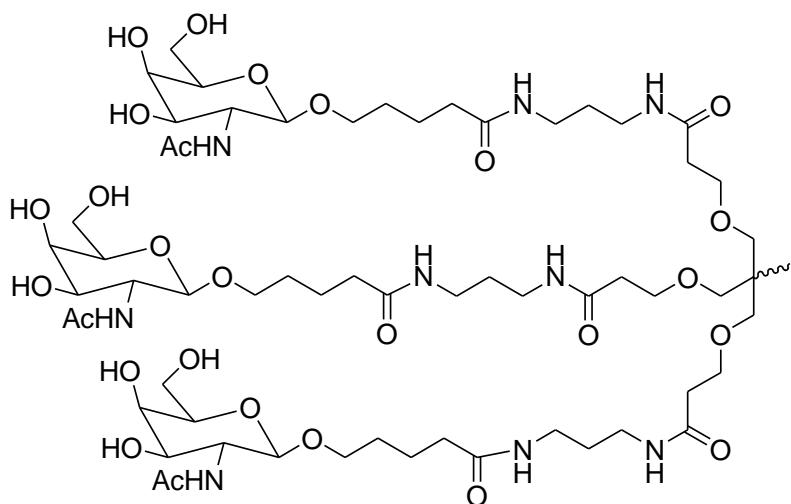
antissenso: 3' n<sub>p</sub>-N<sub>a</sub>- X'X'X'- N<sub>b</sub>-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>-Z'Z'Z'- N<sub>a</sub>- n<sub>q</sub> 5' (IIId)

em que cada N<sub>b</sub> e N<sub>b</sub>' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 1-5 nucleotídeos modificados e cada N<sub>a</sub> e N<sub>a</sub>' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-10 nucleotídeos modificados.

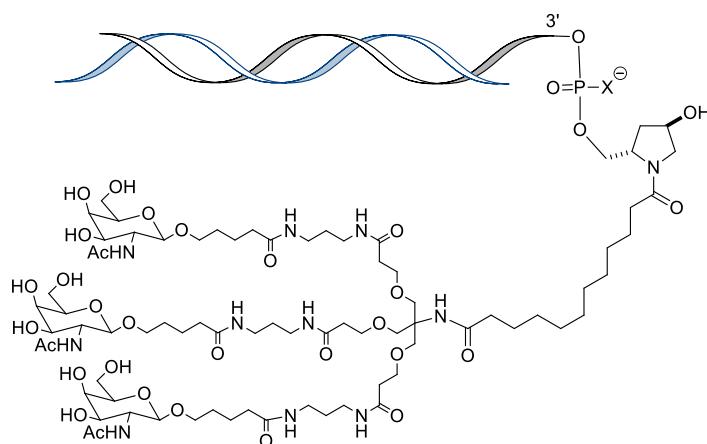
[0050] A região de fita dupla pode ter 15-30 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-23 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-25 pares de nucleotídeos em comprimento, 23-27 pares de nucleotídeos

em comprimento, 19-21 pares de nucleotídeos em comprimento, ou 21-23 pares de nucleotídeos em comprimento.

- [0051] Em uma modalidade, cada fita tem 15-30 nucleotídeos.
- [0052] Em uma modalidade, as modificações nos nucleotídeos são selecionadas do grupo consistindo em LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietila, 2'-O-alquila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-flúor, 2'-deóxi, 2'-hidroxila, e suas combinações.
- [0053] Em uma modalidade, as modificações nos nucleotídeos são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor.
- [0054] Em uma modalidade, o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.
- [0055] Em uma modalidade, o ligante é



- [0056] Em uma modalidade, o ligante está anexado à extremidade 3' da fita senso.
- [0057] Em uma modalidade, o agente de RNAi está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



e em que X é O ou S.

- [0058] Em uma modalidade, o X é O.
- [0059] Em uma modalidade, o agente compreende adicionalmente pelo menos uma ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato.
- [0060] Em uma modalidade, a ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato está no terminal 3' de uma fita. Em uma modalidade, a fita é a fita antissenso. Em outra modalidade, a fita é a fita senso.
- [0061] Em uma outra modalidade, a ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato está no terminal 5' de uma fita. Em uma modalidade, a fita é a fita antissenso. Em outra modalidade, a fita é a fita senso.
- [0062] Em uma modalidade, a ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato está em ambos os terminais 5' e 3' de uma fita. Em uma modalidade, a fita é a fita antissenso.
- [0063] Em uma modalidade, o par de bases na posição 1 da extremidade 5' da fita antissenso do duplex é um par de bases AU.
- [0064] Em uma modalidade, os nucleotídeos de Y contêm uma modificação de 2'-flúor.
- [0065] Em uma modalidade, os nucleotídeos de Y' contêm uma modificação de 2'-O-metila.
- [0066] Em uma modalidade, p'>0. Em outra modalidade, p'=2.

- [0067] Em uma modalidade,  $q'=0$ ,  $p=0$ ,  $q=0$ , e os nucleotídeos da saliência de  $p'$  são complementares com o mRNA alvo.
- [0068] Em outra modalidade,  $q'=0$ ,  $p=0$ ,  $q=0$ , e os nucleotídeos da saliência de  $p'$  não são complementares com o mRNA alvo.
- [0069] Em uma modalidade, a fita senso tem um total de 21 nucleotídeos e a fita antissenso tem um total de 23 nucleotídeos.
- [0070] Em uma modalidade, pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato. Em uma outra modalidade, todos os  $np'$  estão ligados a nucleotídeos da vizinhança através de ligações de fosforotioato.
- [0071] Em uma modalidade, o agente de RNAi é selecionado do grupo de agentes de RNAi listados nas Tabelas 3 e 4. Em uma modalidade, o agente de RNAi é selecionado do grupo de agentes de RNAi AD-60304, AD-60331 e AD-60344.
- [0072] Em uma outra modalidade, o agente de RNAi é selecionado do grupo de agentes de RNAi listados nas Tabelas 5 e 6.
- [0073] Em ainda uma outra modalidade, o agente de RNAi é selecionado do grupo de agentes de RNAi listados nas Tabelas 7 e 8.
- [0074] Em um aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla compreendendo os RNAi listados em qualquer uma das Tabelas 3, 5 e 7.
- [0075] Em um aspecto, a presente invenção fornece composições compreendendo um agente de polinucleotídeo antissenso modificado. Os agentes são capazes de inibir a expressão do Fator B do Complemento (CFB) em uma célula, e incluem uma sequência complementar com uma sequência senso selecionada do grupo das sequências listadas na Tabela 3, em que o polinucleotídeo tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento.
- [0076] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece composições compreendendo um agente de polinucleotídeo antissenso

modificado. Os agentes são capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 3 (C3) em uma célula, e incluem uma sequência complementar com uma sequência senso selecionada do grupo das sequências listadas na Tabela 5, em que o polinucleotídeo tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento.

[0077] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção fornece composições compreendendo um agente de polinucleotídeo antissenso modificado. Os agentes são capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 9 (C9) em uma célula, e incluem uma sequência complementar com uma sequência senso selecionada do grupo das sequências listadas na Tabela 7, em que o polinucleotídeo tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento.

[0078] Em um aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Fator B do Complemento (CFB) em uma célula. O agente inclui uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando CFB, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-Na'- (X'X'X')<sub>k</sub>-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-Na'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada  $N_b$  e  $N_b'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

cada  $n_p$ ,  $n_p'$ ,  $n_q$ , e  $n_q'$ , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

$XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$ , e  $Z'Z'Z'$  representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em  $N_b$  diferem da modificação em  $Y$  e as modificações em  $N_b'$  diferem da modificação em  $Y'$ ; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0079] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Fator B do Complemento (CFB) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando CFB, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: 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'

antissenso: 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)

em que:

$i$ ,  $j$ ,  $k$ , e  $l$  são cada um independentemente 0 ou 1;

cada  $n_p$ ,  $n_q$ , e  $n_q'$ , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;  $p$ ,  $q$ , e  $q'$  são cada um independentemente 0-6;

$n_p' > 0$  e pelo menos um  $n_p'$  está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada  $N_a$  e  $N_a'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada  $N_b$  e  $N_b'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

$XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$ , e  $Z'Z'Z'$  representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em  $N_b$  diferem da modificação em  $Y$  e as modificações em  $N_b'$  diferem da modificação em  $Y'$ ; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0080] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Fator B do Complemento (CFB) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando CFB, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

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

em que:

$i$ ,  $j$ ,  $k$ , e  $l$  são cada um independentemente 0 ou 1;

cada  $np$ ,  $nq$ , e  $nq'$ , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

p, q, e q' são cada um independentemente 0-6; np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em Nb diferem da modificação em Y e as modificações em Nb' diferem da modificação em Y'; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0081] Em ainda um aspecto adicional, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Fator B do Complemento (CFB) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando CFB, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

cada np, nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

p, q, e q' são cada um independentemente 0-6;

np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em Nb diferem da modificação em Y e as modificações em Nb' diferem da modificação em Y';

em que a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0082] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Fator B do Complemento (CFB) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso

compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando CFB, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: 5' np -Na -Y Y Y - Na - nq 3'

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'- Y'Y'Y'- N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (IIIa)

em que:

cada np, nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência; p, q, e q' são cada um independentemente 0-6;

np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

YYY e Y'Y'Y' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

em que a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0083] Em um aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 3 (C3) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso

compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C3, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

cada np, np', nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em N<sub>b</sub> diferem da modificação em Y e as modificações em N<sub>b</sub>' diferem da modificação em Y'; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0084] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 3 (C3) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso

complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C3, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

cada np, nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência; p, q, e q' são cada um independentemente 0-6;

np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em N<sub>b</sub> diferem da modificação em Y e as modificações em N<sub>b</sub>' diferem da modificação em Y'; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0085] Em um outro aspecto, a invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 3 (C3) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C3, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')l-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

cada np, nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência; p, q, e q' são cada um independentemente 0-6;

np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em N<sub>b</sub> diferem da modificação em Y e as

modificações em  $N_b'$  diferem da modificação em  $Y'$ ; e  
em que a fita senso está conjugada com pelo menos um  
ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados  
através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0086] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção fornece  
agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do  
Componente do Complemento 3 (C3) em uma célula. Os agentes  
incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que  
a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de  
um mRNA codificando C3, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de  
30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita  
dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')l-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

cada np, nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar  
presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;  
p, q, e q' são cada um independentemente 0-6;

np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança  
através de uma ligação de fosforotioato;

cada Na e Na' representa independentemente uma  
sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que  
estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações,  
compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos  
diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma  
sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que  
estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um

independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em  $N_b$  diferem da modificação em  $Y$  e as modificações em  $N_b'$  diferem da modificação em  $Y'$ ;

em que a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0087] Em um aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 3 (C3) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C3, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso:  $5' np -Na -Y Y Y - Na - nq 3'$

antissenso:  $3' n_p' -Na' - Y'Y'Y' - Na' - n_q' 5'$  (IIIa)

em que:

cada  $np$ ,  $nq$ , e  $nq'$ , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

$p$ ,  $q$ , e  $q'$  são cada um independentemente 0-6;

$np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada  $Na$  e  $Na'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos

diferentemente modificados;

YYY e Y'Y'Y' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

em que a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0088] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do componente do complemento 9 (C9) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')l-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que

estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações; cada np, np', nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência; XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor; as modificações em N<sub>b</sub> diferem da modificação em Y e as modificações em N<sub>b</sub>' diferem da modificação em Y'; e em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0089] Em um aspecto, a invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 9 (C9) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: 5' np -Na -(X X X) i-Nb -Y Y Y -Nb -(Z Z Z)j -Na - nq 3'  
 antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'-(X'X'X')<sub>k</sub>-N<sub>b</sub>'-Y'Y'Y'-N<sub>b</sub>'-(Z'Z'Z')<sub>l</sub>-N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1; cada np, nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência; p, q, e q' são cada um independentemente 0-6; np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações,

compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos differentemente modificados;

cada  $N_b$  e  $N_b'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

$XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$ , e  $Z'Z'Z'$  representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em  $N_b$  diferem da modificação em  $Y$  e as modificações em  $N_b'$  diferem da modificação em  $Y'$ ; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0090] Em um outro aspecto, a invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 9 (C9) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: 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'

antissenso: 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)

em que:

$i$ ,  $j$ ,  $k$ , e  $l$  são cada um independentemente 0 ou 1;

cada  $n_p$ ,  $n_q$ , e  $n_q'$ , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;  $p$ ,  $q$ , e  $q'$  são cada um independentemente 0-6;

$n_p' > 0$  e pelo menos um  $n_p'$  está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada  $N_a$  e  $N_a'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada  $N_b$  e  $N_b'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

$XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$ , e  $Z'Z'Z'$  representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em  $N_b$  diferem da modificação em  $Y$  e as modificações em  $N_b'$  diferem da modificação em  $Y'$ ; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0091] Em um outro aspecto, a invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 9 (C9) em uma célula. Os agentes incluem uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

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

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

em que:

$i$ ,  $j$ ,  $k$ , e  $l$  são cada um independentemente 0 ou 1;

cada  $np$ ,  $nq$ , e  $nq'$ , cada um dos quais pode ou não estar

presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência; p, q, e q' são cada um independentemente 0-6; np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato; cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb e Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

as modificações em Nb diferem da modificação em Y e as modificações em Nb' diferem da modificação em Y';

em que a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0092] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão do Componente do Complemento 9 (C9) em uma célula. O agente inclui uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um mRNA codificando C9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla

é representado pela fórmula (III):

senso: 5' np -Na -Y Y Y - Na - nq 3'

antissenso: 3' n<sub>p</sub>'-N<sub>a</sub>'- Y'Y'Y'- N<sub>a</sub>'- n<sub>q</sub>' 5' (IIIa)

em que:

cada np, nq, e nq', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

p, q, e q' são cada um independentemente 0-6;

np' >0 e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

YYY e Y'Y'Y' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor;

em que a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato; e

em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0093] Em um outro aspecto, a invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibição da expressão do fator B do complemento (CFB) em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso formando uma região de fita dupla, em que a fita senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID N<sup>os</sup>:1-5, 27 e

30, e a fita antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos de qualquer uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID N<sup>os</sup>:12-16, 33 e 36, em que substancialmente todos os nucleotídeos da fita senso compreendem uma modificação selecionada do grupo consistindo em uma modificação de 2'-O-metila e uma modificação de 2'-flúor, em que a fita senso compreende duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5', em que substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso compreendem uma modificação selecionada do grupo consistindo em uma modificação de 2'-O-metila e uma modificação de 2'-flúor, em que a fita antissenso compreende duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5' e duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 3', e

em que a fita senso está conjugada com um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante bivalente ou trivalente ramificado no terminal 3'.

[0094] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibição da expressão do componente do complemento C3 em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso formando uma região de fita dupla, em que a fita senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID N<sup>os</sup>:6-8, 28 e 31, e a fita antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos de qualquer uma das sequências de nucleotídeos de N<sup>os</sup>:17-19, 34 e 37, em que substancialmente todos os nucleotídeos da fita senso compreendem uma modificação selecionada do grupo consistindo em uma modificação de 2'-O-metila e uma modificação de 2'-flúor, em que a fita senso compreende duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no

terminal 5', em que substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso compreendem uma modificação selecionada do grupo consistindo em uma modificação de 2'-O-metila e uma modificação de 2'-flúor, em que a fita antissenso compreende duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5' e duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 3', e em que a fita senso está conjugada com um ou mais derivados de GalNAc através de um ligante bivalente ou trivalente ramificado no terminal 3'.

[0095] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibição da expressão do componente do complemento C9 em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso e uma fita antissenso formando uma região de fita dupla, em que a fita senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID N<sup>os</sup>:9-11, 29 e 32, e a fita antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos de qualquer uma das sequências de nucleotídeos de SEQ ID N<sup>os</sup>:20-22, 35 e 38, em que substancialmente todos os nucleotídeos da fita senso compreendem uma modificação selecionada do grupo consistindo em uma modificação de 2'-O-metila e uma modificação de 2'-flúor, em que a fita senso compreende duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5', em que substancialmente todos os nucleotídeos da fita antissenso compreendem uma modificação selecionada do grupo consistindo em uma modificação de 2'-O-metila e uma modificação de 2'-flúor, em que a fita antissenso compreende duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5' e duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 3', e

em que a fita senso está conjugada com um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante bivalente ou

trivalente ramificado no terminal 3'.

[0096] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos da fita senso e todos os nucleotídeos da fita antissenso compreendem uma modificação.

[0097] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece uma célula contendo os agentes da invenção.

[0098] Em um aspecto, a invenção fornece vectores que codificam pelo menos uma linha dos agentes da invenção.

[0099] Em um outro aspecto, a invenção fornece uma célula compreendendo os vectores da invenção.

[00100] Em um aspecto, a presente invenção fornece composições farmacêuticas para inibição da expressão de um gene do fator B do complemento compreendendo os agentes da invenção.

[00101] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece composições farmacêuticas para inibição da expressão de um gene do componente do complemento C3 compreendendo os agentes da invenção.

[00102] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção fornece composições farmacêuticas para inibição da expressão de um gene do componente do complemento C9 compreendendo os agentes da invenção.

[00103] Em uma modalidade preferencial, o agente de RNAi é administrado em uma solução não tamponada.

[00104] Em uma modalidade, a solução não tamponada é salino ou água.

[00105] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado com uma solução tampão.

[00106] Em uma modalidade, a solução tampão compreende acetato, citrato, prolamina, carbonato, ou fosfato ou qualquer sua combinação.

[00107] Em uma modalidade, a solução tampão é salino tamponado com fosfato (PBS).

[00108] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de inibição da expressão do fator B do complemento em uma célula. Os métodos incluem o contacto da célula com o agente da invenção ou uma composição farmacêutica da invenção, e

manutenção da célula produzida durante um tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de mRNA de um gene CFB, inibindo deste modo a expressão do gene CFB na célula.

[00109] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de inibição da expressão do componente do complemento 3 (C3) em uma célula. Os métodos incluem contatar a célula com um agente da invenção ou uma composição farmacêutica da invenção, e manter a célula produzida por um período de tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de mRNA de um gene C3, desse modo inibindo a expressão do gene C3 na célula.

[00110] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de inibição da expressão do componente do complemento 9 (C9) em uma célula. Os métodos incluem contatar a célula com um agente da invenção ou uma composição farmacêutica da invenção, e manter a célula produzida por um período de tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de mRNA de um gene C9, desse modo inibindo a expressão do gene C9 na célula.

[00111] Em uma modalidade, a célula está dentro de um indivíduo.

[00112] Em uma modalidade, o indivíduo é um humano.

[00113] Em uma modalidade, o indivíduo humano sofre de uma doença associada ao componente do complemento.

[00114] Em uma modalidade, em que a doença associada ao componente do complemento é selecionada de entre o grupo que consiste em hemoglobinúria paroxística noturna (PNH), asma, artrite

reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, psoríase, dermatomiosite penfigóide bolhoso, síndrome urêmica hemolítica atípica, síndrome urêmica hemolítica relacionada com toxina Shiga de *E. coli*, miastenia grave, neuromielite ótica, doença do depósito denso, neuropatia C3, degeneração macular relacionada com a idade, doença da aglutinina fria, vasculite associada a anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos, rejeição de transplante humorar e vascular, disfunção de enxerto, infarto do miocárdio, um recipiente sensibilizado de um transplante, e sépsis.

[00115] Em uma modalidade, a doença associada ao componente do complemento é hemoglobinúria paroxística noturna (PNH).

[00116] Em outra modalidade, a doença associada ao componente do complemento é síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS).

[00117] Em uma modalidade, a expressão de CFB é inibida por pelo menos cerca de 30%.

[00118] Em uma modalidade, a expressão de C3 é inibida por pelo menos cerca de 30%.

[00119] Em uma modalidade, a expressão de C9 é inibida por pelo menos cerca de 30%.

[00120] Em uma modalidade, o agente é administrado a uma dose de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg ou cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg.

[00121] Em outra modalidade, o agente é administrado a uma dose de cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg.

[00122] Em uma modalidade, o agente é administrado subcutaneamente.

[00123] Em uma outra modalidade, o agente é administrado intravenosamente.

[00124] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da

redução na expressão do fator B do complemento (CFB). Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente da invenção, desse modo tratando o indivíduo.

[00125] Em outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo uma doença ou distúrbio que beneficiaria da redução na expressão do fator B do complemento (CFB). Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente da invenção, prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB.

[00126] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão do componente do complemento C3 (C3). Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente da invenção, desse modo tratando o indivíduo.

[00127] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo uma doença ou distúrbio que beneficiaria da redução na expressão do componente do complemento C3 (C3). Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente da invenção, prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3.

[00128] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão do componente do complemento C9 (C9). Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente da invenção, desse modo tratando o indivíduo.

[00129] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo uma doença ou distúrbio que beneficiaria da redução na expressão do componente do complemento C9 (C9). Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente da invenção, prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9.

[00130] Em uma modalidade, o distúrbio é uma doença associada ao componente do complemento.

[00131] Em uma modalidade, em que a doença associada ao componente do complemento é selecionada de entre o grupo que consiste em hemoglobinúria paroxística noturna (PNH), asma, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, psoríase, dermatomiosite penfigóide bolhoso, síndrome urêmica hemolítica atípica, síndrome urêmica hemolítica relacionada com toxina Shiga de *E. coli*, miastenia grave, neuromielite ótica, doença do depósito denso, neuropatia C3, degeneração macular relacionada com a idade, doença da aglutinina fria, vasculite associada a anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos, rejeição de transplante humorai e vascular, disfunção de enxerto, infarto do miocárdio, um recipiente sensibilizado de um transplante, e sépsis.

[00132] Em uma modalidade, a doença associada ao componente do complemento é hemoglobinúria paroxística noturna (PNH).

[00133] Em outra modalidade, a doença associada ao componente do complemento é síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS).

[00134] Em uma modalidade, a administração do agente ao indivíduo causa uma diminuição na hemólise e/ou uma diminuição na acumulação da proteína CFB.

[00135] Em uma modalidade, a administração do agente ao indivíduo

causa uma diminuição na hemólise e/ou uma diminuição na acumulação da proteína C3.

[00136] Em uma modalidade, a administração do agente ao indivíduo causa uma diminuição na hemólise e/ou uma diminuição na acumulação da proteína C9.

[00137] Em uma modalidade, os métodos incluem adicionalmente a administração de eculizumab ao indivíduo.

[00138] Em uma outra modalidade, os métodos incluem adicionalmente a administração de compstatina ao indivíduo.

[00139] Em uma modalidade, o agente é administrado a uma dose de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg ou cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg.

[00140] Em uma outra modalidade, o agente é administrado a uma dose de cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg.

[00141] Em ainda uma outra modalidade, o agente é administrado a uma dose selecionada do grupo consistindo em 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg.

[00142] Em uma modalidade, o agente é administrado ao indivíduo uma vez por semana.

[00143] Em outra modalidade, o agente é administrado ao indivíduo duas vezes por mês.

[00144] Em uma modalidade, os métodos incluem a medição dos níveis de LDH no indivíduo.

[00145] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de inibição da expressão do fator B do complemento (CFB) em um indivíduo. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente da invenção, desse modo inibindo a expressão de CFB no indivíduo.

[00146] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de inibição da expressão do componente do complemento C3 (C3) em

um indivíduo. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente da invenção, desse modo inibindo a expressão de C3 no indivíduo.

[00147] Em ainda um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de inibição da expressão do componente do complemento C9 (C9) em um indivíduo. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer um agente da invenção, desse modo inibindo a expressão de C9 no indivíduo.

[00148] Em uma modalidade, os métodos incluem adicionalmente administrar eculizumab ao indivíduo.

[00149] Em uma outra modalidade, os métodos incluem adicionalmente administrar compstatina ao indivíduo.

[00150] Em uma modalidade, o agente é administrado a uma dose de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg ou cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg.

[00151] Em outra modalidade, o agente é administrado a uma dose de cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg.

[00152] Em ainda uma outra modalidade, o agente é administrado a uma dose selecionada do grupo consistindo em 1 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg.

[00153] Em uma modalidade, o agente é administrado ao indivíduo uma vez por semana.

[00154] Em outra modalidade, o agente de dsRNA é administrado ao indivíduo duas vezes por mês.

### **Breve Descrição dos Desenhos**

[00155] A Figura 1 é um esquema das três vias do complemento: alternativa, clássica e lectina.

[00156] A Figura 2 é um gráfico mostrando a percentagem de mRNA do fator B do complemento (CFB) restante em camundongos C57BL/6 após 96 horas de uma dose única de 1 mg/kg ou 10 mg/kg dos RNAi

indicados.

[00157] A Figura 3 é um gráfico mostrando a percentagem de mRNA do fator B do complemento (CFB) restante em camundongos C57BL/6 após 72 horas de uma dose única de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg ou 10 mg/kg de AD-60331.

### **Descrição Detalhada da Invenção**

[00158] A presente invenção fornece composições de RNAi, que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos de RNA de um gene do componente do complemento, *isto é*, um gene CFB, C3 ou C9. O gene pode estar dentro de uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um humano.

[00159] A presente invenção fornece também métodos e terapias de combinação para tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria de inibição ou redução da expressão de um gene CFB, C9, e/ou C3, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, tal como hemoglobinúria paroxística noturna (PNH) e síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS) usando composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos de RNA de um gene CFB, C3, e/ou C9.

[00160] A presente invenção fornece também métodos para prevenção de pelo menos um sintoma, por exemplo, hemólise, em um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria de inibição ou redução da expressão de um gene CFB, C3, e/ou C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, tal como hemoglobinúria paroxística noturna (PNH) e síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS).

[00161] Os RNAi da invenção incluem uma fita de RNA (a fita antissenso) possuindo uma região que tem um comprimento de cerca

de 30 nucleotídeos ou menos, por exemplo, um comprimento de 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, ou 21-22 nucleotídeos, cuja região é substancialmente complementar a pelo menos parte de um transcrito de mRNA de um gene CFB, C3 ou C9. O uso destes RNAi permite a degradação dirigida de mRNAs do gene correspondente (gene CFB, C3, ou C9) em mamíferos. Dosagens muito baixas dos RNAi da invenção, em particular, podem especificamente e eficazmente mediar a interferência de RNA (RNAi), resultando na inibição significativa da expressão do gene correspondente (gene CFB, C3 ou C9). Usando ensaios baseados em células, os presentes inventores demonstraram que RNAi se dirigindo a estes genes do componente do complemento podem mediar RNAi, originando inibição significativa da expressão de um gene do complemento (*isto é*, CFB, C3 ou C9). Assim, métodos e composições incluindo estes RNAi são úteis para o tratamento de um indivíduo com uma doença associada ao componente do complemento, tal como a hemoglobinúria paroxística noturna (PNH) e síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS).

[00162] A seguinte descrição detalhada divulga como preparar e usar composições contendo RNAi para inibir a expressão de um gene do complemento (*isto é*, CFB, C3 ou C9), bem como composições, usos, e métodos para tratamento de indivíduos tendo doenças e distúrbios que beneficiariam de inibição e/ou redução da expressão destes genes.

## **I. Definições**

[00163] De modo a que a presente invenção possa ser mais prontamente entendida, certos termos são primeiramente definidos.

Adicionalmente deve ser notado que sempre que um valor ou gama de valores de um parâmetro for recitado é pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00164] Os artigos "um" e "uma" são usados aqui para se referirem a um ou a mais do que um (isto é, a pelo menos um) do objeto grammatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais do que um elemento, por exemplo, uma pluralidade de elementos.

[00165] O termo "incluso" é usado aqui para significar, e é usado indistintamente com, a frase "incluso, mas não se limitando a".

[00166] O termo "ou" é usado aqui para significar, e é usado indistintamente com, o termo "e/ou", a não ser que o contexto indique claramente de outro modo.

[00167] Tal como aqui utilizado, o termo "Fator B do Complemento", usado indistintamente com o termo "CFB", se refere ao gene e polipeptídeo bem conhecido, também conhecido na técnica como AHUS, BF, CFAB, BFD, FB, GBG, FBI12, Fator-B, Properdina, H2-Bf, Beta Glicoproteína Rica em Glicina, Pró-acelerador C3, Properdina Fator 2B, Pró-ativador C3, PbF2, Beta Glicoproteína Rica em Glicina, Convertase C3/C5, EC 3.4.21 e EC 3.4.21.473. O termo "CFB" inclui CFB de humano, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:189181756; CFB de camundongo, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:218156288 e GI:218156290; CFB de rato, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank Nº. GI:218156284; CFB de chimpanzé, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank Nº. GI:57114201. O termo "CFB" também inclui CFB de *Macaca fascicularis*, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode

ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:544428919 e na entrada para o gene, ENSMMUP000000000985 (locus=scaffold3881:47830:53620), no sítio da Web do projeto do genoma de *Macaca* (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/index.jsp>). Exemplos adicionais de sequências de mRNA de CFB estão prontamente disponíveis usando, por exemplo, GenBank, UniProt, OMIM, e o sítio da Web do projeto do genoma de *Macaca*.

[00168] Exemplos de sequências de nucleotídeos CFB também podem ser encontrados nas SEQ ID N<sup>os</sup>:1-5, 27 e 30. SEQ ID N<sup>os</sup>:12-16, 33 e 36 são as sequências antissenso das SEQ ID N<sup>os</sup>: 1-5, 27, e 30, respetivamente.

[00169] O termo "CFB," tal como aqui utilizado, se refere também a variações de sequências de DNA de ocorrência natural do gene CFB. Exemplos não limitativos de variações de sequência no gene CFB incluem 1598A>G no exão 12, o que resulta em uma lisina sendo alterada para uma arginina no resíduo de aminoácido 533; 858C>G no exão 6, o que resulta em uma fenilalanina sendo alterada para uma leucina no resíduo de aminoácido 286; e 967A>L no exão 7, que resulta em uma lisina sendo alterada para uma alanina no resíduo de aminoácido 323 (Tawadrous H. *et al.* (2010) *Pediatr Nephrol*. 25:947; Goicoechea de Jorge E *et al.* (2007) *Proc Natl Acad Sci. USA* 104:240). O termo "CFB," tal como aqui utilizado, se refere também a polimorfismo de nucleotídeo único no gene no gene CFB. Foram identificados numerosas variações de sequência no gene CFB e que podem ser encontradas em, por exemplo, dbSNP do NCBI e UniProt (ver, por exemplo, [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)).

[00170] Tal como aqui utilizado, o termo "Componente do Complemento 3," usado indistintamente com o termo "C3", se refere ao gene e polipeptídeo bem conhecido, também conhecido na técnica

como ARMD9, Anafilatoxina C3a, ASP, Componente do Complemento C3a, C3a, Componente do Complemento C3b, C3b, prepro-C3, Produto da Clivagem da Proteína Estimuladora da Acilação, CPAMD1, Complemento C3, Proteína 1 Contendo Domínio de Alfa-2-Macroglobulina Tipo PZP e C3, Componente do Complemento C3 e AHUS5. O termo "C3" inclui C3 de humano, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:115298677; C3 de camundongo, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:126518316; C3 de rato, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:158138560. O termo "C3" também inclui C3 de *Macaca fascicularis*, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:544508182 e na entrada para o gene, ENSP00000245907 (locus=chr19:6921416:6963034), no sítio da Web do projeto do genoma de *Macaca* (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/index.jsp>). Exemplos adicionais de sequências de mRNA de C3 estão prontamente disponíveis usando, por exemplo, GenBank, UniProt, OMIM, e o sítio da Web do projeto do genoma de *Macaca*.

[00171] Exemplos de sequências de nucleotídeos C3 também podem ser encontrados nas SEQ ID Nºs:6-8, 28 e 31. SEQ ID Nºs:17-19, 34 e 37 são as sequências antissenso das SEQ ID Nºs: 6-8, 28, e 31, respectivamente.

[00172] O termo "C3," tal como aqui utilizado, se refere também a variações de sequências de DNA de ocorrência natural do gene C3. Foram identificados numerosas variações de sequência no gene C3 e que podem ser encontradas em, por exemplo, dbSNP do NCBI e UniProt (ver, por exemplo, [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)).

[00173] Tal como aqui utilizado, o termo "Componente do Complemento 9", usado indistintamente com o termo "C9", se refere ao gene e polipeptídeo bem conhecido. O termo "C9" inclui C9 de humano, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:187608340; C9 de camundongo, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:15375311; C9 de rato, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:16924005. O termo "C9" também inclui CFB de *Macaca fascicularis*, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Nº. de Acesso do GenBank GI:544436867 e na entrada para o gene, isotig05361 (isogroup03350 comprimento=2955 numContigs=1), no sítio da Web do projeto do genoma de *Macaca* (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/index.jsp>). Exemplos adicionais de sequências de mRNA de C3 estão prontamente disponíveis usando, por exemplo, GenBank, UniProt, OMIM, e o sítio da Web do projeto do genoma de Macaca.

[00174] Exemplos de sequências de nucleotídeos C9 também podem ser encontrados nas SEQ ID Nºs:9-11, 29 e 32. SEQ ID Nºs:20-22, 35 e 38 são as sequências antissenso das SEQ ID Nºs: 9-11, 29, e 32, respetivamente.

[00175] O termo "C9", tal como aqui utilizado, se refere também a variações de sequências de DNA de ocorrência natural do gene C9. Foram identificados numerosas variações de sequência no gene C9 e que podem ser encontradas em, por exemplo, dbSNP do NCBI e UniProt (ver, por exemplo, [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp)).

[00176] Como usada aqui, "sequência alvo" se refere a uma porção contígua da sequência de nucleotídeos de uma molécula de mRNA

formada durante a transcrição de um gene CFB, C3 ou C9, incluindo mRNA que é um produto do processamento de RNA de um produto de transcrição primária. Em uma modalidade, a porção alvo da sequência será pelo menos longa o suficiente para servir como um substrato para clivagem dirigida por RNAi nessa ou perto dessa porção da sequência de nucleotídeos de uma molécula de mRNA formada durante transcrição de um gene CFB, C3 ou C9.

[00177] A sequência alvo pode ter de cerca de 9-36 nucleotídeos em comprimento, por exemplo, cerca de 15-30 nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, o comprimento da sequência alvo pode ser cerca de 15-30 nucleotídeos, 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, ou 21-22 nucleotídeos. Também é contemplado que gamas e comprimentos intermédios das gamas e comprimentos listados acima sejam parte da invenção.

[00178] Como usado aqui, o termo "fita compreendendo uma sequência" se refere a um oligonucleotídeo compreendendo uma cadeia de nucleotídeos que é descrita pela sequência referida usando a nomenclatura de nucleotídeos padrão.

[00179] "G", "C", "A", "T" e "U" designam cada um geralmente um nucleotídeo que contém guanina, citosina, adenina, timidina e uracila como uma base, respectivamente. No entanto será entendido que o termo "ribonucleotídeo" ou "nucleotídeo" pode também se referir a um nucleotídeo modificado, como detalhado adicionalmente em baixo, ou uma fração de substituição suplente (ver, por exemplo, Tabela 2). O perito na técnica está bem ciente de que guanina, citosina, adenina, e uracila podem ser substituídas por outras frações sem alterar

substancialmente as propriedades de emparelhamento de bases de um oligonucleotídeo compreendendo um nucleotídeo contendo tal fração de substituição. Por exemplo, sem limitação, um nucleotídeo compreendendo inosina como sua base pode sofrer emparelhamento de bases com nucleotídeos contendo adenina, citosina, ou uracila. Assim, nucleotídeos contendo uracila, guanina, ou adenina podem ser substituídos, nas sequências de nucleotídeos de dsRNA apresentadas na invenção, por um nucleotídeo contendo, por exemplo, inosina. Em outro exemplo, adenina e citosina em qualquer parte do oligonucleotídeo podem ser substituídas por guanina e uracila, respectivamente, para formar emparelhamento de bases Oscilantes G-U com o mRNA alvo. Sequências contendo tais frações de substituição são adequadas para as composições e métodos apresentados na invenção.

[00180] Os termos "iRNA", "agente de RNAi", "agente de iRNA", "agente de interferência de RNA" como usados indistintamente aqui se referem a um agente que contém RNA como tal termo é definido aqui, e que medeia a clivagem dirigida de um transcrito de RNA através de um complexo silenciador induzido por RNA (RISC). O iRNA dirige a degradação específica quanto à sequência de mRNA através de um processo conhecido como interferência de RNA (RNAi). O RNAi modula, por exemplo, inibe, a expressão do gene alvo em uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um indivíduo mamífero.

[00181] Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção inclui um RNA de fita única que interage com uma sequência de RNA alvo, por exemplo, uma sequência de mRNA alvo de CFB, C3, ou C9, para dirigir a clivagem do RNA alvo. Sem desejar estar limitado pela teoria se acredita que o RNA de fita dupla longo introduzido nas células é degradado em siRNA por uma endonuclease do Tipo III conhecida como

Dicer (Sharp et al. (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, uma enzima do tipo ribonuclease III, processa o dsRNA em curtos RNAs interferentes com 19-23 pares de bases com saliências 3' de duas bases características (Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409:363). Os siRNAs são então incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde uma ou mais helicases desenrolam o duplex de siRNA, permitindo que a fita antissenso complementar oriente o reconhecimento do alvo (Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309). Após ligação ao mRNA alvo apropriado, uma ou mais endonucleases dentro do RISC clivam o alvo para induzir silenciamento (Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev.* 15:188). Assim, em um aspecto a invenção se relaciona com um RNA de fita única (siRNA) gerado dentro de uma célula e que promove a formação de um complexo RISC para efetivar o silenciamento do gene alvo, isto é, um gene CFB, C3 ou C9. Conformemente, o termo "siRNA" é também usado aqui para se referir a um RNAi como descrito acima.

[00182] Em outra modalidade, o agente de RNAi pode ser um siRNA de fita única que é introduzido em uma célula ou organismo para inibir um mRNA alvo. O agente de RNAi de fita única se liga à endonuclease do RISC, Argonauta 2, que cliva depois o mRNA alvo. Os siRNAs de fita única têm geralmente 15-30 nucleotídeos e estão quimicamente modificados. O desenho e teste de siRNAs de fita única são descritos na Patente dos E.U.A. Nº. 8.101.348 e em Lima et al., (2012) *Cell* 150: 883-894, os conteúdos inteiros de cada um dos quais são deste modo incorporados aqui por referência. Qualquer uma das sequências de nucleotídeos antissenso descritas aqui pode ser usada como um siRNA de fita única como descrito aqui ou como quimicamente modificada pelos métodos descritos em Lima et al., (2012) *Cell* 150:883-894.

[00183] Em outra modalidade, um "iRNA" para uso nas composições, usos, e métodos da invenção é um RNA de fita dupla e é referido aqui

como um "agente de RNAi de fita dupla", "molécula de RNA de fita dupla (dsRNA)", "agente de dsRNA", ou "dsRNA". O termo "dsRNA" se refere a um complexo de moléculas de ácidos ribonucleicos, tendo uma estrutura de duplex compreendendo duas fitas de ácidos nucleicos antiparalelas e substancialmente complementares, referidas como tendo orientações "senso" e "antisenso" no que diz respeito a um RNA alvo, *isto é*, um gene CFB, C3 ou C9. Em algumas modalidades da invenção, um RNA de fita dupla (dsRNA) desencadeia a degradação de um RNA alvo, por exemplo, um mRNA, através de um mecanismo de silenciamento de genes pós-transcricional referido aqui como interferência de RNA ou RNAi. Em geral, a maioria dos nucleotídeos de cada fita de uma molécula de dsRNA são ribonucleotídeos, mas como descrito em detalhe aqui, cada uma das ou ambas as fitas podem também incluir um ou mais não ribonucleotídeos, por exemplo, um desoxirribonucleotídeo e/ou um nucleotídeo modificado. Adicionalmente, como usado em esta especificação, um "agente de RNAi" pode incluir ribonucleotídeos com modificações químicas; um agente de RNAi pode incluir modificações substanciais em múltiplos nucleotídeos.

[00184] Tal como aqui utilizado, o termo "nucleotídeo modificado" se refere a um nucleotídeo tendo, de forma independente, uma fração de açúcar modificada, uma ligação internucleotídeos modificada, e/ou uma nucleobase modificada. Assim, o termo nucleotídeo modificado engloba substituições, adições ou remoção de, por exemplo, um grupo funcional ou átomo, para ligações internucleosídicas, frações de açúcar, ou nucleobases. As modificações adequadas para utilização nos agentes da invenção incluem todos os tipos de modificações aqui descritas ou conhecidas na técnica. Quaisquer tais modificações, como usadas em uma molécula do tipo siRNA, estão englobadas por "agente de iRNA" para os propósitos desta especificação e reivindicações.

[00185] A região de duplex pode ter qualquer comprimento que permita a degradação específica de um RNA alvo desejado através de uma via de RISC, e o comprimento pode variar desde cerca de 9 até 36 pares de bases, por exemplo, cerca de 15-30 pares de bases de comprimento, por exemplo, cerca de 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, ou 36 pares de bases de comprimento, tal como cerca de 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, ou 21-22 pares de bases de comprimento. Também é contemplado que gamas e comprimentos intermédios das gamas e comprimentos listados acima sejam parte da invenção.

[00186] As duas fitas formando a estrutura de duplex podem ser porções diferentes de uma molécula de RNA maior, ou podem ser moléculas de RNA separadas. Onde as duas fitas são parte de uma molécula maior, e portanto estão conectadas por uma cadeia ininterrupta de nucleotídeos entre a extremidade 3' de uma fita e a extremidade 5' da outra fita respectiva formando a estrutura de duplex, a cadeia de RNA conectante é referida como uma "alça em grampo". Uma alça em grampo pode compreender pelo menos um nucleotídeo desemparelhado. Em algumas modalidades, a alça em grampo pode compreender pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo menos 23 ou mais nucleotídeos desemparelhados.

[00187] Onde as duas fitas substancialmente complementares de um dsRNA são compreendidas de moléculas de RNA separadas, essas

moléculas não necessitam de, mas podem, estar covalentemente conectadas. Onde as duas fitas estão covalentemente conectadas por meios sem ser uma cadeia ininterrupta de nucleotídeos entre a extremidade 3' de uma fita e a extremidade 5' da outra fita respectiva formando a estrutura de duplex, a estrutura conectante é referida como um "ligante". As fitas de RNA podem ter um número igual ou diferente de nucleotídeos. O número máximo de pares de bases é o número de nucleotídeos na fita mais curta de dsRNA menos quaisquer saliências que estejam presentes no duplex. Para além da estrutura de duplex, um RNAi pode compreender uma ou mais protuberâncias de nucleotídeos.

[00188] Como usado aqui, o termo "saliência de nucleotídeos" se refere a pelo menos um nucleotídeo não emparelhado que sobressai da estrutura de duplex de um iRNA, por exemplo, um dsRNA. Por exemplo, quando uma extremidade 3' de uma fita de um dsRNA se estende para além da extremidade 5' da outra fita, ou vice-versa, existe uma saliência de nucleotídeos. Um dsRNA pode compreender uma saliência de pelo menos um nucleotídeo; alternativamente, a saliência pode compreender pelo menos dois nucleotídeos, pelo menos três nucleotídeos, pelo menos quatro nucleotídeos, pelo menos cinco nucleotídeos ou mais. Uma saliência de nucleotídeos pode compreender ou consistir em um análogo de nucleotídeo/nucleosídeo, incluindo um desoxinucleotídeo/nucleosídeo. A(s) saliência(s) pode(m) estar na fita senso, na fita antissenso ou qualquer sua combinação. Além disso, o(s) nucleotídeo(s) de uma saliência pode(m) estar presente(s) na extremidade 5', extremidade 3' ou ambas as extremidades de uma fita antissenso ou senso de um dsRNA.

[00189] Em uma modalidade, a fita antissenso de um dsRNA tem uma saliência de 1-10 nucleotídeos, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 nucleotídeos, na extremidade 3' e/ou na extremidade 5'. Em uma modalidade, a fita senso de um dsRNA tem uma saliência de 1-10

nucleotídeos, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos, na extremidade 3' e/ou na extremidade 5'. Em outra modalidade, um ou mais dos nucleotídeos na saliência estão substituídos por um nucleosídeo tiofosfato.

[00190] "Cega" ou "extremidade cega" significa que não existem nenhum nucleotídeos não emparelhados em essa extremidade do agente de RNAi de fita dupla, isto é, nenhuma saliência de nucleotídeos. Um agente de RNAi "de extremidades cegas" é um dsRNA que tem fita dupla ao longo do seu comprimento inteiro, isto é, nenhuma saliência de nucleotídeos em qualquer uma das extremidades da molécula. Os agentes de RNAi da invenção incluem agentes de RNAi com saliências de nucleotídeos em uma extremidade (isto é, agentes com uma saliência e uma extremidade cega) ou com saliências de nucleotídeos em ambas as extremidades.

[00191] O termo "fita antissenso" ou "fita guia" se refere à fita de um RNAi, por exemplo, um dsRNA, que inclui uma região que é substancialmente complementar com uma sequência alvo, por exemplo, um mRNA de CFB, C3 ou C9. Como usado aqui, o termo "região de complementaridade" se refere à região da fita antissenso que é substancialmente complementar com uma sequência, por exemplo uma sequência alvo, por exemplo, uma sequência de nucleotídeos de CFB, C3, ou C9, como definido aqui. Onde a região de complementaridade não é totalmente complementar com a sequência alvo, as não correspondências podem estar nas regiões internas ou terminais da molécula. Geralmente, as não correspondências mais toleradas estão nas regiões terminais, por exemplo, a 5, 4, 3, ou 2 nucleotídeos do terminal 5' e/ou 3' do iRNA.

[00192] O termo "fita senso", ou "fita passageira", como usado aqui, se refere à fita de um iRNA que inclui uma região que é substancialmente complementar com uma região da fita antissenso tal

como esse termo é definido aqui.

[00193] Como usada aqui, o termo "região de clivagem" se refere a uma região que está localizada imediatamente adjacente ao local de clivagem. O local de clivagem é o local no alvo no qual ocorre clivagem. Em algumas modalidades, a região de clivagem compreende três bases em qualquer uma das extremidades do, e imediatamente adjacente ao, local de clivagem. Em algumas modalidades, a região de clivagem compreende duas bases em qualquer uma das extremidades do, e imediatamente adjacente ao, local de clivagem. Em algumas modalidades, o local de clivagem ocorre especificamente no local ligado pelos nucleotídeos 10 e 11 da fita antissenso, e a região de clivagem compreende os nucleotídeos 11, 12 e 13.

[00194] Como usado aqui, e a não ser que indicado de outro modo, o termo "complementar", quando usado para descrever uma primeira sequência de nucleotídeos em relação a uma segunda sequência de nucleotídeos, se refere à capacidade de um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a primeira sequência de nucleotídeos de hibridar e formar uma estrutura de duplex sob certas condições com um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a segunda sequência de nucleotídeos, como será entendido pela pessoa perita. Tais condições podem, por exemplo, ser condições estringentes, em que condições estringentes podem incluir: NaCl a 400 mM, PIPES a 40 mM pH 6,4, EDTA a 1 mM, 50°C ou 70°C durante 12-16 horas seguido por lavagem (ver, por exemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Podem ser aplicadas outras condições, tais como condições fisiologicamente relevantes como podem ser encontradas dentro de um organismo. A pessoa perita será capaz de determinar o conjunto de condições o mais apropriadas para um teste de complementaridade de duas sequências de acordo com a aplicação final dos nucleotídeos

hibridados.

[00195] As sequências complementares dentro de um RNAi, por exemplo, dentro de um dsRNA como descrito aqui, incluem emparelhamento de bases do oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo uma primeira sequência de nucleotídeos com um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo uma segunda sequência de nucleotídeos ao longo do comprimento inteiro de uma das ou ambas as sequências de nucleotídeos. Tais sequências podem ser referidas como "totalmente complementares" no que diz respeito uma à outra aqui. No entanto, onde uma primeira sequência é referida aqui como "substancialmente complementar" no que diz respeito a uma segunda sequência aqui, as duas sequências podem ser totalmente complementares, ou podem formar um ou mais, mas geralmente não mais do que 5, 4, 3 ou 2 pares de bases desemparelhadas por hibridação para um duplex de até 30 pares de bases, enquanto retém a capacidade de hibridar sob as condições mais relevantes para a sua aplicação final, por exemplo, inibição da expressão de genes através de uma via de RISC. No entanto, onde dois oligonucleotídeos são desenhados para formar, após hibridação, uma ou mais saliências de fita única, tais sa-liências não devem ser consideradas como não correspondências no que diz respeito à determinação da complementaridade. Por exemplo, um dsRNA compreendendo um oligonucleotídeo com 21 nucleotídeos em comprimento e outro oligonucleotídeo com 23 nucleotídeos em comprimento, em que o oligonucleotídeo maior compreende uma sequência de 21 nucleotídeos que é totalmente complementar com o oligonucleotídeo mais curto, pode ainda ser referido como "totalmente complementar" para os propósitos descritos aqui.

[00196] Sequências "complementares", como usadas aqui, podem também incluir, ou ser inteiramente formadas de, pares de bases não

de Watson-Crick e/ou pares de bases formados a partir de nucleotídeos não naturais e modificados, desde que sejam cumpridos os requisitos acima no que diz respeito à sua capacidade de hibridação. Tais pares de bases não de Watson-Crick incluem, mas não estão limitados a, emparelhamentos de bases Oscilantes G:U ou de Hoogstein.

[00197] Os termos "complementar", "totalmente complementar" e "substancialmente complementar" podem ser usados aqui no que diz respeito à correspondência de bases entre a fita senso e a fita antissenso de um dsRNA, ou entre a fita antissenso de um agente de iRNA e uma sequência alvo, como será entendido a partir do contexto do seu uso.

[00198] Como usado aqui, um polinucleotídeo que é "substancialmente complementar com pelo menos parte de" um RNA mensageiro (mRNA) se refere a um polinucleotídeo que é substancialmente complementar com uma porção contígua do mRNA de interesse (por exemplo, um mRNA codificando CFB, C3 ou C9). Por exemplo, um polinucleotídeo é complementar com pelo menos uma parte de um mRNA de CFB se a sequência é substancialmente complementar a uma porção ininterrupta de um mRNA codificando CFB.

[00199] Em geral, a maioria dos nucleotídeos de cada fita é ribonucleotídeos, mas, como descrito em detalhe aqui, cada uma das ou ambas as fitas podem também incluir um ou mais não ribonucleotídeos, por exemplo, um desoxirribonucleotídeo e/ou um nucleotídeo modificado. Adicionalmente, um "iRNA" pode incluir ribonucleotídeos com modificações químicas. Tais modificações podem incluir todos os tipos de modificações descritas aqui ou conhecidas na técnica. Quaisquer tais modificações, como usadas em uma molécula de iRNA, estão englobadas por "iRNA" para os propósitos desta especificação e reivindicações.

[00200] Em um aspetto da invenção, um agente para uso nos

métodos e composições da invenção é uma molécula de RNA antissenso de fita única que inibe um mRNA alvo através de um mecanismo de inibição antissenso. A molécula de RNA antissenso de fita única é complementar com uma sequência dentro do mRNA alvo. Os oligonucleotídeo antissenso de fita única podem inibir a tradução de um modo estequiométrico por emparelhamento de bases com o mRNA e obstrução física da maquinaria de tradução, ver Dias, N. et al., (2002) Mol Cancer Ther 1:347-355. A molécula de RNA antissenso de fita única pode ter cerca de 15 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento e ter uma sequência que é complementar com uma sequência alvo. Por exemplo, a molécula de RNA antissenso de fita única pode compreender uma sequência que tem pelo menos cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais nucleotídeos contíguos de qualquer uma das sequências antissenso descritas aqui.

[00201] A frase "contato de uma célula com um agente de RNAi", tal como um dsRNA, como usada aqui, inclui contato de uma célula por quaisquer meios possíveis. O contato de uma célula com um agente de RNAi inclui contato de uma célula *in vitro* com o iRNA ou contato de uma célula *in vivo* com o iRNA. O contato pode ser feito direta ou indiretamente. Assim, por exemplo, o agente de RNAi pode ser colocado em contato físico com a célula pelo indivíduo realizando o método, ou, alternativamente, o agente de RNAi pode ser colocado em uma situação que irá permitir ou fazer com que entre subsequentemente em contato com a célula.

[00202] O contato de uma célula *in vitro* pode ser feito, por exemplo, por incubação da célula com o agente de RNAi. O contato de uma célula *in vivo* pode ser efetuado, por exemplo, por injeção do agente de RNAi no ou próximo do tecido onde a célula está localizada, ou por injeção do agente de RNAi em outra área, por exemplo, na corrente sanguínea ou no espaço subcutâneo tal que o agente alcance subsequentemente o

tecido onde a célula a ser contatada está localizada. Por exemplo, o agente de RNAi pode conter e/ou estar acoplado a um ligante, por exemplo, GalNAc3, que dirige o agente de RNAi para um local de interesse, por exemplo, o fígado. Combinações de métodos de contato in vitro e in vivo são também possíveis. Por exemplo, uma célula pode ser também contatada in vitro com um agente de RNAi e ser subsequentemente transplantada para um indivíduo.

[00203] Como usado aqui, um "indivíduo" é um animal, tal como um mamífero, incluindo um primata (tal como um humano, um primata não humano, por exemplo, um macaco, e um chimpanzé), um não primata (tal como uma vaca, um porco, um camelo, um lama, um cavalo, uma cabra, um coelho, uma ovelha, um hamster, um porquinho-da-índia, um gato, um cão, um rato, um camundongo, um cavalo, e uma baleia), ou um pássaro (por exemplo, um pato ou um ganso). Em uma modalidade, o indivíduo é um humano, tal como um humano sendo tratado ou avaliado quanto a uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão de CFB, C3 e/ou C9; um humano em risco de uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão de CFB, C3 e/ou C9; um humano tendo uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão de CFB, C3 e/ou C9; e/ou humano sendo tratado quanto a uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão de CFB, C3 e/ou C9 como descrito aqui.

[00204] Como usado aqui, o termo "doença associada ao componente do complemento" é uma doença ou distúrbio que é causado por, ou associado a, ativação do complemento. O termo "doença associada ao componente do complemento" inclui uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão de CFB (isto é, uma "doença associada a CFB"), C3 (isto é, uma "doença associada a C3"), e/ou C9 (isto é, uma "doença associada a

C9"). Tais doenças estão tipicamente associadas a inflamação e/ou ativação do sistema imune, por exemplo, lise mediada pelo complexo de ataque à membrana, anafilaxia, e/ou hemólise. Exemplos não limitantes de doenças associadas ao componente do complemento incluem hemoglobinúria paroxística noturna (PNH), síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS), asma, artrite reumatoide (RA); síndrome dos anticorpos antifosfolipídicos; nefrite lúpica; lesão de isquemia-reperfusão; síndrome urêmica hemolítica típica ou infecciosa (tHUS); doença do depósito denso (DDD); neuromielite ótica (NMO); neuropatia motora multifocal (MMN); esclerose múltipla (MS); degeneração macular (por exemplo, degeneração macular relacionada com a idade (AMD)); hemólise, enzimas hepáticas elevadas, e síndrome de plaquetas baixas (HELLP); púrpura trombocitopênica trombótica (TTP); perda fetal espontânea; vasculite Pauci-imunes; epidermólise bolhosa; perda fetal recorrente; pré-eclâmpsia, lesão cerebral traumática, miastenia grave, doença da aglutinina fria, dermatomiosite, penfigoide bolhoso, síndrome urêmica hemolítica relacionada com toxina Shiga de *E. coli*, neuropatia C3, vasculite associada a anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos (por exemplo, granulomatose com poliangiite (previamente conhecida como granulomatose de Wegener), síndrome de Churg-Strauss, e poliangiite microscópica), rejeição de transplante humorai e vascular, disfunção de enxerto, infarto do miocárdio (por exemplo, lesão dos tecidos e isquemia no infarto do miocárdio), um transplante alogênico, sepsia (por exemplo, fraco resultado na sepsia), Doença da artéria coronal, dermatomiosite, doença de Graves, aterosclerose, doença de Alzheimer, resposta inflamatória sistêmica, sepsia, choque séptico, lesão da medula espinhal, glomerulonefrite, tiroidite de Hashimoto, diabetes de tipo I, psoríase, pênfigo, anemia hemolítica autoimune (AIHA), ITP, síndrome de Goodpasture, doença de Degos, síndrome antifosfolipídica (APS), APS catastrófico (CAPS),

um distúrbio cardiovascular, miocardite, um distúrbio cerebrovascular, um distúrbio vascular periférico (por exemplo, musculoesquelético), um distúrbio renovascular, um distúrbio vascular mesentérico/entérico, vasculite, nefrite na púrpura de Henoch-Schönlein, vasculite associada a lúpus eritematoso sistêmico, vasculite associada a artrite reumatoide, vasculite do complexo imune, doença de Takayasu, cardiomiopatia dilatada, angiopatia diabética, doença de Kawasaki (arterite), êmbolo gasoso venoso (VGE), e restenose após colocação de endoprótese, aterectomia rotacional, e angioplastia coronária transluminal percutânea (PTCA) (ver, por exemplo, Holers (2008) *Immunological Reviews* 223:300-316; Holers e Thurman (2004) *Molecular Immunology* 41:147-152; Publicação de Patente dos E.U.A. No. 20070172483).

[00205] Em uma modalidade, uma doença associada ao componente do complemento é hemoglobinúria paroxística noturna (PNH). A PNH pode ser PHN clássica ou PNH no cenário de outra síndrome de falha da medula óssea e/ou síndromes mielodisplásicos (MDS), por exemplo, citopenias. Em outra modalidade, uma doença associada ao componente do complemento é síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS). Em outra modalidade, uma doença associada ao componente do complemento é artrite reumatoide.

[00206] É pretendido que "quantidade terapeuticamente eficaz", como usado aqui, inclua a quantidade de um agente de RNAi que, quando administrada a um indivíduo com uma doença associada ao componente do complemento, é suficiente para efetivar o tratamento da doença (por exemplo, diminuindo, melhorando ou mantendo a doença existente ou um ou mais sintomas de doença). A "quantidade terapeuticamente eficaz" pode variar dependendo do agente de RNAi ou anticorpo, ou seu fragmento de ligação ao antígeno, como o agente é administrado, da doença e sua gravidade e do historial, idade, peso, historial familiar, constituição genética, dos tipos de tratamentos

precedentes ou concomitantes, se alguns, e outras características individuais do indivíduo a ser tratado.

[00207] "Quantidade profilaticamente eficaz", como usada aqui, se destina a incluir a quantidade de um agente de RNAi que, quando administrada a um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento mas ainda (ou correntemente) não experienciando ou exibindo sintomas da doença, e/ou um indivíduo em risco de desenvolver uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, um indivíduo tendo um enxerto e/ou transplante, por exemplo, um recipiente sensibilizado ou alogênico, um indivíduo tendo sepsia, e/ou um indivíduo tendo um infarto do miocárdio, é suficiente para prevenir ou melhorar a doença ou um ou mais sintomas da doença. Melhoria da doença inclui abrandamento da progressão da doença ou redução da gravidade da doença com desenvolvimento posterior. A "quantidade profilaticamente eficaz" pode variar dependendo do agente de RNAi, como o agente é administrado, do grau de risco da doença, e do historial, idade, peso, historial familiar, constituição genética, dos tipos de tratamentos precedentes ou concomitantes, se alguns, e outras características individuais do paciente a ser tratado.

[00208] Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade profilaticamente eficaz" também inclui uma quantidade de um agente de RNAi que produz algum efeito local ou sistêmico desejado a uma razão razoável de benefício/risco aplicável a qualquer tratamento. O RNAi empregue nos métodos da presente invenção pode ser administrado em uma quantidade suficiente para produzir uma razão razoável de benefício/risco aplicável a esse tratamento.

[00209] O termo "amostra", como usado aqui, inclui uma coleção de fluidos, células, ou tecidos similares isolados de um indivíduo, bem como fluidos, células, ou tecidos presentes dentro de um indivíduo.

Exemplos de fluidos biológicos incluem sangue, soro e fluidos serosos, plasma, urina, linfa, fluido cerebrospinal, fluidos oculares, saliva, e similares. Amostras de tecidos podem incluir amostras de tecidos, órgãos ou regiões localizadas. Por exemplo podem ser derivadas amostras de órgãos particulares, partes de órgãos, ou fluidos ou células dentro desses órgãos. Em certas modalidades podem ser derivadas amostras do fígado (por exemplo, fígado inteiro ou certos segmentos do fígado ou certos tipos de células no fígado, tais como, por exemplo, hepatócitos). Em modalidades preferenciais, uma "amostra derivada de um indivíduo" se refere a sangue ou plasma retirado do indivíduo. Em modalidades adicionais, uma "amostra derivada de um indivíduo" se refere a tecido do fígado (ou seus subcomponentes) derivado do indivíduo.

## **II. iRNAs da Invenção**

[00210] A presente invenção fornece RNAi que inibem a expressão de um gene do componente do complemento. Em uma modalidade, o agente de RNAi inclui moléculas de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão de um gene CFB em uma célula, tal como uma célula dentro de um indivíduo, por exemplo, um mamífero, tal como um humano tendo uma doença associada ao componente do complemento tal como descrito aqui, por exemplo, PNH. Em uma outra modalidade, o agente de RNAi inclui moléculas de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão de um gene C3 em uma célula, tal como uma célula dentro de um indivíduo, por exemplo, um mamífero, tal como um humano tendo uma doença associada ao componente do complemento tal como descrito aqui, por exemplo, PNH. Em uma modalidade adicional, o agente de RNAi inclui moléculas de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão de um gene C9 em uma célula, tal como uma célula dentro de um indivíduo, por exemplo, um mamífero, tal como um humano tendo uma doença

associada ao componente do complemento tal como descrito aqui, por exemplo, PNH. O dsRNA inclui uma fita antissenso tendo uma região de complementaridade que é complementar com pelo menos uma parte de um mRNA formado na expressão de um gene alvo, isto é, gene CFB, C3 ou C9. A região de complementaridade tem cerca de 30 nucleotídeos ou menos em comprimento (por exemplo, cerca de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, ou 18 nucleotídeos ou menos em comprimento). Após contato com uma célula expressando o gene alvo, o RNAi inibe a expressão do gene alvo (por exemplo, um gene CFB, C3, ou C9 de humano, primata, não primata, ou pássaro) em pelo menos cerca de 10% como avaliado por, por exemplo, um método à base de PCR ou DNA ramificado (bDNA), ou por um método à base de proteínas, tal como por análise de imunofluorescência, usando, por exemplo, Transferência de Western ou técnicas de citometria de fluxo.

[00211] Um dsRNA inclui duas fitas de RNA que são complementares e hibridam para formar uma estrutura de duplex sob condições nas quais o dsRNA será usado. Uma fita de um dsRNA (a fita antissenso) inclui uma região de complementaridade que é substancialmente complementar, e em geral totalmente complementar, a uma sequência alvo. A sequência alvo pode ser derivada da sequência de um mRNA formado durante a expressão de um gene CFB, C3 ou C9. A outra fita (a fita senso) inclui uma região que é complementar com a fita antissenso, tal que as duas fitas hibridem e formem uma estrutura de duplex quando combinadas sob condições adequadas. Como descrito em outro lugar aqui e como conhecido na técnica, as sequências complementares de um dsRNA podem também estar contidas como regiões autocomplementares de uma única molécula de ácido nucleico, em oposição a estarem em oligonucleotídeos separados.

[00212] Em geral, a estrutura do duplex tem entre 15 e 30 pares de

bases de comprimento, por exemplo, entre 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, ou 21-22 pares de bases de comprimento. Também é contemplado que gamas e comprimentos intermédios das gamas e comprimentos listados acima sejam parte da invenção.

[00213] De modo semelhante, a região de complementaridade com a sequência alvo tem entre 15 e 30 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, entre 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, ou 21-22 nucleotídeos de comprimento. Também é contemplado que gamas e comprimentos intermédios das gamas e comprimentos listados acima sejam parte da invenção.

[00214] Em algumas modalidades, o dsRNA tem entre cerca de 15 e cerca de 20 nucleotídeos em comprimento, ou entre cerca de 25 e cerca de 30 nucleotídeos em comprimento. Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção é um dsRNA de 24-30 nucleotídeos que interage com uma sequência de RNA alvo, *isto é*, uma sequência de mRNA alvo de CFB, C3 ou C9, para dirigir a clivagem do RNA alvo. Em geral, o dsRNA é longo o suficiente para servir como um substrato para a enzima Dicer. Por exemplo é bem conhecido na técnica que dsRNAs mais longos do que cerca de 21-23 nucleotídeos em comprimento podem servir como substratos para Dicer. Como será

reconhecido pelo perito na técnica, a região de um RNA que é alvo de clivagem será muitas vezes parte de uma molécula de RNA maior, muitas vezes uma molécula de mRNA. Onde relevante, uma "parte" de um mRNA alvo é uma sequência contígua de um mRNA alvo de comprimento suficiente para permitir que seja um substrato para clivagem dirigida por RNAi (isto é, clivagem através de uma via de RISC).

[00215] O perito na técnica também reconhecerá que a região de duplex é uma porção funcional primária de um dsRNA, por exemplo, uma região de duplex de cerca de 9 até 36 pares de bases, por exemplo, cerca de 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, ou 21-22 pares de bases. Assim, em uma modalidade, na medida em que se torna processada em um duplex funcional de, por exemplo, 15-30 pares de bases, que se dirige a um RNA desejado para clivagem, uma molécula de RNA ou complexo de moléculas de RNA tendo uma região de duplex maior do que 30 pares de bases é um dsRNA. Assim, um especialista ordinariamente perito reconhecerá que, em uma modalidade, um miRNA é um dsRNA. Em outra modalidade, um dsRNA não é um miRNA ocorrendo naturalmente. Em outra modalidade, um agente de RNAi útil para ter como alvo a expressão de CFB, C3, ou C9 não é gerado na célula alvo por clivagem de um dsRNA maior.

[00216] Um dsRNA como descrito aqui pode adicionalmente incluir uma ou mais saliências de nucleotídeos de fita única, por exemplo, 1, 2, 3, ou 4 nucleotídeos. dsRNAs tendo pelo menos uma saliência de nucleotídeos podem ter propriedades inibidoras inesperadamente superiores em relação às suas contrapartidas de extremidades cegas. Uma saliência de nucleotídeos pode compreender ou consistir em um análogo de nucleotídeo/nucleosídeo, incluindo um desoxinucleotídeo/nucleosídeo. A(s) saliência(s) pode(m) estar na fita senso, na fita antissenso ou qualquer sua combinação. Além disso, o(s) nucleotídeo(s) de uma saliência pode(m) estar presente(s) na extremidade 5', extremidade 3' ou ambas as extremidades de uma fita antissenso ou senso de um dsRNA.

[00217] Um dsRNA pode ser sintetizado por métodos padrão conhecidos na técnica como adicionalmente discutido em baixo, por exemplo, por uso de um sintetizador de DNA automatizado, tais como estão comercialmente disponíveis, da, por exemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

[00218] Os compostos de iRNA da invenção podem ser preparados usando um procedimento de dois passos. Primeiramente, as fitas individuais da molécula de RNA de fita dupla são preparadas separadamente. Depois, as fitas componentes são emparelhadas. As fitas individuais do composto de siRNA podem ser preparadas usando síntese orgânica em fase de solução ou fase sólida ou ambas. A síntese orgânica oferece a vantagem de as fitas de oligonucleotídeos compreendendo nucleotídeos não naturais ou modificados poderem ser facilmente preparadas. Os oligonucleotídeos de fita única da invenção podem ser preparados usando síntese orgânica em fase de solução ou fase sólida ou ambas.

[00219] Em um aspetto, um dsRNA da invenção inclui pelo menos duas sequências de nucleotídeos, uma sequência senso e uma

sequência antissenso.

[00220] Em uma modalidade, um dsRNA da invenção se dirigindo a CFB inclui uma fita senso selecionada do grupo de sequências fornecidas em qualquer uma das Tabelas 3 e 4, e a correspondente fita antissenso da fita senso é selecionada do grupo de sequências de qualquer uma das Tabelas 3 e 4. Em este aspecto, uma das duas sequências é complementar com a outra das duas sequências, com uma das sequências sendo substancialmente complementar com uma sequência de um mRNA gerado na expressão de um gene CFB. Como tal, em este aspecto, um dsRNA irá incluir dois oligonucleotídeos, onde um oligonucleotídeo é descrito como a fita senso em qualquer uma das Tabelas 3 e 4, e o segundo oligonucleotídeo é descrito como a correspondente fita antissenso da fita senso em qualquer uma das Tabelas 3 e 4. Em uma modalidade, as sequências substancialmente complementares do dsRNA estão contidas em oligonucleotídeos separados. Em outra modalidade, as sequências substancialmente complementares do dsRNA estão contidas em um único oligonucleotídeo.

[00221] Em uma modalidade, um dsRNA da invenção se dirigindo a C3 inclui uma fita senso selecionada do grupo de sequências fornecidas em qualquer uma das Tabelas 5 e 6, e a correspondente fita antissenso da fita senso é selecionada do grupo de sequências de qualquer uma das Tabelas 5 e 6. Em este aspecto, uma das duas sequências é complementar com a outra das duas sequências, com uma das sequências sendo substancialmente complementar com uma sequência de um mRNA gerado na expressão de um gene C3. Como tal, em este aspecto, um dsRNA irá incluir dois oligonucleotídeos, onde um oligonucleotídeo é descrito como a fita senso em qualquer uma das Tabelas 5 e 6, e o segundo oligonucleotídeo é descrito como a correspondente fita antissenso da fita senso em qualquer uma das

Tabelas 5 e 6. Em uma modalidade, as sequências substancialmente complementares do dsRNA estão contidas em oligonucleotídeos separados. Em outra modalidade, as sequências substancialmente complementares do dsRNA estão contidas em um único oligonucleotídeo.

[00222] Em uma modalidade, um dsRNA da invenção se dirigindo a C9 inclui uma fita senso selecionada do grupo de sequências fornecidas em qualquer uma das Tabelas 7 e 8, e a correspondente fita antissenso da fita senso é selecionada do grupo de sequências de qualquer uma das Tabelas 7 e 8. Em este aspecto, uma das duas sequências é complementar com a outra das duas sequências, com uma das sequências sendo substancialmente complementar com uma sequência de um mRNA gerado na expressão de um gene C9. Como tal, em este aspecto, um dsRNA irá incluir dois oligonucleotídeos, onde um oligonucleotídeo é descrito como a fita senso em qualquer uma das Tabelas 7 e 8, e o segundo oligonucleotídeo é descrito como a correspondente fita antissenso da fita senso em qualquer uma das Tabelas 7 e 8. Em uma modalidade, as sequências substancialmente complementares do dsRNA estão contidas em oligonucleotídeos separados. Em outra modalidade, as sequências substancialmente complementares do dsRNA estão contidas em um único oligonucleotídeo.

[00223] Será entendido que, embora algumas das sequências nas Tabelas 3-8 sejam descritas como sequências modificadas e/ou conjugadas, o RNA do RNAi da invenção, por exemplo, um dsRNA da invenção, pode compreender qualquer uma das sequências apresentadas nas Tabelas 3-8 que seja não modificada, não conjugada, e/ou modificada e/ou conjugada diferentemente do que descrito aqui.

[00224] A pessoa perita está bem ciente de que dsRNAs tendo uma estrutura de duplex de entre 20 e 23 pares de bases, por exemplo, 21

pares de bases, têm sido aclamados como particularmente eficazes na indução da interferência de RNA (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). No entanto, outros descobriram que estruturas de dúplex de RNA mais curtas ou mais longas podem ser também eficazes (Chu e Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim et al. (2005) Nat Biotech 23:222-226). Nas modalidades descritas acima, em virtude da natureza das sequências de oligonucleotídeos fornecidas em qualquer uma das Tabelas 3-8, os dsRNAs descritos aqui podem incluir pelo menos uma fita com um comprimento mínimo de 21 nucleotídeos. Pode ser razoavelmente esperado que dúplexes mais curtos tendo uma das sequências de qualquer uma das Tabelas 3-8 menos apenas alguns nucleotídeos em uma das ou ambas as extremidades possam ser similarmente eficazes em comparação com os dsRNAs descritos acima. Consequentemente, os dsRNAs tendo uma sequência com pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais nucleotídeos contíguos derivados de uma das sequências de qualquer uma das Tabelas 3-8, e diferindo na sua capacidade de inibir a expressão do gene alvo por não mais do que cerca de 5, 10, 15, 20, 25, ou 30% de inibição de um dsRNA compreendendo a sequência completa, estão contemplados para estarem dentro do escopo da presente invenção.

[00225] Adicionalmente, os RNAs fornecidos em qualquer uma das Tabelas 3 e 4, identificam um local(ou locais) em um transcrito CFB que é(são) suscetível(suscetíveis) a clivagem mediada por RISC. Da mesma forma, os RNA fornecidos em qualquer uma das Tabelas 5 e 6 identificam um local (ou locais) em um transcrito C3 que é susceptível a clivagem mediada por RISC, e os RNA fornecidos em qualquer uma das Tabelas 7 e 8 identificam um local (ou locais) em um transcrito C9 que é susceptível a clivagem mediada por RISC. Como tal, a presente invenção apresenta adicionalmente iRNAs que se dirigem a um destes sítios. Como usado aqui se diz que um iRNA se dirige a um local

particular de um transcrito de RNA se o iRNA promover a clivagem do transcrito em qualquer lugar dentro desse local particular. Tal RNAi incluirá geralmente pelo menos cerca de 15 nucleotídeos contíguos de uma das sequências fornecidas em qualquer uma das Tabelas 3-8 acoplados a sequências de nucleotídeos adicionais retirados da região contígua à sequência selecionada no gene alvo.

[00226] Enquanto uma sequência alvo tem geralmente cerca de 15-30 nucleotídeos em comprimento existe uma ampla variação na adequabilidade de sequências particulares em esta gama para direcionamento da clivagem de qualquer RNA alvo dado. Vários pacotes de software e as linhas de orientação apresentados aqui proporcionam orientação para a identificação de sequências alvo ótimas para qualquer alvo de genes dado, mas pode ser também tomada uma abordagem empírica na qual uma "janela" ou "máscara" de um dado tamanho (como um exemplo não limitante, 21 nucleotídeos) é literal ou figurativamente (incluindo, por exemplo, *in silico*) colocada na sequência de RNA alvo para identificar sequências na gama de tamanhos que possam servir como sequências alvo. Ao se mover a "janela" da sequência progressivamente um nucleotídeo a montante ou a jusante de uma localização inicial da sequência alvo, a próxima sequência alvo potencial pode ser identificada, até ser identificado o conjunto completo de sequências possíveis para qualquer tamanho alvo selecionado dado. Este processo, acoplado a síntese sistemática e teste das sequências identificadas (usando ensaios como descrito aqui ou como conhecido na técnica) para identificar aquelas sequências que têm um desempenho ótimo, pode identificar aquelas sequências de RNA que, quando são dirigidas por um agente de iRNA, medeiam a melhor inibição da expressão do gene alvo. Assim, enquanto as sequências identificadas, por exemplo, em qualquer uma das Tabelas 3-8, representam sequências alvo efetivas, é contemplado que pode ser

alcançada otimização adicional da eficácia da inibição ao progressivamente "caminhar na janela" um nucleotídeo a montante ou a jusante das sequências dadas para identificar sequências com características de inibição iguais ou melhores.

[00227] Adicionalmente é contemplado que, para qualquer sequência identificada, por exemplo, em qualquer uma das Tabelas 3-8, poderia ser alcançada otimização adicional por adição ou remoção sistemática de nucleotídeos para gerar sequências mais longas ou mais curtas e teste dessas sequências geradas ao caminhar em uma janela do tamanho maior ou menor para cima ou para baixo do RNA alvo a partir desse ponto. Novamente, o acoplamento desta abordagem de geração de novos alvos candidatos ao teste quanto à eficácia de iRNAs com base naquelas sequências alvo em um ensaio de inibição como conhecido na técnica e/ou como descrito aqui pode levar a melhorias adicionais na eficácia da inibição. Ainda adicionalmente, tais sequências otimizadas podem ser ajustadas pela, por exemplo, introdução de nucleotídeos modificados como descrito aqui ou como conhecido na técnica, adição ou mudanças em saliências, ou outras modificações como conhecidas na técnica e/ou discutidas aqui para otimizar adicionalmente a molécula (por exemplo, aumento da estabilidade no soro ou semivida em circulação, aumento da estabilidade térmica, intensificação da administração transmembranar, direcionamento para uma localização ou tipo de célula particular, aumento da interação com enzimas da via de silenciamento, aumento da liberação a partir de endossomas) como um inibidor da expressão.

[00228] Um iRNA como descrito aqui pode conter uma ou mais não correspondências com a sequência alvo. Em uma modalidade, um iRNA como descrito aqui contém não mais do que 3 não correspondências. Se a fita antissenso do iRNA conter não correspondências com uma sequência alvo é preferencial que a área de não correspondência não

esteja localizada no centro da região de complementaridade. Se a fita antissenso do iRNA conter não correspondências com a sequência alvo é preferencial que a não correspondência esteja restrita aos últimos 5 nucleotídeos a partir da extremidade 5' ou 3' da região de complementaridade. Por exemplo, para um agente de RNAi de 23 nucleotídeos, a fita que é complementar a uma região de, por exemplo um gene CFB, geralmente não contém nenhum emparelhamento defeituoso nos 13 nucleotídeos centrais. Os métodos descritos aqui ou métodos conhecidos na técnica podem ser usados para determinar se um RNAi contendo uma não correspondência com uma sequência alvo é eficaz na inibição da expressão de um gene alvo, por exemplo, um gene CFB, C3 ou C9. A consideração da eficácia de RNAi com não correspondências na inibição da expressão de um gene alvo é importante, especialmente se a região de complementaridade particular em um gene alvo é conhecida por ter variação de sequências polimórficas dentro da população.

### **III. iRNAs Modificados da Invenção**

[00229] Em uma modalidade, o RNA do iRNA da invenção, por exemplo, um dsRNA, não é modificado, e não compreende, por exemplo, modificações e/ou conjugações químicas conhecidas na técnica e descritas aqui. Em outra modalidade, o RNA de um iRNA da invenção, por exemplo, um dsRNA, é quimicamente modificado para intensificar a estabilidade ou outras características benéficas. Em certas modalidades da invenção, substancialmente todos os nucleotídeos de um iRNA da invenção são modificados. Em outras modalidades da invenção, substancialmente todos os nucleotídeos de um iRNA da invenção são modificados os iRNAs da invenção nos quais "substancialmente todos os nucleotídeos são modificados" são grandemente mas não completamente modificados e podem incluir não mais do que 5, 4, 3, 2, ou 1 nucleotídeos não modificados.

[00230] Os ácidos nucleicos apresentados na invenção podem ser sintetizados e/ou modificados por métodos bem estabelecidos na técnica, tais como aqueles descritos em "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, NY, E.U.A., que é deste modo incorporado aqui por referência. As modificações incluem, por exemplo, modificações nas extremidades, por exemplo, modificações na extremidade 5' (fosforilação, conjugação, ligações invertidas) ou modificações na extremidade 3' (conjugação, nucleotídeos de DNA, ligações invertidas, etc.); modificações de bases, por exemplo, substituição com bases estabilizadoras, bases desestabilizadoras, ou bases que formam pares de bases com um repertório expandido de parceiros, remoção de bases (nucleotídeos abásicos), ou bases conjugadas; modificações de açúcares (por exemplo, na posição 2' ou posição 4') ou substituição do açúcar; e/ou modificações na estrutura principal, incluindo modificação ou substituição das ligações de fosfodiéster. Exemplos específicos de compostos de iRNA úteis nas modalidades descritas aqui incluem, mas não estão limitados a, RNAs contendo estruturas principais modificadas ou nenhuma ligações internucleosídeos naturais. RNAs tendo estruturas principais modificadas incluem, entre outros, aqueles que não têm um átomo de fósforo na estrutura principal. Para os propósitos desta especificação, e como por vezes referido na técnica, RNAs modificados que não têm um átomo de fósforo em sua estrutura principal internucleosídeos podem ser também considerados como sendo oligonucleosídeos. Em algumas modalidades, um iRNA modificado terá um átomo de fósforo em sua estrutura principal internucleosídeos.

[00231] Estruturas principais de RNA modificado incluem, por exemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirais, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de alquila e outras metilas incluindo fosfonatos de 3'-alquíleno e fosfonatos quirais,

fosfinatos, fosforamidatos, incluindo fosforamidato de 3'-amino e aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tioalquilfosfonatos, tioalquilfosfotriésteres, e boranofosfatos tendo ligações normais 3'-5', análogos ligados em 2'-5' destes, e aqueles tendo polaridade invertida em que os pares adjacentes de unidades de nucleosídeos estão ligados 3'-5' para 5'-3' ou 2'-5' para 5'-2'. Vários sais, sais mistos e formas de ácido livre estão também incluídos.

[00232] Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação das ligações contendo fósforo acima incluem mas não estão limitadas às Patentes U.S. Nós. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; 6.028.188; 6.124.445; 6.160.109; 6.169.170; 6.172.209; 6.239.265; 6.277.603; 6.326.199; 6.346.614; 6.444.423; 6.531.590; 6.534.639; 6.608.035; 6.683.167; 6.858.715; 6.867.294; 6.878.805; 7.015.315; 7.041.816; 7.273.933; 7.321.029; e Patente US RE39464, em que a totalidade do conteúdo de cada uma é desse modo incorporada aqui a título de referência.

[00233] As estruturas principais de RNA modificado que não incluem um átomo de fósforo nelas têm estruturas principais que são formadas por ligações internucleosídeos de alquila ou cicloalquila de cadeia curta, heteroátomos mistos e ligações internucleosídeos de alquila ou cicloalquila, ou uma ou mais ligações internucleosídeos heteroatómicas ou heterocíclicas de cadeia curta. Estas incluem aquelas tendo ligações morfolino (formadas em parte a partir da porção de açúcar de um nucleosídeo); estruturas principais de siloxano; estruturas principais de sulfureto, sulfóxido e sulfona; estruturas principais de formacetila e tioformacetila; estruturas principais de metileno formacetila e tioformacetila; estruturas principais contendo alqueno; estruturas

principais de sulfamato; estruturas principais de metilenoimino e metilenoidrazino; estruturas principais de sulfonato e sulfonamida; estruturas principais de amida; e outras tendo partes mistas dos componentes N, O, S e CH<sub>2</sub>.

[00234] Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação dos oligonucleosídeos acima incluem, mas não estão limitadas às Patentes U.S. N<sup>os</sup>. 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; e 5.677.439, em que a totalidade do conteúdo de cada uma é desse modo incorporada aqui a título de referência.

[00235] Em outras modalidades, miméticos de RNA adequados são contemplados para uso em iRNAs, nos quais tanto o açúcar como a ligação internucleosídeos, isto é, a estrutura principal, das unidades de nucleotídeos estão substituídos por grupos novos. As unidades de base são mantidas para hibridação com um composto alvo de ácido nucleico apropriado. Um tal composto oligomérico, um mimético de RNA que se mostrou que tem excelentes propriedades de hibridação, é referido como ácido nucleico de peptídeo (PNA). Em compostos de PNA, a estrutura principal de açúcar de um RNA está substituída por uma estrutura principal contendo amida, em particular uma estrutura principal de aminoetilglicina. As nucleobases são retidas e são ligadas direta ou indiretamente a átomos de nitrogênio aza da porção amida da estrutura principal. Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação de compostos de PNA incluem as, mas não estão limitadas às, Patentes dos E.U.A. N<sup>os</sup>. 5.539.082; 5.714.331; e 5.719.262, os conteúdos de cada uma das quais estão deste modo incorporados aqui por referência. Compostos de PNA adicionais adequados para uso nos iRNAs da invenção são descritos em, por exemplo, Nielsen et al.,

Science, 1991, 254, 1497-1500.

[00236] Algumas modalidades apresentadas na invenção incluem RNAs com estruturas principais de fosforotioato e oligonucleosídeos com estruturas principais com heteroátomos, e em particular --CH2--NH--CH2-, --CH2--N(CH3)--O--CH2--[conhecida como uma estrutura principal de metileno (metilimino) ou MMI], --CH2--O--N(CH3)--CH2--, --CH2--N(CH3)--N(CH3)--CH2-- e --N(CH3)--CH2--CH2--[em que a cadeia principal fosfodiéster nativa é representada como --O--P--O--CH2--] da Patente dos E.U.A. Nº. 5.489.677 acima referenciada, e as estruturas principais de amida da Patente dos E.U.A. Nº. 5.602.240 acima referenciada. Em algumas modalidades, os RNAs apresentados aqui têm estruturas da estrutura principal de morfolino da Patente dos E.U.A. Nº. 5.034.506 acima referenciada.

[00237] RNAs modificados podem também conter uma ou mais frações de açúcar substituídas. Os iRNAs, por exemplo, dsRNAs, apresentados aqui podem incluir um dos seguintes na posição 2': OH; F; O-, S-, ou N-alquila; O-, S-, ou N-alquenila; O-, S- ou N-alquinila; ou O-alquil-O-alquila, em que a alquila, alquenila e alquinila podem ser alquila C1 a C10 ou alquenila e alquinila C2 a C10 substituídas ou não substituídas. Modificações adequadas exemplares incluem O[(CH2)nO]mCH3, O(CH2)nOCH3, O(CH2)nNH2, O(CH2)nCH3, O(CH2)nONH2, e O(CH2)nON[(CH2)nCH3]]2, onde n e m são de 1 a cerca de 10. Em outras modalidades, os dsRNAs incluem um dos seguintes na posição 2': alquila C1 a C10 de cadeia curta, alquila de cadeia curta substituída, alcarila, aralquila, O-alcarila ou O-arylalquila, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, heterocicloalquila, heterocicloalcarila, aminoalquilamino, polialquilamino, silila substituída, um grupo de clivagem de RNA, um grupo repórter, um intercalador, um grupo para melhoria das propriedades farmacocinéticas de um iRNA, ou um grupo para melhoria

das propriedades farmacodinâmicas de um iRNA, e outros substituintes tendo propriedades similares. Em algumas modalidades, a modificação inclui um 2'-metoxietóxi (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, também conhecido como 2'-O-(2-metoxietil) ou 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), isto é, um grupo alcóxi-alcóxi. Outra modificação exemplar é 2'-dimetilaminooxietóxi, isto é, um grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, também conhecido como 2'-DMAOE, como descrito nos exemplos aqui em baixo, e 2'-dimetilaminoetoxietóxi (também conhecido na técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietila ou 2'-DMAEOE), isto é, 2'-O--CH<sub>2</sub>--O--CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

[00238] Outras modificações incluem 2'-metóxi (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropóxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) e 2'-flúor (2'-F). Modificações similares podem ser também feitas em outras posições no RNA de um iRNA, particularmente na posição 3' do açúcar no nucleotídeo 3' terminal ou em dsRNAs ligados em 2'-5' e na posição 5' do nucleotídeo 5' terminal. Os iRNAs podem também ter miméticos de açúcar tais como frações ciclobutila em lugar do açúcar pentofuranosila. Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação de tais estruturas de açúcares modificadas incluem as, mas não estão limitadas às, Patentes dos E.U.A. N<sup>os</sup>. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; e 5.700.920, em que algumas são propriedade comum com o presente pedido. Os conteúdos inteiros de cada uma das anteriores são deste modo incorporados aqui por referência.

[00239] Um iRNA pode também incluir modificações ou substituições de nucleobases (frequentemente referidas na técnica simplesmente como "base"). Como usado aqui, nucleobases "não modificadas" ou "naturais" incluem as bases de purina adenina (A) e guanina (G), e as bases de pirimidina timina (T), citosina (C) e uracila (U). Nucleobases

modificadas incluem outras nucleobases sintéticas e naturais tais como deóxi-timina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), citosina de 5-hidroximetila, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metila e outros de alquila de adenina e guanina, derivados de 2-propila e outros de alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-halouracila e citosina, uracila e citosina de 5-propinila, uracila de 6-azo, citosina e timina, 5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, adeninas e guaninas substituídas por 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxila e outras em 8, uracilas e citosinas substituídas por 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometila e outras em 5, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-aza-adenina, 7-desazaguanina e 7-desaza-adenina e 3-desazaguanina e 3-desaza-adenina. Nucleobases adicionais incluem aquelas descritas na Patente dos E.U.A. Nº. 3.687.808, aquelas descritas em Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; aquelas descritas em The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, aquelas descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, Edição Internacional, 1991, 30, 613, e aquelas descritas por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. e Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Certas destas nucleobases são particularmente úteis para aumento da afinidade de ligação dos compostos oligoméricos apresentados na invenção. Estas incluem pirimidinas substituídas em 5, 6-azapirimidinas e purinas substituídas em N-2, N-6 e O-6, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila e 5-propinilcitosina. Foi mostrado que substituições de 5-metilcitosina aumentam a estabilidade do duplex de ácido nucleico em 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. e Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) e são substituições de bases exemplares, ainda mais particularmente

quando combinadas com modificações de açúcar 2'-O-metoxietila.

[00240] Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação de algumas das nucleobases modificadas acima notadas, bem como de outras nucleobases modificadas, incluem mas não estão limitadas às Patentes U.S. acima notadas N°s. 3.687.808. 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; e 7.495.088, em que a totalidade do conteúdo de cada uma é desse modo incorporada aqui a título de referência.

[00241] O RNA de um RNAi pode ser também modificado para incluir uma ou mais frações de açúcar bicíclicas. Um "açúcar bicíclico" é um anel furanosil modificado pela ligação de dois átomos. Um "nucleosídeo bicíclico" ("BNA") é um nucleosídeo possuindo uma fração de açúcar compreendendo uma ponte que liga dois átomos de carbono do anel de açúcar, formando assim um sistema de anel bicíclico. Em certas modalidades, a ponte liga o carbono 4' e o carbono 2' do anel de açúcar. Assim, em algumas modalidades um agente da invenção pode incluir um ou mais ácidos nucleicos trancados (LNA). Um ácido nucleico trancado é um nucleotídeo tendo uma fração ribose modificada na qual a fração ribose compreende uma ponte extra conectando os carbonos 2' e 4'. Em outras palavras, um LNA é um nucleotídeo que compreende uma fração de açúcar bicíclica compreendendo uma ponte 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'. Esta estrutura "tranca" efetivamente a ribose na conformação estrutural 3'-endo. Foi mostrado que a adição de ácidos nucleicos trancados a siRNAs aumenta a estabilidade do siRNA no soro, e reduz efeitos fora do alvo (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, OR. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. et

al., (2003) Nucleic Acids Research 31(12):3185-3193). Exemplos de nucleosídeos bicíclicos para utilização nos polinucleotídeos da invenção incluem, sem limitação, nucleosídeos compreendendo uma ponte entre os átomos 4' e o 2' no anel ribosil. Em certas modalidades, os agentes de polinucleotídeos antissenso da invenção incluem um ou mais nucleosídeos bicíclicos compreendendo uma ponte 4' para 2'. Exemplos de tais nucleosídeos bicíclicos ligados 4' para 2', incluem mas não estão limitados a 4'-(CH<sub>2</sub>)—O-2' (LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)—S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>—O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)—O-2' (também referido como "etila limitada" ou "cEt") e 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)—O-2' (e seus análogos; ver, por exemplo, Patente E.U.A. Nº. 7.399.845); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)—O-2' (e seus análogos, ver por exemplo, Patente E.U.A. Nº. 8.278.283); 4'-CH<sub>2</sub>—N(OCH<sub>3</sub>)-2' (e seus análogos, ver por exemplo, Patente E.U.A. Nº. 8.278.425); 4'-CH<sub>2</sub>—O—N(CH<sub>3</sub>)-2' (ver, por exemplo, Publicação de Patente E.U.A. Nº. 2004/0171570); 4'-CH<sub>2</sub>—N(R)—O-2', em que R é H, alquila C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, ou um grupo protetor (ver, por exemplo, Patente E.U.A.. Nº. 7,427,672); 4'-CH<sub>2</sub>—C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (ver, por exemplo, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); e 4'-CH<sub>2</sub>—C(=CH<sub>2</sub>)-2' (e respectivos análogos; ver, por exemplo, Patentes dos E.U.A. Nº. 8.278.426). Os conteúdos inteiros de cada uma das anteriores são deste modo incorporados aqui por referência.

[00242] Patentes dos E.U.A. e Publicações de Patente dos E.U.A. representativas adicionais que ensinam a preparação de nucleotídeos de ácidos nucleicos trancados incluem as, mas não estão limitadas às, seguintes: Patentes E.U.A. Nºs. 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.034.133; 7.084.125; 7.399.845; 7.427.672; 7.569.686; 7.741.457; 8.022.193; 8.030.467; 8.278.425; 8.278.426; 8.278.283; US 2008/0039618; e E.U.A. 2009/0012281, os conteúdos de cada uma das quais estão deste modo incorporados aqui por referência.

[00243] Qualquer um dos nucleosídeos bicíclicos anteriores podem ser preparados tendo uma ou mais configurações estereoquímicas de açúcar incluindo, por exemplo,  $\alpha$ -L-ribofuranose e  $\beta$ -D-ribofuranose (ver WO 99/14226).

[00244] O RNA de um RNAi pode ser também modificado para incluir um ou mais nucleotídeos de etila limitados. Tal como aqui utilizado, um "nucleotídeo de etila limitado" ou "cEt" é um ácido nucleico trancado compreendendo uma fração de açúcar bicíclico compreendendo uma ponte 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-0-2'. Em uma modalidade, um nucleotídeo de etila limitado está na conformação S aqui referido como "S-cEt".

[00245] Um RNAi da invenção também pode incluir um ou mais "nucleotídeos conformacionalmente restritos" ("CRN"). Os CRN são análogos de nucleotídeos com um ligante fazendo a ligação dos carbonos C2' e C4' da ribose ou os carbonos C3 e C5' da ribose. Os CRN trancam o anel de ribose em uma conformação estável e aumentam a afinidade de hibridação com o mRNA. O ligante é de comprimento suficiente para colocar o oxigênio em uma posição ótima para a estabilidade e afinidade, resultando em menos pregueamento do anel de ribose.

[00246] Publicações representativas que ensinam a preparação de certos CRN acima notados incluem as, mas não estão limitadas às, Patentes dos E.U.A. Nº. 2013/0190383; e publicação PCT WO 2013/036868, os conteúdos de cada uma das quais estão deste modo incorporados aqui por referência.

[00247] Um ou mais dos nucleotídeos de um RNAi da invenção podem também incluir um nucleotídeo substituído por hidroximetila. Um "nucleotídeo substituído por hidroximetila" é um nucleotídeo acíclico 2'-3'-seco, também referido como uma modificação de "ácido nucleico desbloqueado" ("UNA").

[00248] Publicações dos E.U.A. representativas que ensinam a

preparação de UNA incluem, mas não estão limitadas às, Patente E.U.A. Nº. 8,314,227: e Publicação de Patente E.U.A. Nºs. 2013/0096289; 2013/0011922; e 2011/0313020, os conteúdos de cada uma das quais estão deste modo incorporados aqui por referência. Modificações potencialmente estabilizantes às extremidades de moléculas de RNA podem incluir N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6), N-(acetil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-NHAc), timidina-2'-O-deoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridino-3"-fosfato, dT de base invertida (dT) e outras. A divulgação desta modificação pode ser encontrada na Publicação PCT Nº. WO 2011/005861.

#### ***A. iRNAs Modificados Compreendendo Motivos da Invenção***

[00249] Em certos aspectos da invenção, os agentes de RNAi de fita dupla da invenção incluem agentes com modificações químicas como descrito, por exemplo, no Pedido Provisório dos E.U.A. Nº. 61/561,710, depositado a 18 de novembro, 2011, ou em PCT/US2012/065691, os conteúdos de cada uma das quais estão incorporados aqui por referência.

[00250] Como mostrado aqui e no Pedido Provisório Nº. 61/561,710 ou no PCT/US2012/065691 pode ser obtido um resultado superior por introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos em uma fita senso e/ou fita antissenso de um agente de RNAi, particularmente no ou próximo do local de clivagem. Em algumas modalidades, a fita senso e fita antissenso do agente de RNAi podem estar de outro modo completamente modificadas. A introdução destes motivos interrompe o padrão de modificação, se presente, da fita senso e/ou antissenso. O agente de RNAi pode estar opcionalmente conjugado com um ligante derivado de GalNAc, por exemplo na fita senso. Os agentes de RNAi resultantes

apresentam atividade de silenciamento de gene superior.

[00251] Mais especificamente foi surpreendentemente descoberto que, quando a fita senso e fita antissenso do agente de RNAi de fita dupla estão completamente modificadas para terem um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no ou próximo do local de clivagem de pelo menos uma fita de um agente de RNAi, a atividade de silenciamento de gene do agente de RNAi era superiormente intensificada.

[00252] Em conformidade, a invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibirem a expressão de um gene alvo (isto é, um gene CFB, C3 ou C9 ) in vivo. O agente de RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso. Cada fita do agente de RNAi pode variar de 12-30 nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, cada fita pode ter entre 14-30 nucleotídeos em comprimento, 17-30 nucleotídeos em comprimento, 25-30 nucleotídeos em comprimento, 27-30 nucleotídeos em comprimento, 17-23 nucleotídeos em comprimento, 17-21 nucleotídeos em comprimento, 17-19 nucleotídeos em comprimento, 19-25 nucleotídeos em comprimento, 19-23 nucleotídeos em comprimento, 19-21 nucleotídeos em comprimento, 21-25 nucleotídeos em comprimento, ou 21-23 nucleotídeos em comprimento.

[00253] A fita senso e fita antissenso formam tipicamente um RNA de fita dupla em duplex ("dsRNA"), também referido aqui como um "agente de RNAi". A região de duplex de um agente de RNAi pode ter 12-30 pares de nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, a região de duplex pode ter entre 14-30 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-30 pares de nucleotídeos em comprimento, 27-30 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-23 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-21 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-19 pares de nucleotídeos em comprimento, 19-25 pares de nucleotídeos em comprimento, 19-23 pares nucleotídeos em comprimento, 19-21

pares de nucleotídeos em comprimento, 21-25 pares de nucleotídeos em comprimento, ou 21-23 pares de nucleotídeos em comprimento. Em outro exemplo, a região de duplex é selecionada de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, e 27 nucleotídeos em comprimento.

[00254] Em uma modalidade, o agente de RNAi pode conter uma ou mais regiões de saliência e/ou grupos capping na extremidade 3', extremidade 5', ou ambas as extremidades de uma das ou ambas as fitas. A saliência pode ter 1-6 nucleotídeos em comprimento, 2-6 nucleotídeos em comprimento, 1-5 nucleotídeos em comprimento, 2-5 nucleotídeos em comprimento, 1-4 nucleotídeos em comprimento, 2-4 nucleotídeos em comprimento, 1-3 nucleotídeos em comprimento, 2-3 nucleotídeos em comprimento, ou 1-2 nucleotídeos em comprimento. As saliências podem ser o resultado de uma fita sendo mais longa do que o outro, ou o resultado de duas fitas do mesmo comprimento estando escalonadas. A saliência pode formar uma não correspondência com o mRNA alvo ou pode ser complementar com as sequências de gene sendo dirigidas ou pode ser outra sequência. As primeira e segunda fitas podem ser também unidas, por exemplo, por bases adicionais para formar uma estrutura em grampo, ou por outros ligantes não de base.

[00255] Em uma modalidade, os nucleotídeos na região de saliência do agente de RNAi podem ser cada um independentemente um nucleotídeo modificado ou não modificado incluindo, mas não limitado a, modificado por açúcar em 2', tal como 2-F, 2'-O-metila, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), e quaisquer suas combinações. Por exemplo, TT pode ser uma sequência de saliência para qualquer extremidade em qualquer fita. A saliência pode formar uma não correspondência com o mRNA alvo ou pode ser complementar com as sequências de gene sendo dirigidas ou pode ser outra sequência.

[00256] As saliências 5' ou 3' na fita senso, fita antissenso ou ambas as fitas do agente de RNAi podem estar fosforiladas. Em algumas modalidades, a(s) região(ões) de saliência contém(êm) dois nucleotídeos tendo um fosforotioato entre os dois nucleotídeos, onde os dois nucleotídeos podem ser os mesmos ou diferentes. Em uma modalidade, a saliência está presente na extremidade 3' da fita senso, fita antissenso, ou ambas as fitas. Em uma modalidade, esta saliência 3' está presente na fita antissenso. Em uma modalidade, esta saliência 3' está presente na fita senso.

[00257] O agente de RNAi pode conter apenas uma única saliência, que pode fortalecer a atividade de interferência do RNAi, sem afetar a sua estabilidade global. Por exemplo, a saliência de fita única pode estar localizada na extremidade 3'-terminal da fita senso ou, alternativamente, na extremidade 3'-terminal da fita antissenso. O RNAi pode ter também uma extremidade cega, localizada na extremidade 5' da fita antissenso (ou da extremidade 3' da fita senso) ou vice-versa. Geralmente, a fita antissenso do RNAi tem uma saliência de nucleotídeos na extremidade 3', e a extremidade 5' é cega. Embora não desejando estar limitado pela teoria, a extremidade cega assimétrica na extremidade 5' da fita antissenso e saliência na extremidade 3' da fita antissenso favorece a carga da fita guia no processo de RISC.

[00258] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 19 nucleotídeos em comprimento, em que a fita senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 7, 8, 9 a partir da extremidade 5'. A fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'.

[00259] Em outra modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 20 nucleotídeos em comprimento, em que a fita

senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 8, 9, 10 a partir da extremidade 5'. A fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'.

[00260] Ainda em outra modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 21 nucleotídeos em comprimento, em que a fita senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 9, 10, 11 a partir da extremidade 5'. A fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'.

[00261] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende uma fita senso de 21 nucleotídeos e uma fita antissenso de 23 nucleotídeos, em que a fita senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 9, 10, 11 a partir da extremidade 5'; a fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5', em que uma extremidade do agente de RNAi é cega, enquanto a outra extremidade compreende uma saliência de 2 nucleotídeos. Preferencialmente, a saliência de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' da fita antissenso. Quando a saliência de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' da fita antissenso podem existir duas ligações de internucleotídeos de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais, em que dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos da saliência, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo emparelhado próximo do nucleotídeo da saliência. Em uma modalidade, o agente de RNAi tem adicionalmente duas ligações internucleotídeos de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais tanto na extremidade 5' da fita senso como na extremidade 3' da fita antissenso.

Em uma modalidade, todos os nucleotídeos na fita senso e fita antissenso do agente de RNAi, incluindo os nucleotídeos que são parte dos motivos, são nucleotídeos modificados. Em uma modalidade, cada resíduo está independentemente modificado por um 2'-O-metila ou 3'-flúor, por exemplo, em um motivo alternado. Opcionalmente, o agente de RNAi compreende adicionalmente um ligante (preferencialmente GalNAC3).

[00262] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende uma fita senso e uma antissenso, em que a fita senso tem 25-30 resíduos de nucleotídeos em comprimento, em que começando a partir do nucleotídeo 5' terminal (posição 1) as posições 1 a 23 da primeira fita compreendem pelo menos 8 ribonucleotídeos; a fita antissenso tem 36-66 resíduos de nucleotídeos em comprimento e, começando a partir do nucleotídeo 3' terminal, compreende pelo menos 8 ribonucleotídeos nas posições emparelhadas com as posições 1-23 da fita senso para formar um duplex; em que pelo menos o nucleotídeo 3' terminal da fita antissenso não está emparelhado com a fita senso, e até 6 nucleotídeos 3' terminais consecutivos não estão emparelhados com a fita senso, formando deste modo uma saliência de fita única 3' de 1-6 nucleotídeos; em que o terminal 5' da fita antissenso compreende de 10-30 nucleotídeos consecutivos que não estão emparelhados com a fita senso, formando deste modo uma saliência 5' de fita dupla de 10-30 nucleotídeos; em que pelo menos os nucleotídeos 5' terminal e 3' terminal da fita senso estão emparelhados em termos de bases com nucleotídeos da fita antissenso quando as fitas senso e antissenso são alinhadas para complementaridade máxima, formando deste modo uma região substancialmente em duplex entre as fitas senso e antissenso; e a fita antissenso é suficientemente complementar com um RNA alvo ao longo de 19 ribonucleotídeos de comprimento da fita antissenso para reduzir a expressão de genes alvo quando o ácido nucleico de fita dupla

é introduzido em uma célula de mamífero; e em que a fita senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos, onde pelo menos um dos motivos ocorre no ou próximo do local de clivagem. A fita antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos no ou próximo do local de clivagem.

[00263] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende fitas senso e antissenso, em que o agente de RNAi compreende uma primeira fita tendo um comprimento que tem pelo menos 25 e no máximo 29 nucleotídeos e uma segunda fita tendo um comprimento que tem no máximo 30 nucleotídeos com pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'; em que a extremidade 3' da primeira fita e a extremidade 5' da segunda fita formam uma extremidade cega e a segunda fita tem mais 1-4 nucleotídeos na sua extremidade 3' do que a primeira fita, em que a região de duplex que tem pelo menos 25 nucleotídeos em comprimento, e a segunda fita é suficientemente complementar com um mRNA alvo ao longo de pelo menos 19 nucleotídeos do comprimento da segunda fita para reduzir a expressão do gene alvo quando o agente de RNAi é introduzido em uma célula de mamífero, e em que a clivagem por dicer do agente de RNAi resulta preferencialmente em um siRNA compreendendo a extremidade 3' da segunda fita, reduzindo deste modo a expressão do gene alvo no mamífero. Opcionalmente, o agente de RNAi compreende adicionalmente um ligante.

[00264] Em uma modalidade, a fita senso do agente de RNAi contém pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, onde um dos motivos ocorre no local de clivagem na fita senso.

[00265] Em uma modalidade, a fita antissenso do agente de RNAi

pode também conter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, onde um dos motivos ocorre no ou próximo do local de clivagem na fita antissenso.

[00266] Para um agente de RNAi tendo uma região de duplex com 17-23 nucleotídeos em comprimento, o local de clivagem da fita antissenso está tipicamente em torno das posições 10, 11 e 12 a partir da extremidade 5'. Assim, os motivos de três modificações idênticas podem ocorrer nas posições 9, 10, 11; posições 10, 11, 12; posições 11, 12, 13; posições 12, 13, 14; ou posições 13, 14, 15 da fita antissenso, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo a partir da extremidade 5' da fita antissenso, ou começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de duplex a partir da extremidade 5' da fita antissenso. O local de clivagem na fita antissenso pode também mudar de acordo com o comprimento da região de duplex do RNAi a partir da extremidade 5'.

[00267] A fita senso do agente de RNAi pode conter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no local de clivagem da fita; e a fita antissenso pode ter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no ou próximo do local de clivagem da fita. Quando a fita senso e a fita antissenso formam um duplex de dsRNA, a fita senso e a fita antissenso podem estar tão alinhadas que um motivo dos três nucleotídeos na fita senso e um motivo dos três nucleotídeos na fita antissenso têm pelo menos uma sobreposição de nucleotídeo, isto é, pelo menos um dos três nucleotídeos do motivo na fita senso forma um par de bases com pelo menos um dos três nucleotídeos do motivo na fita antissenso. Alternativamente, pelo menos dois nucleotídeos podem se sobrepor, ou todos os três nucleotídeos podem se sobrepor.

[00268] Em uma modalidade, a fita senso do agente de RNAi pode

conter mais do que um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos. O primeiro motivo pode ocorrer no ou próximo do local de clivagem da fita e os outros motivos podem ser uma modificação em asa. O termo "modificação em asa" aqui se refere a um motivo ocorrendo em outra porção da fita que está separada do motivo no ou próximo do local de clivagem da mesma fita. A modificação em asa é adjacente ao primeiro motivo ou está separada por pelo menos um ou mais nucleotídeos. Quando os motivos estão imediatamente adjacentes uns aos outros, então a química dos motivos é distinta uma da outra e, quando os motivos estão separados por um ou mais nucleotídeos, então as químicas podem ser as mesmas ou diferentes. Podem estar presentes duas ou mais modificações em asa. Por exemplo, quando estão presentes duas modificações em asa, cada modificação em asa pode ocorrer em uma extremidade em relação ao primeiro motivo que está no ou próximo do local de clivagem ou em qualquer um dos lados do motivo líder.

[00269] Como a fita senso, a fita antissenso do agente de RNAi pode conter mais do que um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, com pelo menos um dos motivos ocorrendo no ou próximo do local de clivagem da fita. A fita antissenso pode também conter uma ou mais modificações em asa em um alinhamento similar às modificações em asa que possam estar presentes na fita senso.

[00270] Em uma modalidade, a modificação em asa na fita senso ou fita antissenso do agente de RNAi não inclui tipicamente o primeiro um ou dois nucleotídeos terminais na extremidade 3', extremidade 5' ou ambas as extremidades da fita.

[00271] Em outra modalidade, a modificação em asa na fita senso ou fita antissenso do agente de RNAi não inclui tipicamente o primeiro um ou dois nucleotídeos emparelhados dentro da região de duplex na

extremidade 3', extremidade 5' ou ambas as extremidades da fita.

[00272] Quando a fita senso e a fita antissenso do agente de RNAi contêm cada uma pelo menos uma modificação em asa, as modificações em asa podem estar na mesma extremidade da região de duplex, e têm uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos.

[00273] Quando a fita senso e a fita antissenso do agente de RNAi contêm cada uma pelo menos duas modificações em asa, a fita senso e a fita antissenso podem estar tão alinhadas que duas modificações cada uma de uma fita estão em uma extremidade da região de duplex, tendo uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos; duas modificações cada uma de uma fita estão na outra extremidade da região de duplex, tendo uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos; duas modificações uma fita estão em cada lado do motivo líder, tendo uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos na região de duplex.

[00274] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos na fita senso e fita antissenso do agente de RNAi, incluindo os nucleotídeos que são parte dos motivos, podem estar modificados. Cada nucleotídeo pode estar modificado com a mesma ou diferente modificação que pode incluir uma ou mais alterações de um dos ou ambos os oxigênios de fosfato não ligantes e/ou de um ou mais dos oxigênios de fosfato ligantes; alteração de um constituinte do açúcar de ribose, por exemplo, da 2' hidroxila no açúcar de ribose; substituição completa da fração fosfato com ligantes "defosfo"; modificação ou substituição de uma base ocorrendo naturalmente; e substituição ou modificação da estrutura principal do fosfato de ribose.

[00275] Como os ácidos nucleicos são polímeros de subunidades, muitas das modificações ocorrem em uma posição que está repetida dentro de um ácido nucleico, por exemplo, uma modificação de uma base, ou uma fração fosfato, ou um O não ligante de uma fração fosfato.

Em alguns casos, a modificação ocorrerá em todas as presentes posições no ácido nucleico mas em muitos casos não. A título de exemplo, uma modificação pode apenas ocorrer em uma posição terminal 3' ou 5', pode apenas ocorrer em uma região terminal, por exemplo, em uma posição em um nucleotídeo terminal ou nos últimos 2, 3, 4, 5 ou 10 nucleotídeos de uma fita. Uma modificação pode ocorrer em uma região de fita dupla, uma região de fita única, ou em ambas. Uma modificação pode ocorrer apenas na região de fita dupla de um RNA ou pode apenas ocorrer em uma região de fita única de um RNA. Por exemplo, uma modificação de fosforotioato em uma posição de O não ligante pode apenas ocorrer em um dos ou ambos os terminais, pode apenas ocorrer em uma região terminal, por exemplo, em uma posição em um nucleotídeo terminal ou nos últimos 2, 3, 4, 5 ou 10 nucleotídeos de uma fita, ou pode ocorrer em regiões de fita dupla e fita única, particularmente nos terminais. A extremidade ou extremidades 5' podem estar fosforiladas.

[00276] Pode ser possível, por exemplo, intensificar a estabilidade, incluir bases particulares em saliências, ou incluir nucleotídeos modificados ou suplentes de nucleotídeos, em saliências de fita única, por exemplo, em uma saliência 3' ou 5', ou em ambas. Por exemplo pode ser desejável incluir nucleotídeos de purina em saliências. Em algumas modalidades, todas as ou algumas das bases em uma saliência 3' ou 5' podem estar modificadas, por exemplo, com uma modificação descrita aqui. As modificações podem incluir, por exemplo, o uso de modificações na posição 2' do açúcar de ribose com modificações que são conhecidas na técnica, por exemplo, o uso de desoxirribonucleotídeos, 2'-deóxi-2'-flúor (2'-F) ou 2'-O-metila modificada em vez do açúcar de ribose da nucleobase, e modificações no grupo fosfato, por exemplo, modificações de fosforotioato. As saliências não necessitam de ser homólogas com a sequência alvo.

[00277] Em uma modalidade, cada resíduo da fita senso e fita antissenso está independentemente modificado com LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietila, 2'-O-metila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-deóxi, 2'-hidroxila, ou 2'-flúor. As fitas podem conter mais do que uma modificação. Em uma modalidade, cada resíduo da fita senso e fita antissenso está independentemente modificado com 2'-O-metila ou 2'-flúor.

[00278] Pelo menos duas modificações diferentes estão tipicamente presentes na fita senso e fita antissenso. Essas duas modificações podem ser as modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor, ou outras.

[00279] Em uma modalidade, o Na e/ou Nb compreendem modificações de um padrão alternado. O termo "motivo alternado" como usado aqui se refere a um motivo tendo uma ou mais modificações, ocorrendo cada modificação em nucleotídeos alternados de uma fita. O nucleotídeo alternado pode se referir a um por cada todos os outros nucleotídeos ou um por cada três nucleotídeos, ou um padrão similar. Por exemplo, se A, B e C representarem cada um um tipo de modificação ao nucleotídeo, o motivo alternado pode ser "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAAABAAAB...", "AAABBBAABBB...", ou "ABCABCABCABC...", etc.

[00280] O tipo de modificações contido no motivo alternado pode ser o mesmo ou diferente. Por exemplo, se A, B, C, D representarem cada um um tipo de modificação no nucleotídeo, o padrão alternado, isto é, modificações em todos os outros nucleotídeos, pode ser o mesmo, mas cada uma da fita senso ou fita antissenso pode ser selecionada de várias possibilidades de modificações dentro do motivo alternado tal como "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." ou "CDCDCD...", etc.

[00281] Em uma modalidade, o agente de RNAi da invenção compreende o padrão de modificação para o motivo alternado na fita

senso em relação ao padrão de modificação para o motivo alternado na fita antissenso é trocado. A troca pode ser tal que o grupo modificado de nucleotídeos da fita senso corresponda a um grupo de nucleotídeos diferentemente modificado da fita antissenso e vice-versa. Por exemplo, a fita senso, quando emparelhada com a fita antissenso no duplex de dsRNA, o motivo alternado na fita senso pode começar com "ABABAB" a partir de 5'-3' da fita e o motivo alternado na fita antissenso pode começar com "BABABA" a partir de 5'-3' da fita dentro da região de duplex. Como outro exemplo, o motivo alternado na fita senso pode começar com "AABBAABB" a partir de 5'-3' da fita e o motivo alternado na fita antissenso pode começar com "BBAABBA" a partir de 5'-3' da fita dentro da região de duplex, tal que exista uma troca completa ou parcial dos padrões de modificação entre a fita senso e a fita antissenso.

[00282] Em uma modalidade, o agente de RNAi comprehende o padrão do motivo alternado de modificação de 2'-O-metila e modificação de 2'-F na fita senso tem uma troca em relação ao padrão do motivo alternado de modificação de 2'-O-metila e modificação de 2'-F na fita antissenso inicialmente, isto é, o nucleotídeo modificado com 2'-O-metila na fita senso emparelha em termos de base com um nucleotídeo modificado com 2'-F na fita antissenso e vice versa. A posição 1 da fita senso pode começar com a modificação de 2'-F, e a posição 1 da fita antissenso pode começar com a modificação de 2'-O-metila.

[00283] A introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos na fita senso e/ou fita antissenso interrompe o padrão de modificação inicial presente na fita senso e/ou fita antissenso. Esta interrupção do padrão de modificação das fitas senso e/ou antissenso por introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos nas fitas senso e/ou antissenso intensifica surpreendentemente a atividade de silenciamento de gene do gene alvo.

[00284] Em uma modalidade, quando o motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos é introduzido em qualquer uma das fitas, a modificação do nucleotídeo próximo do motivo é uma modificação diferente do que a modificação do motivo. Por exemplo, a porção da sequência contendo o motivo é "...NaYYYNb...", onde "Y" representa a modificação do motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e "Na" e "Nb" representam uma modificação ao nucleotídeo próximo do motivo "YYY" que é diferente da modificação de Y, e onde Na e Nb podem ser as mesmas ou diferentes modificações. Alternativamente, Na e/ou Nb podem estar presentes ou ausentes quando está presente uma modificação em asa.

[00285] O agente de RNAi pode adicionalmente compreender pelo menos uma ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato. A modificação de ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato pode ocorrer em qualquer nucleotídeo da fita senso ou fita antissenso ou ambas as fitas em qualquer posição da fita. Por exemplo, a modificação de ligação internucleotídeos pode ocorrer em todos os nucleotídeos da fita senso e/ou fita antissenso; cada modificação de ligação internucleotídeos pode ocorrer em um padrão alternado na fita senso e/ou fita antissenso; ou a fita senso ou fita antissenso pode conter ambas as modificações de ligação internucleotídeos em um padrão alternado. O padrão alternado da modificação de ligação internucleotídeos na fita senso pode ser o mesmo ou diferente da fita antissenso, e o padrão alternado da modificação de ligação internucleotídeos na fita senso pode ter uma troca em relação ao padrão alternado da modificação de ligação internucleotídeos na fita antissenso. Em uma modalidade, um agente de RNAi de fita dupla compreende ligações internucleotídeos fosforotioato 6-8. Em uma modalidade, a fita antissenso compreende duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5' e duas ligações

internucleotídeos de fosforotioato no terminal 3', e a fita senso compreende pelo menos duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5' ou no terminal 3'.

[00286] Em uma modalidade, o RNAi compreende uma modificação de ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato na região de saliência. Por exemplo, a região de saliência pode conter dois nucleotídeos tendo uma ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato entre os dois nucleotídeos. As modificações de ligação internucleotídeos podem ser também feitas para ligar os nucleotídeos da saliência aos nucleotídeos emparelhados terminais dentro da região de duplex. Por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, ou todos os nucleotídeos da saliência podem estar ligados através de ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato, e, opcionalmente, podem existir ligações de internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato adicionais ligante o nucleotídeo da saliência a um nucleotídeo emparelhado que esteja próximo do nucleotídeo da saliência. Por exemplo podem existir pelo menos duas ligações de internucleotídeos de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais, nas quais dois dos três nucleotídeos são nucleotídeos da saliência, e o terceiro é um nucleotídeo emparelhado próximo do nucleotídeo da saliência. Estes três nucleotídeos terminais podem estar na extremidade 3' da fita antissenso, na extremidade 3' da fita senso, da extremidade 5' da fita antissenso, e/ou na extremidade 5' da fita antissenso.

[00287] Em uma modalidade, a saliência de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' da fita antissenso, e existem duas ligações de internucleotídeos de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais, em que dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos da saliência, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo emparelhado próximo do nucleotídeo da saliência. Opcionalmente, o agente de RNAi pode adicionalmente ter duas ligações internucleotídeos de fosforotioato

entre os três nucleotídeos terminais tanto na extremidade 5' da fita senso como na extremidade 3' da fita antissenso.

[00288] Em uma modalidade, o agente de RNAi comprehende não correspondência(s) com o alvo, dentro do duplex, ou suas combinações. A não correspondência pode ocorrer na região de saliência ou na região de duplex. O emparelhamento de bases pode ser classificado com base na sua propensão para promover dissociação ou fusão (por exemplo, na energia livre de associação ou dissociação de um emparelhamento particular, a abordagem mais simples é examinar os pares em uma base de pares individuais, embora possa ser também usada análise do vizinho próximo ou similar). Em termos de promoção da dissociação: A:U é preferencial em relação a G:C; G:U é preferencial em relação a G:C; e I:C é preferencial em relação a G:C (I=inosina). As não correspondências, por exemplo, emparelhamentos não canônicos ou sem ser canônicos (como descrito em outro lugar aqui) são preferenciais em relação a emparelhamentos canônicos (A:T, A:U, G:C); e emparelhamentos que incluem uma base universal são preferenciais em relação a emparelhamentos canônicos.

[00289] Em uma modalidade, o agente de RNAi comprehende pelo menos um dos primeiros 1, 2, 3, 4, ou 5 pares de bases dentro das regiões de duplex a partir da extremidade 5' da fita antissenso independentemente selecionados do grupo de: A:U, G:U, I:C, e pares não correspondidos, por exemplo, emparelhamentos não canônicos ou sem ser canônicos ou emparelhamentos que incluem uma base universal, para promover a dissociação da fita antissenso na extremidade 5' do duplex.

[00290] Em uma modalidade, o nucleotídeo na posição 1 dentro da região de duplex a partir da extremidade 5' na fita antissenso é selecionado do grupo consistindo em A, dA, dU, U, e dT. Alternativamente, pelo menos um dos primeiros 1, 2 ou 3 pares de

bases dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' da fita antissenso é um par de bases AU. Por exemplo, o primeiro par de bases dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' da fita antissenso é um par de bases AU.

[00291] Em outra modalidade, o nucleotídeo na extremidade 3' da fita senso é deóxi-timina (dT). Em outra modalidade, o nucleotídeo na extremidade 3' da fita antissenso é deóxi-timina (dT). Em uma modalidade existe uma sequência curta de nucleotídeos de deóxi-timina, por exemplo, dois nucleotídeos dT na extremidade 3' da fita senso e/ou antissenso.

[00292] Em uma modalidade, a sequência da fita senso pode ser representada pela fórmula (I):

5' np-Na-(X X X)i-Nb-Y Y Y-Nb-(Z Z Z)j-Na-nq 3' (I)

em que:

i e j são cada um independentemente 0 ou 1;

p e q são cada um independentemente 0-6;

cada Na representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada Nb representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

cada np e nq representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

em que Nb e Y não têm a mesma modificação; e

XXX, YYY e ZZZ representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos. Preferencialmente, YYY é nucleotídeos todos modificados por 2'-F.

[00293] Em uma modalidade, o Na e/ou Nb compreendem

modificações de padrão alternado.

[00294] Em uma modalidade, o motivo YYY ocorre no ou próximo do local de clivagem da fita senso. Por exemplo, quando o agente de iRNA tem uma região de duplex com 17-23 nucleotídeos em comprimento, o motivo YYY pode ocorrer no ou na vizinhança do local de clivagem (por exemplo: pode ocorrer nas posições 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12 ou 11, 12, 13) da fita senso, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo, a partir da extremidade 5'; ou opcionalmente, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de duplex, a partir da extremidade 5'.

[00295] Em uma modalidade, i é 1 e j é 0, ou i é 0 e j é 1, ou ambos i e j são 1. A fita senso pode ser portanto representada pelas seguintes fórmulas:

5' np-Na-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Ib);

5' np-Na-XXX-Nb-YYY-Na-nq 3' (Ic); ou

5' np-Na-XXX-Nb-YYY-Nb-ZZZ-Na-nq 3' (Id).

[00296] Quando a fita senso é representada pela fórmula (Ib), Nb representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00297] Quando a fita senso é representada como fórmula (Ic), Nb representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00298] Quando a fita senso é representada pela fórmula (Id), Nb representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Preferencialmente, Nb é 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Cada Na pode representar independentemente

uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00299] Cada um de X, Y e Z pode ser o mesmo ou diferente uns dos outros.

[00300] Em outras modalidades, i é 0 e j é 0, e a fita senso pode ser representada pela fórmula:

5' np-Na-YYY-Na-nq 3' (Ia).

[00301] Quando a fita senso é representada pela fórmula (Ia), cada Na pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00302] Em uma modalidade, a sequência da fita antissenso do RNAi pode ser representada pela fórmula (II):

5' nq'-Na'-(Z'Z'Z')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(X'X'X')l-N'a-np' 3' (II)

em que:

k e l são cada um independentemente 0 ou 1;

p' e q' são cada um independentemente 0-6;

cada Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos differentemente modificados;

cada Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

cada np' e nq' representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

em que Nb' e Y' não têm a mesma modificação;

e

X'X'X', Y'Y'Y' e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos.

[00303] Em uma modalidade, o Na' e/ou Nb' compreendem modificações de padrão alternado.

[00304] O motivo Y'Y'Y' ocorre no ou próximo do local de clivagem da fita antissenso. Por exemplo, quando o agente de iRNA tem uma região de duplex com 17-23 nucleotídeos em comprimento, o motivo Y'Y'Y' pode ocorrer nas posições 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; ou 13, 14, 15 da fita antissenso, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo, a partir da extremidade 5'; ou, opcionalmente, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de duplex, a partir da extremidade 5'. Preferencialmente, o motivo Y'Y'Y' ocorre nas posições 11, 12, 13.

[00305] Em uma modalidade, o motivo Y'Y'Y' é nucleotídeos todos modificados com 2'-OMe.

[00306] Em uma modalidade, k é 1 e l é 0, ou k é 0 e l é 1, ou ambos k e l são 1.

[00307] A fita antissenso pode ser, portanto, representada pelas seguintes fórmulas:

5' nq'-Na'-Z'Z'Z'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-np' 3' (IIb);

5' nq'-Na'-Y'Y'Y'-Nb'-X'X'X'-np' 3' (IIc); ou

5' nq'-Na'- Z'Z'Z'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'- X'X'X'-Na'-np' 3' (IId).

[00308] Quando a fita antissenso é representada pela fórmula (IIb), Nb' representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na' pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00309] Quando a fita antissenso é representada como fórmula (IIc), Nb' representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na' pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00310] Quando a fita antissenso é representada como fórmula (IId), cada  $Nb'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada  $Na'$  pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados. Preferencialmente,  $Nb$  é 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[00311] Em outras modalidades,  $k$  é 0 e  $l$  é 0 e a fita antissenso pode ser representada pela fórmula:

5'  $np'-Na'-YY'Y'-Na'-nq' 3'$  (Ia).

[00312] Quando a fita antissenso é representada como fórmula (IIa), cada  $Na'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00313] Cada um de  $X'$ ,  $Y'$  e  $Z'$  pode ser o mesmo ou diferente uns dos outros.

[00314] Cada nucleotídeo da fita senso e fita antissenso pode estar independentemente modificado com LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietila, 2'-O-metila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-hidroxila, ou 2'-flúor. Por exemplo, cada nucleotídeo da fita senso e fita antissenso está independentemente modificado com 2'-O-metila ou 2'-flúor. Cada  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ ,  $X'$ ,  $Y'$  e  $Z'$ , em particular, pode representar uma modificação de 2'-O-metila ou uma modificação de 2'-flúor.

[00315] Em uma modalidade, a fita senso do agente de RNAi pode conter o motivo YYY ocorrendo nas posições 9, 10 e 11 da fita quando a região de duplex tem 21 nt, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo a partir da extremidade 5', ou, opcionalmente, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de duplex, a partir da extremidade 5'; e Y representa modificação de 2'-F. A fita senso pode adicionalmente conter o motivo XXX ou motivos ZZZ

como modificações em asa na extremidade oposta da região de dúplex; e XXX e ZZZ representam independentemente cada um uma modificação de 2'-OMe ou uma modificação de 2'-F.

[00316] Em uma modalidade, a fita antissenso pode conter o motivo Y'Y'Y' ocorrendo nas posições 11, 12, 13 da fita, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo a partir da extremidade 5', ou, opcionalmente, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de dúplex, a partir da extremidade 5'; e Y' representa modificação de 2'-O-metila. A fita antissenso pode adicionalmente conter o motivo X'X'X' ou motivos Z'Z'Z' como modificações em asa na extremidade oposta da região de dúplex; e X'X'X' e Z'Z'Z' representam independentemente cada um uma modificação de 2'-OMe ou uma modificação de 2'-F.

[00317] A fita senso representada por qualquer uma das fórmulas (Ia), (Ib), (Ic), e (Id) acima forma um duplex com uma fita antissenso sendo representada por qualquer uma das fórmulas (IIa), (IIb), (IIc), e (IId), respectivamente.

[00318] Conformemente, os agentes de RNAi para uso nos métodos da invenção podem compreender uma fita senso e uma fita antissenso, tendo cada fita 14 a 30 nucleotídeos, o duplex de RNAi representado pela fórmula (III):

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

antissenso: 3' np'-Na'-(X'X'X')k-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-(Z'Z'Z')l-Na'-nq' 5' (III)

em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;

cada Na e Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada  $Nb$  e  $Nb'$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

em que

cada  $np'$ ,  $np$ ,  $nq'$ , e  $nq$ , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência; e

$XXX$ ,  $YYY$ ,  $ZZZ$ ,  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$ , e  $Z'Z'Z'$  representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos.

[00319] Em uma modalidade,  $i$  é 0 e  $j$  é 0; ou  $i$  é 1 e  $j$  é 0; ou  $i$  é 0 e  $j$  é 1; ou ambos  $i$  e  $j$  são 0; ou ambos  $i$  e  $j$  são 1. Em outra modalidade,  $k$  é 0 e  $l$  é 0; ou  $k$  é 1 e  $l$  é 0;  $k$  é 0 e  $l$  é 1; ou ambos  $k$  e  $l$  são 0; ou ambos  $k$  e  $l$  são 1.

[00320] Combinações exemplares da fita senso e fita antissenso formando um duplex de RNAi incluem as fórmulas em baixo:

5'  $np$ -Na-Y Y Y-Na-nq 3'

3'  $np'$ -Na'-Y'Y'Y' -Na'nq' 5' (IIIa)

5' np-Na-Y Y Y-Nb-Z Z Z-Na-nq 3'

3'  $np'$ -Na'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na'nq' 5' (IIIb)

5' np-Na-X X X-Nb-Y Y Y-Na-nq 3'

3'  $np'$ -Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Na'-nq' 5' (IIIc)

5' np-Na-X X X-Nb-Y Y Y-Nb-Z Z Z-Na-nq 3'

3'  $np'$ -Na'-X'X'X'-Nb'-Y'Y'Y'-Nb'-Z'Z'Z'-Na-nq' 5' (IIId)

[00321] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIa), cada  $Na$  representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00322] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIb), cada  $Nb$  representa independentemente uma sequência de

oligonucleotídeos compreendendo 1-10, 1-7, 1-5 ou 1-4 nucleotídeos modificados. Cada Na representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00323] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIlc), cada Nb, Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00324] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIId), cada Nb, Nb' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada Na, Na' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados. Cada um de Na, Na', Nb e Nb' representa independentemente modificações de padrão alternado.

[00325] Cada um de X, Y e Z nas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIlc), e (IIId) pode ser o mesmo ou diferentes uns dos outros.

[00326] Quando o agente de RNAi é representado pelas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIlc), e (IIId), pelo menos um dos nucleotídeos Y pode formar um par de bases com um dos nucleotídeos Y'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos Y formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos Y'; ou todos os três nucleotídeos Y formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos Y'.

[00327] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIb) ou (IIId), pelo menos um dos nucleotídeos Z pode formar um par de bases com um dos nucleotídeos Z'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos Z formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos Z'; ou todos os três nucleotídeos Z formam pares de bases

com os correspondentes nucleotídeos Z'.

[00328] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIlc) ou (IIId), pelo menos um dos nucleotídeos X pode formar um par de bases com um dos nucleotídeos X'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos X formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos X'; ou todos os três nucleotídeos X formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos X'.

[00329] Em uma modalidade, a modificação no nucleotídeo Y é diferente da modificação no nucleotídeo Y', a modificação no nucleotídeo Z é diferente da modificação no nucleotídeo Z', e/ou a modificação no nucleotídeo X é diferente da modificação no nucleotídeo X'.

[00330] Em uma modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de Na são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor. Em outra modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de Na são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor e  $np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato. Ainda em outra modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de Na são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor,  $np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de ligação de fosforotioato, e a fita senso está conjugada com um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente (descrito em baixo). Em outra modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de Na são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor,  $np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de ligação de fosforotioato, a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato, e a fita senso está conjugada com um ou mais derivados

de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[00331] Em uma modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIa), as modificações de Na são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor,  $np' > 0$  e pelo menos um  $np'$  está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de ligação de fosforotioato, a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato, e a fita senso está conjugada com um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[00332] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um multímero contendo pelo menos dois dúplexes representados pelas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (IIId), em que os dúplexes estão conectados por um ligante. O ligante pode ser clivável ou não clivável. Opcionalmente, o multímero compreende adicionalmente um ligante. Cada um dos dúplexes pode se dirigir ao mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos dúplexes pode se dirigir ao mesmo gene em dois locais alvo diferentes.

[00333] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um multímero contendo três, quatro, cinco, seis ou mais dúplexes representados pelas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (IIId), em que os dúplexes estão conectados por um ligante. O ligante pode ser clivável ou não clivável. Opcionalmente, o multímero compreende adicionalmente um ligante. Cada um dos dúplexes pode se dirigir ao mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos dúplexes pode se dirigir ao mesmo gene em dois locais alvo diferentes.

[00334] Em uma modalidade, dois agentes de RNAi representados pelas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (IIId) estão ligados um ao outro na extremidade 5', e uma das ou ambas as extremidades 3' e estão opcionalmente conjugados com um ligante. Cada um dos agentes

pode se dirigir ao mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos agentes pode se dirigir ao mesmo gene em dois locais alvo diferentes.

[00335] Várias publicações descrevem agentes de RNAi multiméricos que podem ser usados nos métodos da invenção. Tais publicações incluem WO2007/091269, Patentes dos EUA Nº. 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 e WO2011/031520, os conteúdos inteiros das quais são deste modo incorporadas aqui por referência.

[00336] Como descrito em mais detalhe em baixo, o agente de RNAi que contém conjugações de uma ou mais frações carboidrato com um agente de RNAi pode otimizar uma ou mais propriedades do agente de RNAi. Em muitos casos, a fração carboidrato estará anexada a uma subunidade modificada do agente de RNAi. Por exemplo, o açúcar de ribose de uma ou mais subunidades de nucleotídeos de um agente de dsRNA pode estar substituído por outra fração, por exemplo, um transportador não de carboidrato (preferencialmente cílico) à qual está anexado um ligante de carboidrato. Uma subunidade de ribonucleotídeos na qual o açúcar de ribose da subunidade foi assim substituída é referida aqui como uma subunidade de modificação de substituição de ribose (RRMS). Um transportador cílico pode ser um sistema em anel carbocíclico, isto é, todos os átomos no anel são átomos de carbono, ou um sistema em anel heterocíclico, isto é, um ou mais átomos no anel podem ser um heteroátomo, por exemplo, nitrogénio, oxigénio, enxofre. O transportador cílico pode ser um sistema em anel monocíclico, ou pode conter dois ou mais anéis, por exemplo, anéis fundidos. O transportador cílico pode ser um sistema em anel completamente saturado, ou pode conter uma ou mais ligações duplas.

[00337] O ligante pode estar anexado ao polinucleotídeo através de

um transportador. Os transportadores incluem (i) pelo menos um "ponto de anexação à estrutura principal", preferencialmente dois "pontos de anexação à estrutura principal" e (ii) pelo menos um "ponto de anexação preso". Um "ponto de anexação à estrutura principal" como usado aqui se refere a um grupo funcional, por exemplo, um grupo hidroxila, ou, geralmente, uma ligação disponível para, ou que é adequada para, incorporação do transportador na estrutura principal, por exemplo, estrutura principal contendo fosfato, ou fosfato modificado, por exemplo, enxofre, de um ácido ribonucleico. Um "ponto de anexação preso" (TAP) em algumas modalidades se refere a um átomo no anel constituinte do transportador cíclico, por exemplo, um átomo de carbono ou um heteroátomo (distinto de um átomo que proporciona um ponto de anexação à estrutura principal), que conecta uma fração selecionada. A fração pode ser, por exemplo, um carboidrato, por exemplo, monossacarídeo, dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeo e polissacarídeo. Opcionalmente, a fração selecionada está conectada por uma corrente interveniente ao transportador cíclico. Assim, o transportador cíclico incluirá frequentemente um grupo funcional, por exemplo, um grupo amino, ou, geralmente, proporcionará uma ligação, que é adequada para incorporação ou aprisionamento de outra entidade química, por exemplo, um ligante ao anel constituinte.

[00338] Os agentes de RNAi podem estar conjugados com um ligante através de um transportador, em que o transportador pode ser grupo cíclico ou grupo acíclico; preferencialmente, o grupo cíclico é selecionado de pirrolidinila, pirazolinila, pirazolidinila, imidazolinila, imidazolidinila, piperidinila, piperazinila, [1,3]dioxolano, oxazolidinila, isoxazolidinila, morfolinila, tiazolidinila, isotiazolidinila, quinoxalinila, piridazinonila, tetra-hidrofurila e decalina; preferencialmente, o grupo acíclico é selecionado de estrutura principal de serinol ou estrutura principal de dietanolamina.

[00339] Em certas modalidades específicas, o agente de RNAi para uso nos métodos da invenção é um agente selecionado do grupo de agentes listados em qualquer uma das Tabelas 3-8. Estes agentes podem adicionalmente compreender um ligante.

#### **IV. iRNAs Conjugados com Ligandos**

[00340] Outra modificação do RNA de um iRNA da invenção envolve ligação química ao RNA de um ou mais ligandos, frações ou conjugados que intensificam a atividade, distribuição celular ou captação celular do iRNA. Tais frações incluem, mas não estão limitadas a frações de lípidos tais como uma fração de colesterol (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), um tioéter, por exemplo, beril-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), um tiocolosterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), uma cadeia alifática, por exemplo, dodecandiol ou resíduos undecila (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), um fosfolípido, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amônio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), uma poliamina ou uma cadeia de polietileno glicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), ou adamantano de ácido acético (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), uma fração palmitila (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), ou uma fração octadecilamina ou hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

[00341] Em uma modalidade, um ligante altera a distribuição, direcionamento ou tempo de vida de um agente de iRNA no qual é

incorporado. Em modalidades preferenciais, um ligante proporciona uma afinidade intensificada para um alvo selecionado, por exemplo, molécula, célula ou tipo de célula, compartimento, por exemplo, um compartimento celular ou de órgão, tecido, órgão ou região do corpo, por exemplo, em comparação com uma espécie desprovida de um tal ligante. Ligandos preferenciais não tomarão parte do emparelhamento de duplex em um ácido nucleico em duplex.

[00342] Os ligandos podem incluir uma substância ocorrendo naturalmente, tal como uma proteína (por exemplo, albumina do soro humano (HSA), lipoproteína de baixa densidade (LDL), ou globulina); carboidrato (por exemplo, uma dextrana, pululana, quitina, quitosana, inulina, ciclodextrina, N-acetilgalactosamina, ou ácido hialurônico); ou um lípido. O ligante pode ser também uma molécula recombinante ou sintética, tal como um polímero sintético, por exemplo, um poliaminoácido sintético. Exemplos de poliaminoácidos incluem poliaminoácido é uma polilisina (PLL), poliácido L-aspártico, poliácido L-glutâmico, copolímero de estireno-anidrido do ácido maleico, copolímero poli(L-lactídeo-co-glicolídeo), copolímero de éter de divinila-anidrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietileno glicol (PEG), álcool de polivinila (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, ou polifosfazina. Exemplos de poliaminas incluem: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopeptídeo-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina de dendrímero, arginina, amidina, protamina, lípido catiônico, porfirina catiônica, sal quaternário de uma poliamina, ou um peptídeo alfa helicoidal.

[00343] Os ligandos podem também incluir grupos de direcionamento, por exemplo, um agente de direcionamento de células ou tecidos, por exemplo, uma lectina, glicoproteína, lípido ou proteína, por exemplo, um anticorpo, que se liga a um tipo especificado de células

tal como uma célula dos rins. Um grupo de direcionamento pode ser uma tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensioativa A, Carboidrato de mucina, lactose multivalente, galactose multivalente, N-acetyl-galactosamina, N-acetyl-glucosamina, manose multivalente, fucose multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactose multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, um lípido, colesterol, um esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina, ou peptídeo RGD ou mimético de peptídeo RGD.

[00344] Outros exemplos de ligandos incluem corantes, agentes intercaladores (por exemplo, acridinas), reticulantes (por exemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Safirina), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (por exemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleases artificiais (por exemplo, EDTA), moléculas lipofílicas, por exemplo, colesterol, ácido cólico, adamantano de ácido acético, ácido 1-pireno butírico, di-hidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexila, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecila, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoíl)litocólico, ácido O3-(oleoíl)colênico, dimetoxitritila, ou fenoxazina e conjugados de peptídeo (por exemplo, peptídeo de antennapedia, peptídeo Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por exemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, poliamino, alquila, alquila substituída, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por exemplo, biotina), facilitadores do transporte/absorção (por exemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleases sintéticas (por exemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, aglomerados de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complexos Eu<sup>3+</sup> de tetraazamacrociclos), dinitrofenila, HRP, ou AP.

[00345] Os ligandos podem ser proteínas, por exemplo, glicoproteínas, ou peptídeos, por exemplo, moléculas tendo uma

afinidade específica para um coligando, ou anticorpos, por exemplo, um anticorpo que se liga a um tipo de células especificado tal como uma célula hepática. Os ligandos podem também incluir hormônios e receptores de hormônios. Podem também incluir espécies não peptídicas, tais como lípidos, lectinas, carboidratos, vitaminas, cofatores, lactose multivalente, galactose multivalente, N-acetilgalactosamina, N-acetil-glucosamina, manose multivalente, ou fucose multivalente. O ligante pode ser, por exemplo, um lipopolissacarídeo, um ativador de p38 MAP cinase, ou um ativador de NF-κB.

[00346] O ligante pode ser uma substância, por exemplo, um fármaco, que pode aumentar a captação do agente de iRNA para a célula, por exemplo, por disruptão do citoesqueleto da célula, por exemplo, por disruptão dos microtúbulos, microfilamentos, e/ou filamentos intermédios da célula. O fármaco pode ser, por exemplo, taxon, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jiplinaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, ou mioservina.

[00347] Em algumas modalidades, um ligante anexado a um iRNA como descrito aqui atua como um modulador farmacocinético (modulador PK). Os moduladores PK incluem lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípido, peptídeos, agentes de ligação de proteína, PEG, vitaminas, etc. Moduladores PK exemplares incluem, mas não estão limitados a, colesterol, ácidos graxos, ácido cólico, ácido litocólico, diaquiglicerídeos, diacilglicerídeos, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. Sabe-se também que oligonucleotídeos que compreendem um número de ligações de fosforotioato se ligam a proteína do soro, logo, oligonucleotídeos curtos, por exemplo, oligonucleotídeos de cerca de 5 bases, 10 bases, 15 bases ou 20 bases, compreendendo múltiplas de ligações de fosforotioato na estrutura principal são também passíveis na presente invenção como ligandos (por exemplo, como ligandos de

modulação PK). Adicionalmente, aptâmeros que se ligam a componentes do soro (por exemplo, proteínas do soro) são também adequados para uso como ligantes de modulação PK nas modalidades descritas aqui.

[00348] Oligonucleotídeos conjugados com ligandos da invenção podem ser sintetizados pelo uso de um oligonucleotídeo que transporta uma funcionalidade reativa pendente, tal como aquela derivada da anexação de uma molécula de ligação ao oligonucleotídeo (descrito em baixo). Este oligonucleotídeo reativo pode reagir diretamente com ligandos comercialmente disponíveis, ligandos que são sintetizados transportando qualquer um de uma variedade de grupos protetores, ou ligandos que têm uma fração de ligação anexada a eles.

[00349] Os oligonucleotídeos usados nos conjugados da presente invenção podem ser conveniente e rotineiramente preparados através da técnica bem conhecida de síntese em fase sólida. Equipamento para tal síntese é vendido por vários vendedores, incluindo, por exemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Quaisquer outros meios para tal síntese conhecidos na técnica podem ser adicional ou alternativamente empregues. É também conhecido usar técnicas similares para preparar outros oligonucleotídeos, tais como os fosforotioatos e derivados alquilados.

[00350] Nos oligonucleotídeos conjugados com ligandos e nucleosídeos ligados específicos quanto a sequências transportando moléculas de ligandos da presente invenção, os oligonucleotídeos e oligonucleosídeos podem ser montados em um sintetizador de DNA adequado utilizando precursores de nucleotídeos ou nucleosídeos padrão, ou precursores de conjugados de nucleotídeos ou nucleosídeos que já transportam a fração de ligação, precursores de conjugados de ligante-nucleotídeo ou nucleosídeo que já transportam a molécula de ligante, ou blocos de construção não transportando nucleosídeo ligante.

[00351] Quando se usa precursores de conjugados de nucleotídeos que já transportam uma fração de ligação, a síntese dos nucleosídeos ligados específicos quanto a sequências é tipicamente completada, e a molécula de ligante é então reagida com a fração de ligação para formar o oligonucleotídeo conjugado com ligante. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos ou nucleosídeos ligados da presente invenção são sintetizados por um sintetizador automatizado usando fosforamiditas derivadas de conjugados de ligante-nucleosídeo adicionalmente fosforamiditas padrão e fosforamiditas não padrão que estão comercialmente disponíveis e são rotineiramente usados na síntese de oligonucleotídeos.

#### ***A. Conjugados de Lípidos***

[00352] Em uma modalidade, o ligante ou conjugado é um lípido ou molécula à base de lípidos. Um tal lípido ou molécula à base de lípidos se liga preferivelmente a uma proteína do soro, por exemplo, albumina do soro humano (HSA). Um ligante de ligação à HSA permite distribuição do conjugado em um tecido alvo, por exemplo, um tecido alvo do corpo sem ser rim. Por exemplo, o tecido alvo pode ser o fígado, incluindo células parenquimais do fígado. Outras moléculas que podem se ligar à HSA podem ser também usadas como ligandos. Por exemplo, pode ser usada neproxina ou aspirina. Um ligante de lípidos ou à base de lípidos pode (a) aumentar a resistência à degradação do conjugado, (b) aumentar o direcionamento ou transporte para uma célula ou membrana da célula alvo, e/ou (c) ser usado para ajustar a ligação a uma proteína do soro, por exemplo, HSA.

[00353] Um ligante à base de lípidos pode ser usado para inibir, por exemplo, controlar, a ligação do conjugado a um tecido alvo. Por exemplo será menos provável que um ligante de lípidos ou à base de lípidos que se liga à HSA mais fortemente seja dirigido ao rim e portanto será menos provável que seja eliminado do corpo. Um ligante de lípidos

ou à base em lípidos que se liga à HSA menos fortemente pode ser usado para dirigir o conjugado ao rim.

[00354] Em uma modalidade preferencial, o ligante à base de lípidos se liga à HSA. Preferencialmente se liga à HSA com uma afinidade suficiente tal que o conjugado seja preferencialmente distribuído a um tecido sem ser rim. No entanto é preferencial que a afinidade não seja tão forte que a ligação HSA-ligante não possa ser revertida.

[00355] Em outra modalidade preferencial, o ligante à base de lípidos se liga à HSA fracamente ou não de todo, tal que o conjugado será preferencialmente distribuído ao rim. Outras frações que se dirigem a células dos rins podem ser também usadas em lugar do ou adicionalmente ao ligante à base de lípidos.

[00356] Em outro aspeto, o ligante é uma fração, por exemplo, uma vitamina, que é absorvida por uma célula alvo, por exemplo, uma célula em proliferação. Estes são particularmente úteis para tratamento de distúrbios caracterizados por proliferação celular indesejada, por exemplo, do tipo maligno ou não maligno, por exemplo, células cancerígenas. Vitaminas exemplares incluem vitamina A, E, e K. Outras vitaminas exemplares incluídas são vitamina B, por exemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal ou outras vitaminas ou nutrientes captados por células alvo tais como células do fígado. Estão também incluídas HSA e lipoproteína de baixa densidade (LDL).

### ***B. Agentes de Permeação de Células***

[00357] Em outro aspeto, o ligante é um agente de permeação de células, preferencialmente um agente de permeação de células helicoidal. Preferencialmente, o agente é anfipático. Um agente exemplar é um peptídeo tal como tat ou de antennapedia. Se o agente for um peptídeo pode estar modificado, incluindo um mimético de peptidila, invertômeros, ligações não de peptídeo ou de pseudopeptídeo, e uso de D-aminoácidos. O agente helicoidal é

preferencialmente um agente alfa-helicoidal, que tem preferencialmente uma fase lipofílica e uma lipofóbica.

[00358] O ligante pode ser um peptídeo ou peptidomimético. Um peptidomimético (também referido aqui como oligopeptidomimético) é uma molécula capaz de se dobrar em uma estrutura tridimensional definida similar a um peptídeo natural. A ligação de peptídeos e peptidomiméticos a agentes de iRNA pode afetar a distribuição farmacocinética do iRNA, tal como por intensificação do reconhecimento e absorção celulares. A fração de peptídeo ou peptidomimética pode ter cerca de 5-50 aminoácidos de comprimento, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 aminoácidos em comprimento.

[00359] Um peptídeo ou peptidomimético pode ser, por exemplo, um peptídeo de permeação de células, peptídeo catiônico, peptídeo anfipático, ou peptídeo hidrofóbico (por exemplo, consistindo maioritariamente de Tyr, Trp ou Phe). A fração de peptídeo pode ser um peptídeo de dendrímeros, peptídeo restringido ou peptídeo reticulado. Em outra alternativa, a fração de peptídeo pode incluir uma sequência de translocação membranar (MTS) hidrofóbica. Um peptídeo contendo MTS hidrofóbica exemplar é RFGF tendo a sequência de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID N°: 23). Um análogo de RFGF (por exemplo, sequência de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID N°: 24)) contendo uma MTS hidrofóbica pode ser também uma fração de direcionamento. A fração de peptídeo pode ser um peptídeo de "distribuição", que pode transportar grandes moléculas polares incluindo peptídeos, oligonucleotídeos, e proteína através de membranas celulares. Por exemplo se descobriu que sequências da proteína Tat do HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID N°: 25)) e da proteína *Antennapedia* de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID N°: 26)) são capazes de funcionar como peptídeos de distribuição. Um peptídeo ou

peptidomimético pode ser codificado por uma sequência aleatória de DNA, tal como um peptídeo identificado a partir de uma biblioteca de exibição de fagos, ou biblioteca combinatorial de uma-esférula-um-composto (OBOC) (Lam et al., *Nature*, 354:82-84, 1991). Exemplos de um peptídeo ou peptidomimético preso a um agente de dsRNA através de uma unidade monomérica incorporada para propósitos de direcionamento a células são um peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), ou mímico de RGD. Uma fração de peptídeo pode variar em comprimento de cerca de 5 aminoácidos a cerca de 40 aminoácidos. As frações de peptídeo podem ter uma modificação estrutural, tal como para aumentar a estabilidade ou dirigir propriedades conformacionais. Pode ser utilizada qualquer uma das modificações estruturais descritas em baixo.

[00360] Um peptídeo RGD para uso nas composições e métodos da invenção pode ser linear ou cílico, e pode ser modificado, por exemplo, glicosilado ou metilado, para facilitar o direcionamento a tecido(s) específico(s). Peptídeos e peptidomiméticos contendo RGD podem incluir D-aminoácidos, bem como mímicos sintéticos de RGD. Adicionalmente a RGD se pode usar outras frações que se dirigem ao ligante de integrina. Conjugados preferenciais deste ligante se dirigem a PECAM-1 ou VEGF.

[00361] Um "peptídeo de permeação de células" é capaz de permear uma célula, por exemplo, uma célula microbiana, tal como uma célula bacteriana ou fúngica, ou uma célula de mamífero, tal como uma célula de humano. Um peptídeo de permeação de células microbianas pode ser, por exemplo, um peptídeo linear  $\alpha$ -helicoidal (por exemplo, LL-37 ou Ceropina P1), um peptídeo contendo ligações dissulfeto (por exemplo,  $\alpha$ -defensina,  $\beta$ -defensina ou bactenecina), ou um peptídeo contendo somente um ou dois aminoácidos dominantes (por exemplo, PR-39 ou indolicidina). Um peptídeo de permeação de células pode

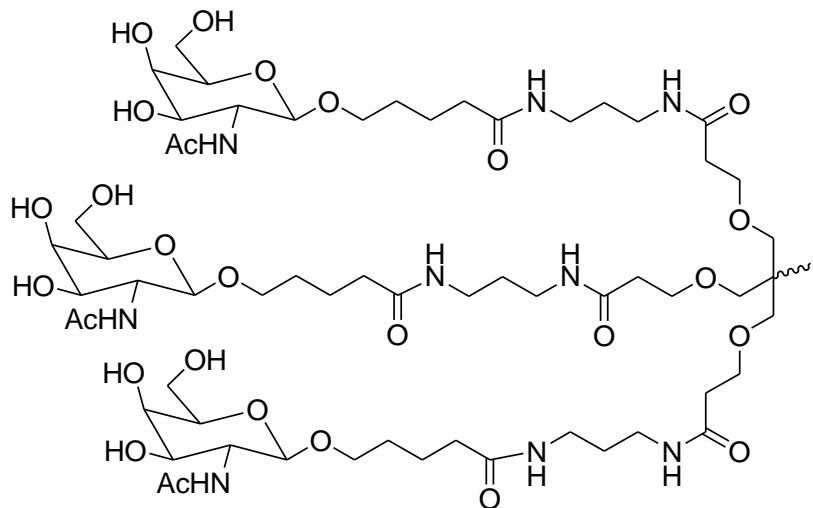
também incluir um sinal de localização nuclear (NLS). Por exemplo, um peptídeo de permeação de células pode ser um peptídeo anfipático bipartido, tal como MPG, que é derivado do domínio do peptídeo de fusão de gp41 do HIV-1 e do NLS do antígeno T grande do SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

### **C. Conjugados de Carboidratos**

[00362] Em algumas modalidades das composições e métodos da invenção, um oligonucleotídeo de iRNA compreende adicionalmente um carboidrato. Os iRNA conjugados com carboidratos são vantajosos para administração *in vivo* de ácidos nucleicos, bem como composições adequadas para uso terapêutico *in vivo*, como descrito aqui. Como usado aqui, "carboidrato" se refere a um composto que é um carboidrato per se constituído por uma ou mais unidades de monossacarídeo tendo pelo menos 6 átomos de carbono (que podem ser lineares, ramificadas ou cíclicas) com um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre ligado a cada átomo de carbono; ou um composto tendo como uma sua parte uma fração carboidrato constituída por uma ou mais unidades de monossacarídeo tendo cada uma pelo menos seis átomos de carbono (que pode ser linear, ramificada ou cíclica), com um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre ligado a cada átomo de carbono. Carboidratos representativos incluem os açúcares (mono-, di-, tri- e oligossacarídeos contendo de cerca de 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 unidades de monossacarídeo), e polissacarídeos tais como amidos, glicogênio, celulose e gomas de polissacarídeos. Monossacarídeos específicos incluem açúcares C5 e superiores (por exemplo, C5, C6, C7 ou C8); di- e trissacarídeos incluem açúcares tendo duas ou três unidades de monossacarídeo (por exemplo, C5, C6, C7 ou C8).

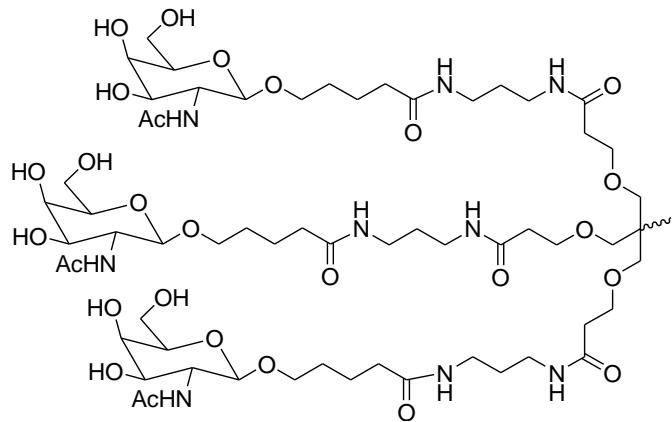
[00363] Em uma modalidade, um conjugado de carboidrato para uso nas composições e métodos da invenção é um monossacarídeo. Em uma modalidade, o monossacarídeo é uma N-acetilgalactosamina, tal

como

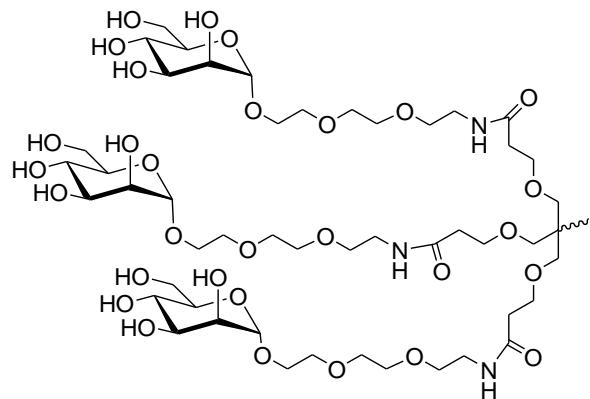


Fórmula II.

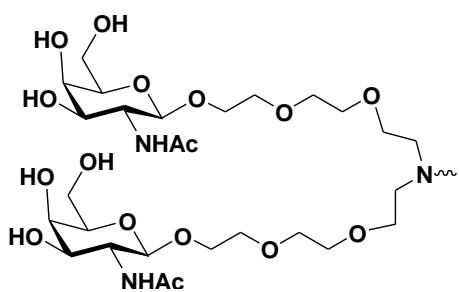
[00364] Em outra modalidade, um conjugado de carboidrato para uso nas composições e métodos da invenção é selecionado do grupo consistindo em:



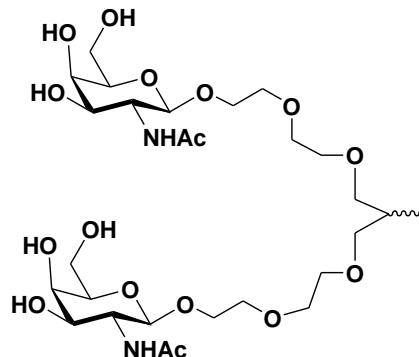
Fórmula II,



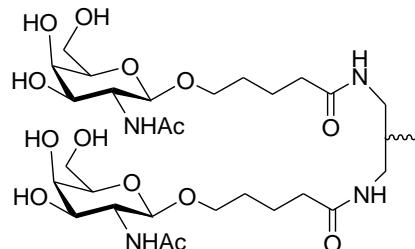
Fórmula III,



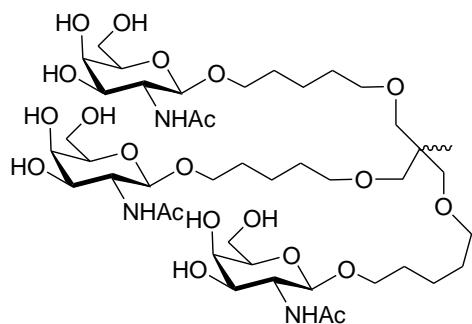
Fórmula IV,



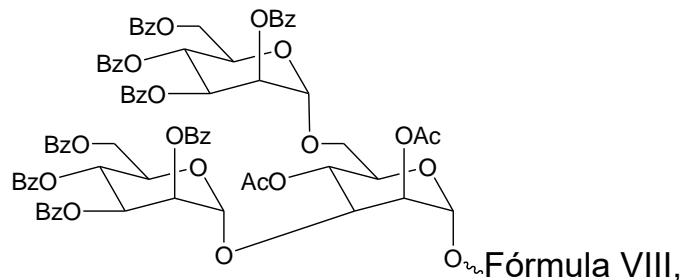
Fórmula V,



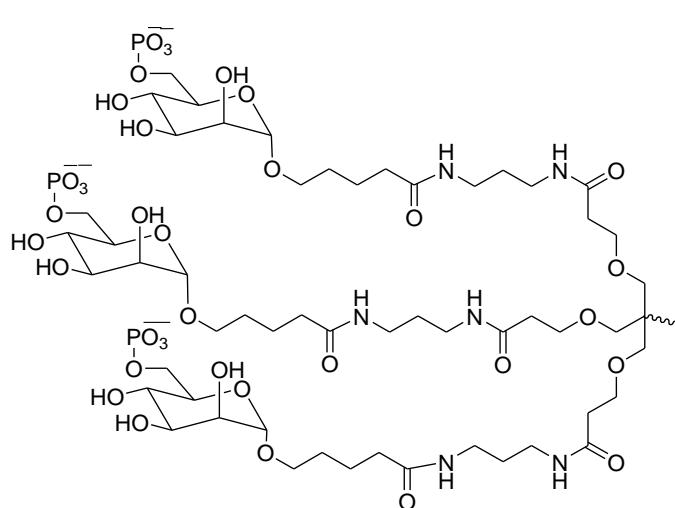
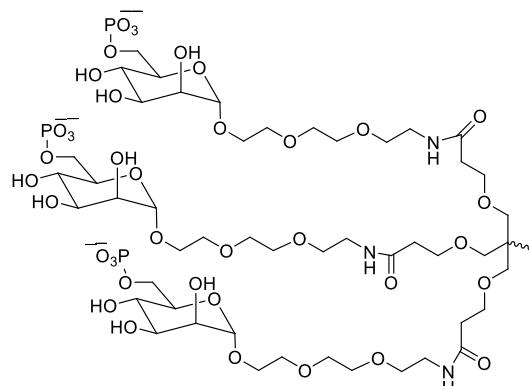
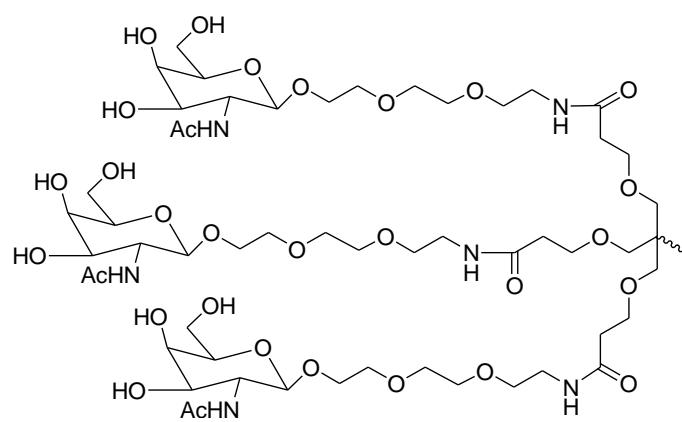
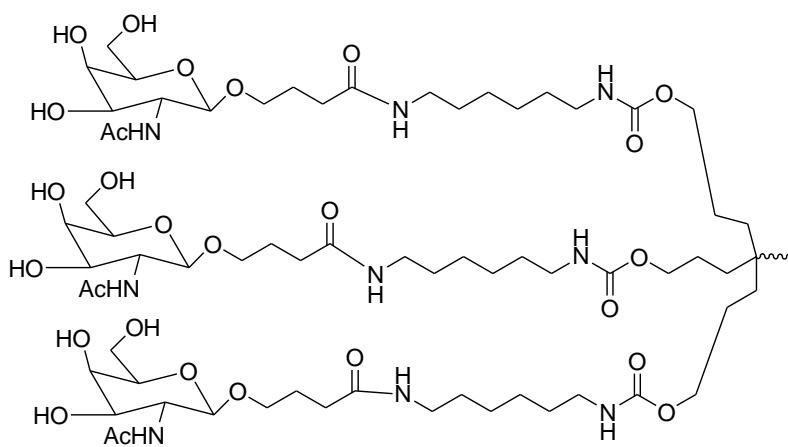
Fórmula VI,

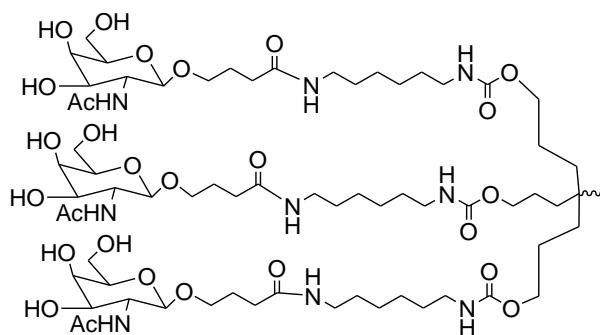


Fórmula VII,

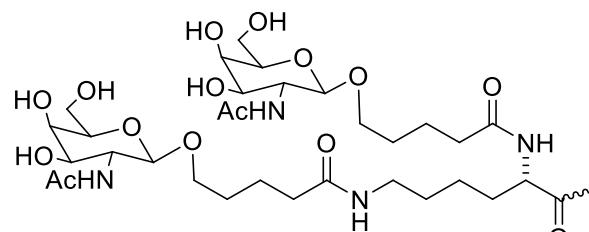


Fórmula VIII,

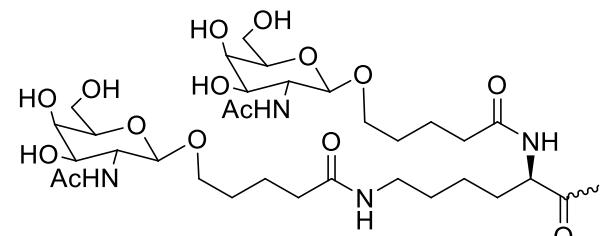




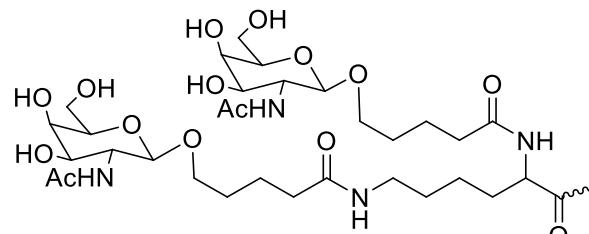
Fórmula XIII,



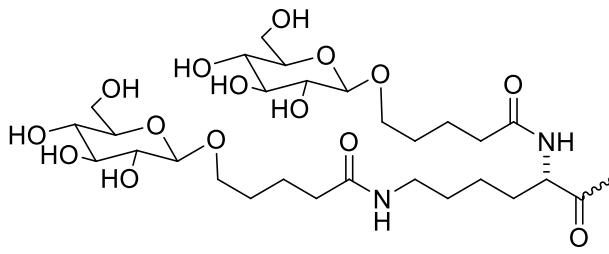
Fórmula XIV,



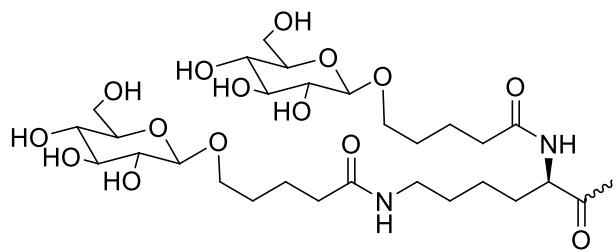
Fórmula XV,



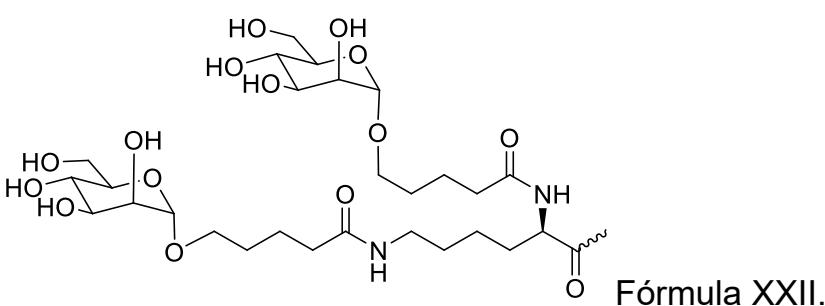
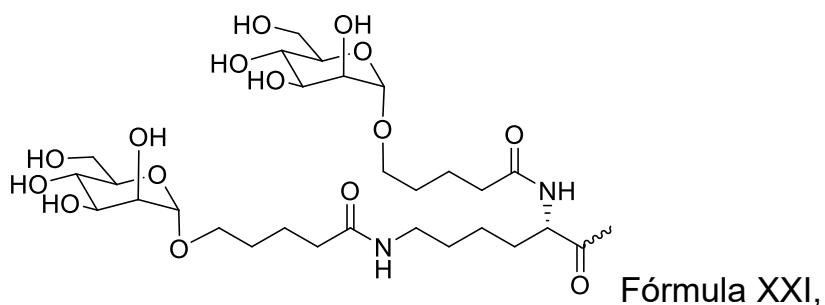
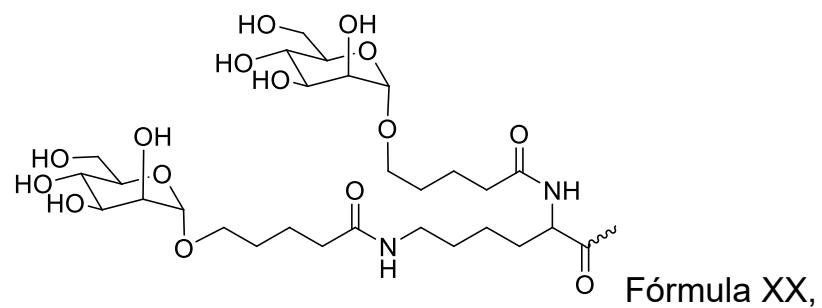
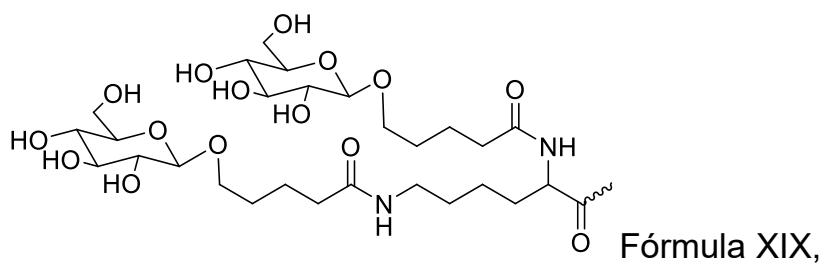
Fórmula XVI,



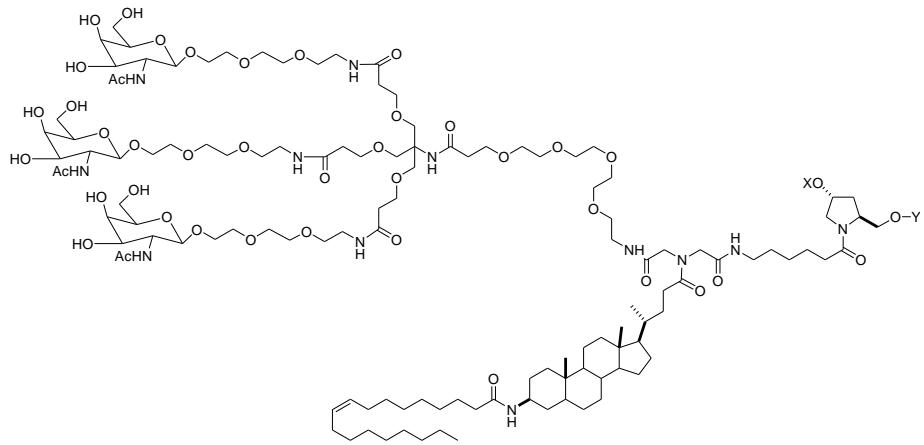
Fórmula XVII,



Fórmula XVIII,



[00365] Outro conjugado de carboidrato representativo para uso nas modalidades descritas aqui inclui, mas não está limitado a,



(Fórmula XXIII), quando um de X e Y é um oligonucleotídeo, o outro é um hidrogênio.

[00366] Em algumas modalidades, o conjugado de carboidrato compreende adicionalmente um ou mais ligandos adicionais como descrito acima, tais como, mas não se limitando a, um modulador PK e/ou um peptídeo de permeação de células.

### ***D. Ligantes***

[00367] Em algumas modalidades, o conjugado ou ligante descrito aqui pode ser anexado a um oligonucleotídeo de iRNA com vários ligantes que podem ser cliváveis ou não cliváveis.

alquinil-heterocicliclalquenila, alquinil-heterocicliclalquinila, alquilarila, alquenilarila, alquinilarila, alquil-heteroarila, alquenil-heteroarila, alquinil-hereroarila, cujos um ou mais metilenos podem estar interrompidos ou terminados por O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sub>8</sub>), C(O), arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heterocíclico substituído ou não substituído; onde R<sub>8</sub> é hidrogênio, acila, alifático ou alifático substituído. Em uma modalidade, o ligante tem entre cerca de 1-24 átomos, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 átomos, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16, ou 8-16 átomos.

[00369] Um grupo de ligação clivável é um que seja suficientemente estável fora da célula, mas que, após entrada em uma célula alvo, seja clivado para liberar as duas partes que o ligante mantém juntas. Em uma modalidade preferencial, o grupo de ligação clivável é clivado pelo menos cerca de 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes ou mais, ou pelo menos cerca de 100 vezes mais rapidamente em uma célula alvo ou sob uma primeira condição de referência (que pode, por exemplo, ser selecionada para mimetizar ou representar condições intracelulares) do que no sangue de um indivíduo, ou sob uma segunda condição de referência (que pode ser, por exemplo, selecionada para mimetizar ou representar condições encontradas no sangue ou soro).

[00370] Grupos de ligação cliváveis são suscetíveis a agentes de clivagem, por exemplo, pH, potencial redox ou a presença de moléculas de degradação. Geralmente, os agentes de clivagem são mais prevalentes ou encontrados a níveis ou atividades mais elevados dentro de células do que no soro ou sangue. Exemplos de tais agentes de degradação incluem: agentes redox que são selecionados para substratos particulares ou que não têm especificidade para substratos, incluindo, por exemplo, enzimas oxidativas ou redutoras ou agentes redutores tais como mercaptanas, presentes em células, que podem

degradar um grupo de ligação clivável por redox por redução; esterases; endossomas ou agentes que podem criar um ambiente ácido, por exemplo, aqueles que resultam em um pH de cinco ou menor; enzimas que podem hidrolisar ou degradar um grupo de ligação clivável por ácido por atuação como um ácido geral, peptidases (que podem ser específicas quanto a substratos), e fosfatases.

[00371] Um grupo de ligação clivável, tal como uma ligação dissulfeto, pode ser suscetível ao pH. O pH do soro humano é 7,4, enquanto o pH intracelular médio é ligeiramente menor, variando de cerca de 7,1-7,3. Os endossomas têm um pH mais ácido, na gama de 5,5-6,0, e os lisossomas têm um pH ainda mais ácido em torno de 5,0. Alguns ligantes terão um grupo de ligação clivável que é clivado a um pH preferencial, liberando desse modo um lípido catiônico do ligante dentro da célula, ou no compartimento desejado da célula.

[00372] Um ligante pode incluir um grupo de ligação clivável que é clivável por uma enzima particular. O tipo de grupo de ligação clivável incorporado em um ligante pode depender da célula alvo. Por exemplo, um ligante se dirigindo ao fígado pode ser ligado a um lípido catiônico através de um ligante que inclui um grupo éster. As células do fígado são ricas em esterase, e, portanto, o ligante será clivado mais eficazmente em células do fígado do que em tipos de células que não são ricas em esterases. Outros tipos de células ricas em esterases incluem células do pulmão, córtex renal, e testículos.

[00373] Ligantes que contêm ligações de peptídeo podem ser usados quando se direcionam tipos de células ricas em peptidases, tais como células do fígado e sinoviócitos.

[00374] Em geral, a adequabilidade de um grupo de ligação clivável candidato pode ser avaliada por teste da capacidade de um agente (ou condição) de degradação para clivar o grupo de ligação candidato. Será também desejável testar o grupo de ligação clivável candidato quanto à

capacidade para resistir à clivagem no sangue ou quando em contato com outro tecido não alvo. Assim é possível determinar a suscetibilidade relativa à clivagem entre uma primeira e uma segunda condição, onde a primeira é selecionada para ser indicativa de clivagem em uma célula alvo e a segunda é selecionada para ser indicativa de clivagem em outros tecidos ou fluidos biológicos, por exemplo, sangue ou soro. As avaliações podem ser levadas a cabo em sistemas isentos de células, em células, em cultura de células, em cultura de órgãos ou tecidos, ou em animais inteiros. Pode ser útil fazer avaliações iniciais em condições isentas de células ou de cultura e confirmar por avaliações adicionais em animais inteiros. Em modalidades preferenciais, compostos candidatos úteis são clivados pelo menos cerca de 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou cerca de 100 vezes mais rapidamente na célula (ou sob condições *in vitro* selecionadas para mimetizarem condições intracelulares) em comparação com sangue ou soro (ou sob condições *in vitro* selecionadas para mimetizarem condições extracelulares).

#### *i. Grupos de ligação cliváveis por redox*

[00375] Em uma modalidade, um grupo de ligação clivável é um grupo de ligação clivável por redox que é clivado após redução ou oxidação. Um exemplo de um grupo de ligação redutoramente clivável é um grupo de ligação dissulfeto (-S-S-). Para determinar se um grupo de ligação clivável candidato é um "grupo de ligação redutoramente clivável" adequado, ou por exemplo é adequado para uso com uma fração de *i*RNA particular e agente de direcionamento particular, é possível considerar métodos descritos aqui. Por exemplo, um candidato pode ser avaliado por incubação com ditiotreitol (DTT), ou outro agente redutor usando reagentes conhecidos na técnica, que mimetizam a taxa de clivagem que seria observada em uma célula, por exemplo, uma célula alvo. Os candidatos podem ser também avaliados sob condições que são selecionadas para mimetizar condições do sangue ou soro. Em

uma, os compostos candidatos são clivados por no máximo cerca de 10% no sangue. Em outras modalidades, os compostos candidatos úteis são degradados pelo menos cerca de 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou cerca de 100 vezes mais rapidamente na célula (ou sob condições *in vitro* selecionadas para mimetizarem condições intracelulares) em comparação com sangue (ou sob condições *in vitro* selecionadas para mimetizarem condições extracelulares). A taxa de clivagem de compostos candidatos pode ser determinada usando ensaios de cinética enzimática padrão sob condições escolhidas para mimetizarem meios intracelulares e comparando com condições escolhidas para mimetizarem meios extracelulares.

***ii. Grupos de ligação cliváveis à base de fosfato***

[00376] Em outra modalidade, um ligante clivável compreende um grupo de ligação clivável à base de fosfato. Um grupo de ligação clivável à base de fosfato é clivado por agentes que degradam ou hidrolisam o grupo fosfato. Um exemplo de um agente que cliva grupos fosfato em células é enzimas tais como fosfatases em células. Exemplos de grupos de ligação à base de fosfato são -O-P(O)(OR<sub>k</sub>)-O-, -O-P(S)(OR<sub>k</sub>)-O-, -O-P(S)(SR<sub>k</sub>)-O-, -S-P(O)(OR<sub>k</sub>)-O-, -O-P(O)(OR<sub>k</sub>)-S-, -S-P(O)(OR<sub>k</sub>)-S-, -O-P(S)(OR<sub>k</sub>)-S-, -S-P(S)(OR<sub>k</sub>)-O-, -O-P(O)(R<sub>k</sub>)-O-, -O-P(S)(R<sub>k</sub>)-O-, -S-P(O)(R<sub>k</sub>)-O-, -S-P(S)(R<sub>k</sub>)-O-, -S-P(O)(R<sub>k</sub>)-S-, -O-P(S)(R<sub>k</sub>)-S-. Modalidades preferenciais são -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-. Uma modalidade preferencial é -O-P(O)(OH)-O-. Estes candidatos podem ser avaliados usando métodos análogos àqueles descritos acima.

***iii. Grupos de ligação cliváveis por ácido***

[00377] Em outra modalidade, um ligador clivável compreende um grupo de ligação clivável por ácido. Um grupo de ligação clivável por

ácido é um grupo de ligação que é clivado sob condições ácidas. Em modalidades preferenciais, grupos de ligação cliváveis por ácido são clivados em um ambiente ácido com um pH de cerca de 6,5 ou menor (por exemplo, cerca de 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0 ou menor), ou por agentes tais como enzimas que podem atuar como um ácido geral. Em uma célula, organelos específicos de pH baixo, tais como endossomas e lisossomas, podem proporcionar um ambiente de clivagem para grupos de ligação cliváveis por ácido. Exemplos de grupos de ligação cliváveis por ácido incluem mas não estão limitados a hidrazonas, ésteres, e ésteres de aminoácidos. Grupos cliváveis por ácido podem ter a fórmula geral  $-C=NN-$ ,  $C(O)O$ , ou  $-OC(O)$ . Uma modalidade preferencial é quando o carbono anexado ao oxigênio do éster (o grupo alcóxi) é um grupo arila, grupo alquila substituído, ou grupo alquila terciário tal como dimetilpentila ou t-butila. Estes candidatos podem ser avaliados usando métodos análogos àqueles descritos acima.

#### ***iv. Grupos de Ligação à Base de Éster***

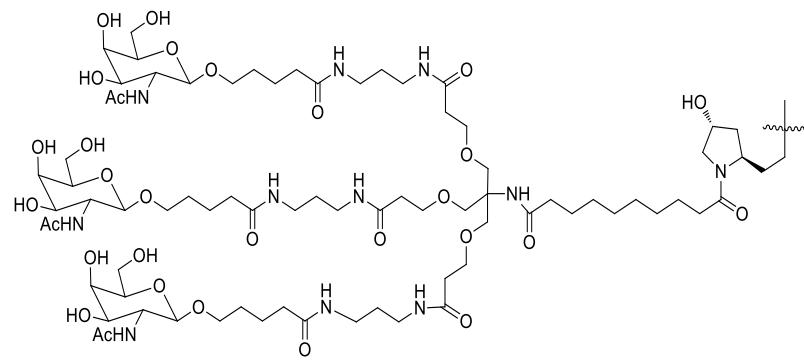
[00378] Em outra modalidade, um ligante clivável compreende um grupo de ligação clivável à base de éster. Um grupo de ligação clivável à base de éster é clivado por enzimas tais como esterases e amidases em células. Exemplos de grupos de ligação cliváveis à base de éster incluem mas não estão limitados a ésteres de grupos alquíleno, alqueníleno e alquiníleno. Grupos de ligação cliváveis com éster têm a fórmula geral  $-C(O)O-$ , ou  $-OC(O)-$ . Estes candidatos podem ser avaliados usando métodos análogos àqueles descritos acima.

#### ***v. Grupos de clivagem à base de peptídeo***

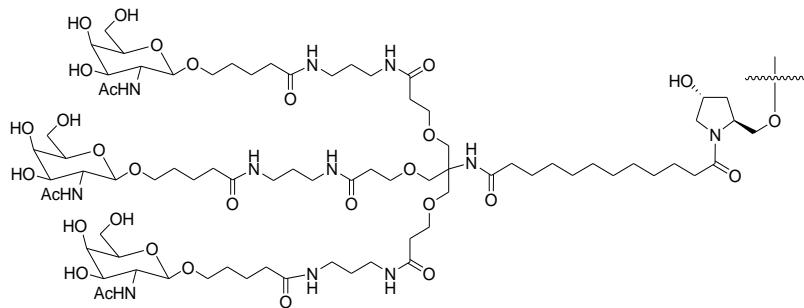
[00379] Ainda em outra modalidade, um ligador clivável compreende um grupo de ligação clivável à base de peptídeo. Um grupo de ligação clivável à base de peptídeo é clivado por enzimas tais como peptidases e proteases em células. Grupos de ligação cliváveis à base de peptídeo são ligações de peptídeo formadas entre aminoácidos para originar

oligopeptídeos (por exemplo, dipeptídeos, tripeptídeos, etc.) e polipeptídeos. Grupos cliváveis à base de peptídeo não incluem o grupo amida (-C(O)NH-). O grupo amida pode ser formado entre qualquer alquíleno, alqueníleno ou alquiníleno. Uma ligação de peptídeo é um tipo especial de ligação amida formada entre aminoácidos para originar peptídeos e proteínas. O grupo de clivagem à base de peptídeo está geralmente limitado à ligação de peptídeo (isto é, a ligação amida) formada entre aminoácidos originando peptídeos e proteínas e não inclui o grupo funcional amida inteiro. Grupos de ligação cliváveis à base de peptídeo têm a fórmula geral – NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, em que RA e RB são os grupos R dos dois aminoácidos adjacentes. Estes candidatos podem ser avaliados usando métodos análogos àqueles descritos acima.

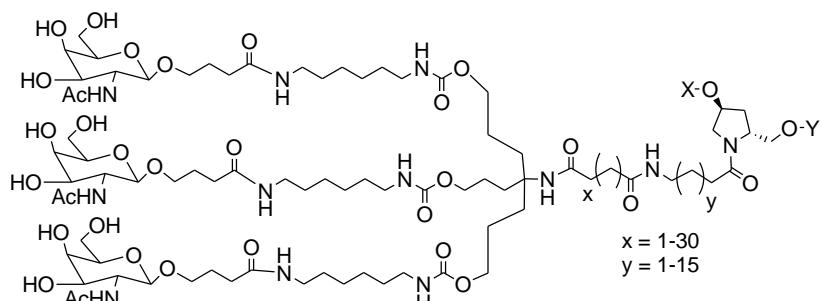
[00380] Em uma modalidade, um iRNA da invenção é conjugado com um carboidrato através de um ligante. Exemplos não limitantes de conjugados de carboidrato de iRNA com ligantes das composições e métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a



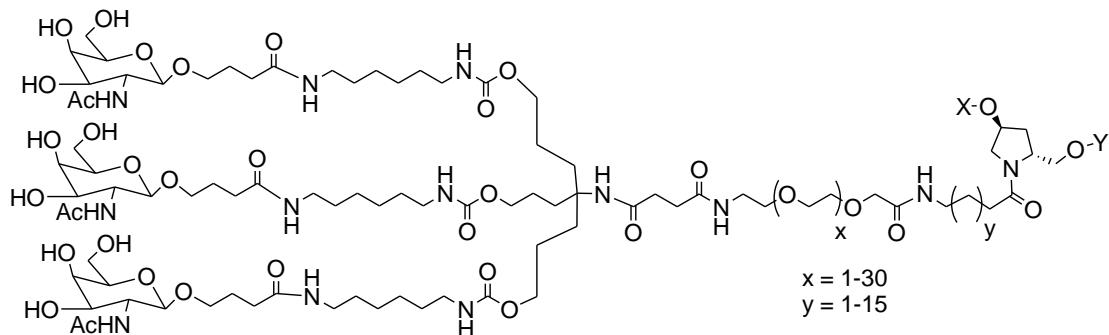
(Fórmula XXIV),



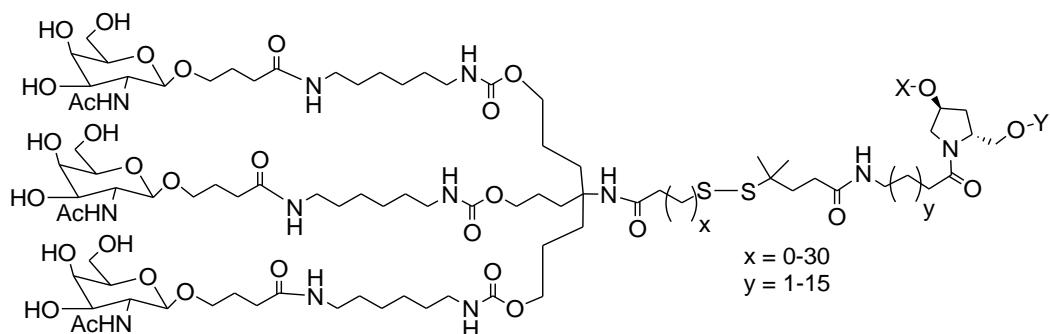
(Fórmula XXV),



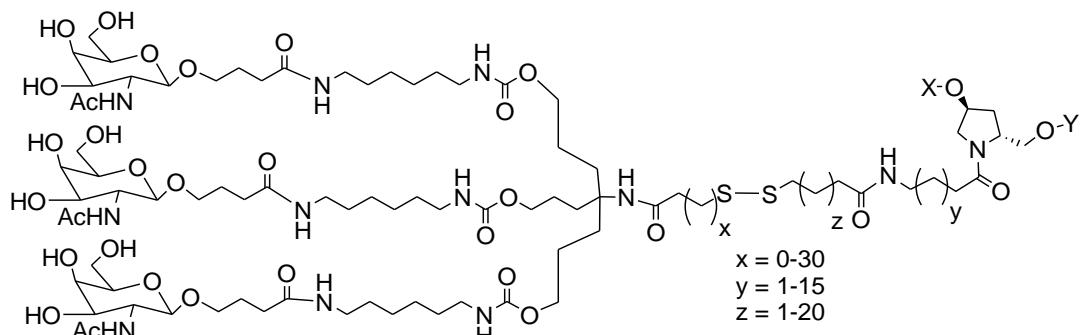
(Fórmula XXVI),



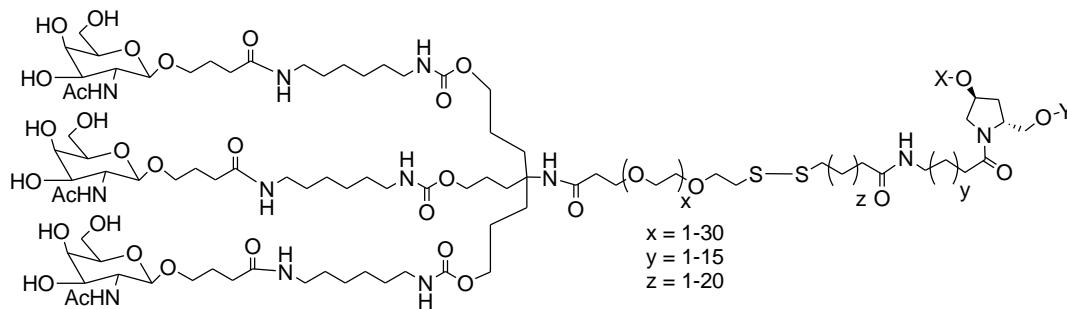
(Fórmula XXVII),



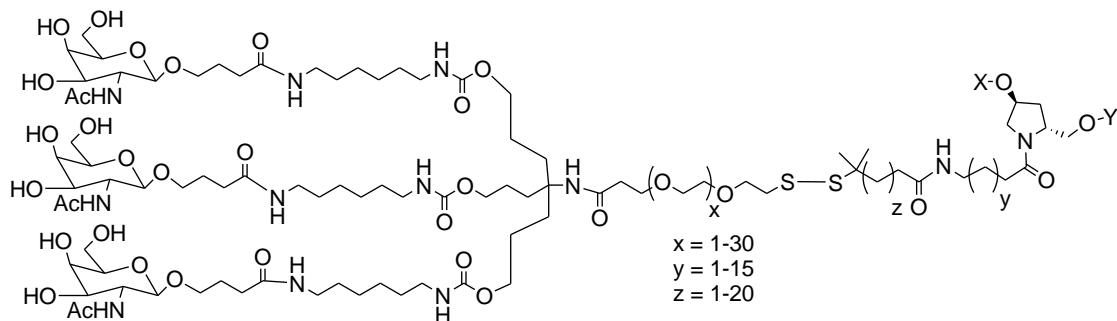
(Fórmula XXVIII),



(Fórmula XXIX),



(Fórmula XXX), e



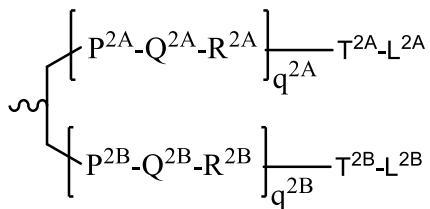
(Fórmula XXXI),

quando um de X ou Y é um oligonucleotídeo, o outro é um hidrogênio.

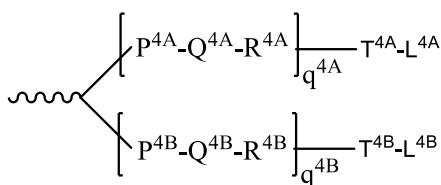
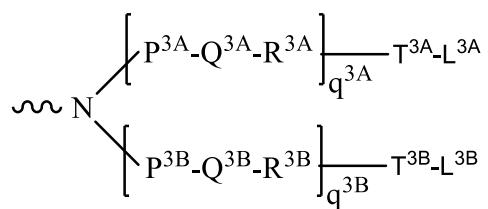
[00381] Em certas modalidades das composições e métodos da invenção, um ligante é um ou mais derivados de "GalNAc" (N-acetilgalactosamina) anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[00382] Em uma modalidade, um dsRNA da invenção é conjugado com um ligante ramificado bivalente ou trivalente selecionado do grupo de estruturas apresentadas em qualquer uma das fórmulas (XXXII) – (XXXV):

Fórmula XXXII



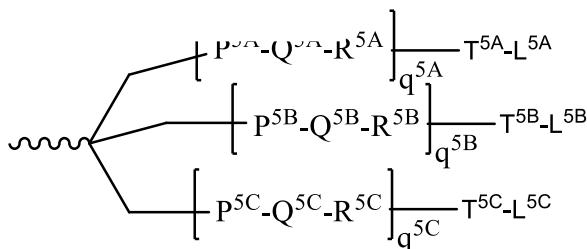
Fórmula XXXIII



Formula (VI)

,

ou



Formula (VII)

;

Fórmula XXXIV

em que:

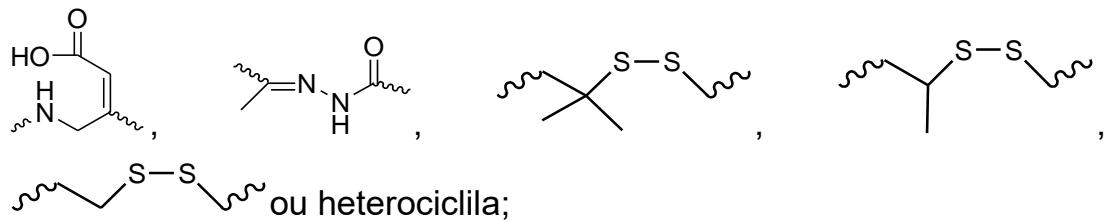
q<sub>2A</sub>, q<sub>2B</sub>, q<sub>3A</sub>, q<sub>3B</sub>, q<sub>4A</sub>, q<sub>4B</sub>, q<sub>5A</sub>, q<sub>5B</sub> e q<sub>5C</sub> representam independentemente para cada ocorrência 0-20 e em que a unidade repetida pode ser a mesma ou diferente;

P<sup>2A</sup>, P<sup>2B</sup>, P<sup>3A</sup>, P<sup>3B</sup>, P<sup>4A</sup>, P<sup>4B</sup>, P<sup>5A</sup>, P<sup>5B</sup>, P<sup>5C</sup>, T<sup>2A</sup>, T<sup>2B</sup>, T<sup>3A</sup>, T<sup>3B</sup>, T<sup>4A</sup>, T<sup>4B</sup>, T<sup>4A</sup>, T<sup>5B</sup>, T<sup>5C</sup> estão cada um independentemente para cada ocorrência ausentes, são CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>NH ou CH<sub>2</sub>O;

Q<sup>2A</sup>, Q<sup>2B</sup>, Q<sup>3A</sup>, Q<sup>3B</sup>, Q<sup>4A</sup>, Q<sup>4B</sup>, Q<sup>5A</sup>, Q<sup>5B</sup>, Q<sup>5C</sup> estão cada um independentemente para cada ocorrência ausentes, são alquíleno, alquíleno substituído em que um ou mais metilenos podem estar interrompidos ou terminados por um ou mais de O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(RN), C(R')=C(R''), C≡C ou C(O);

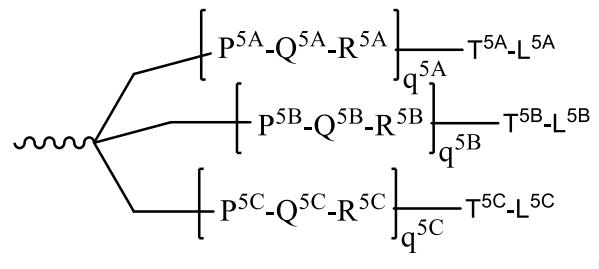
Fórmula XXXV

$R^{2A}$ ,  $R^{2B}$ ,  $R^{3A}$ ,  $R^{3B}$ ,  $R^{4A}$ ,  $R^{4B}$ ,  $R^{5A}$ ,  $R^{5B}$ ,  $R^{5C}$  estão cada um independentemente para cada ocorrência ausentes, são NH, O, S, CH<sub>2</sub>, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R<sup>a</sup>)C(O), -C(O)-CH(R<sup>a</sup>)-NH-, CO, CH=N-O,



$L^{2A}$ ,  $L^{2B}$ ,  $L^{3A}$ ,  $L^{3B}$ ,  $L^{4A}$ ,  $L^{4B}$ ,  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  e  $L^{5C}$  representam o ligante; isto é, cada um independentemente, para cada ocorrência um monossacarídeo (tal como GalNAc), dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeo, ou polissacarídeo; e Ra é H ou cadeia lateral de um aminoácido. Derivados de GalNAc conjugantes trivalentes são particularmente úteis para uso com agentes de RNAi para inibição da expressão de um gene alvo, tal como aquelas da fórmula (XXXV):

Fórmula XXXV



em que  $L^{5A}$ ,  $L^{5B}$  e  $L^{5C}$  representam um monossacarídeo, tal como um derivado de GalNAc.

[00383] Exemplos de derivados de GalNAc conjugantes com grupos ligantes ramificados bivalentes e trivalentes adequados incluem as, mas não estão limitados às, estruturas enumeradas acima como fórmulas II, VII, XI, X, e XIII.

[00384] Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação de conjugados de RNA incluem as, mas não estão limitadas às, Pat. dos E.U.A. N<sup>os</sup>. 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439;

5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203. 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 e 5.688.941; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646; 8.106.022, em que a totalidade do conteúdo de cada uma é desse modo incorporada aqui a título de referência.

[00385] Não é necessário que todas as posições em um dado composto estejam uniformemente modificadas, e, de fato, mais do que uma das modificações acima mencionadas pode ser incorporada em um único composto ou mesmo em um único nucleosídeo dentro de um iRNA. A presente invenção inclui também compostos de iRNA que são compostos quiméricos.

[00386] Compostos de iRNA "quiméricos" ou "quimeras", no contexto desta invenção, são compostos de iRNA, preferencialmente dsRNAs, que contêm duas ou mais regiões quimicamente distintas, cada uma constituída por pelo menos uma unidade monomérica, isto é, um nucleotídeo no caso de um composto de dsRNA. Estes iRNAs contêm tipicamente pelo menos uma região em que o RNA é modificado de modo a conferir ao iRNA resistência aumentada a degradação por nucleases, captação celular aumentada, e/ou afinidade de ligação aumentada para o ácido nucleico alvo. Uma região adicional do iRNA pode servir de substrato para enzimas capazes de clivar híbridos RNA:DNA ou RNA:RNA. A título de exemplo, RNase H é uma endonuclease celular que cliva a fita de RNA de um duplex RNA:DNA. A ativação de RNase H, portanto, resulta em clivagem do alvo de RNA, intensificando desse modo grandemente a eficácia da inibição da

expressão de genes pelo iRNA. Consequentemente podem ser frequentemente obtidos resultados comparáveis com iRNAs mais curtos quando são usados dsRNAs químéricos, em comparação com deóxi dsRNAs de fosforotioato hibridando com a mesma região alvo. A clivagem do alvo de RNA pode ser rotineiramente detetada por eletroforese em gel e, se necessário, técnicas associadas de hibridação de ácidos nucleicos conhecidas na técnica.

[00387] Em certos casos, o RNA de um iRNA pode ser modificado por um grupo não ligante. Um número de moléculas não ligante foi conjugado com iRNAs de modo a intensificar a atividade, distribuição celular ou captação celular do iRNA, e procedimentos para realização de tais conjugações estão disponíveis na literatura científica. Tais frações não ligante têm incluído frações de lípidos, tais como colesterol (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), um tioéter, por exemplo, hexil-S-tritítiol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), um tiocolsterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), uma cadeia alifática, por exemplo, dodecandiol ou resíduos undecila (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), um fosfolípido, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamônio (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), uma poliamina ou uma cadeia de polietileno glicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), ou adamantano de ácido acético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), uma fração palmitila (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), ou uma fração octadecilamina ou hexilamino-

carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Patentes dos Estados Unidos representativas que ensinam a preparação de tais conjugados de RNA foram listadas acima. Protocolos de conjugação típicos envolvem a síntese de um RNA transportando um ligante amino em uma ou mais posições da sequência. O grupo amino é depois reagido com a molécula sendo conjugada usando reagentes apropriados de acoplamento ou ativação. A reação de conjugação pode ser realizada com o RNA ainda ligado ao suporte sólido ou após clivagem do RNA, em fase de solução. A purificação do conjugado de RNA por HPLC origina tipicamente o conjugado puro.

#### **V. Distribuição de um RNAi da Invenção**

[00388] A administração de um RNAi da invenção a uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um indivíduo humano (por exemplo, um indivíduo com sua necessidade, tal como um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento como descrito aqui) pode ser alcançada em um número de maneiras diferentes. Por exemplo, a administração pode ser realizada por contato de uma célula com um iRNA da invenção *in vitro* ou *in vivo*. A administração *in vivo* pode ser também realizada diretamente por administração de uma composição compreendendo um iRNA, por exemplo, um dsRNA, a um indivíduo. Alternativamente, a administração *in vivo* pode ser realizada indiretamente por administração de um ou mais vetores que codificam e dirigem a expressão do iRNA. Estas alternativas são adicionalmente discutidas em baixo.

[00389] Em geral, qualquer método de administração de uma molécula de ácido nucleico (*in vitro* ou *in vivo*) pode ser adaptado para uso com um iRNA da invenção (ver, por exemplo, Akhtar S. e Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 e WO94/02595, que são incorporados aqui por referência nas suas totalidades). Para

administração *in vivo*, fatores a ter em consideração para administrar uma molécula de iRNA incluem, por exemplo, estabilidade biológica da molécula administrada, prevenção de efeitos inespecíficos, e acúmulo da molécula administrada no tecido alvo. Os efeitos inespecíficos de um iRNA podem ser minimizados por administração local, por exemplo, por injeção ou implantação direta em um tecido ou administração tópica da preparação. A administração local a um local de tratamento maximiza a concentração local do agente, limita a exposição do agente a tecidos sistêmicos que podem de outro modo ser danificados pelo agente ou que podem degradar o agente, e permite uma dose total mais baixa da molécula de iRNA a ser administrada. Vários estudos mostraram o silenciamento bem-sucedido de produtos de gene quando um iRNA é administrado localmente. Por exemplo, a administração intraocular de um dsRNA de VEGF por injeção intravítreia em macacos cinomolgos (Tolentino, MJ., *et al* (2004) *Retina* 24:132-138) e injeções subretinais em camundongos (Reich, SJ., *et al* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) mostraram ambas prevenir a neovascularização em um modelo experimental de degeneração macular relacionada com a idade. Adicionalmente, a injeção intratumoral direta de um dsRNA em camundongos reduz o volume tumoral (Pille, J., *et al* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) e pode prolongar a sobrevivência de camundongos com tumores (Kim, WJ., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., *et al* (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). A interferência de RNA também revelou êxito com administração local no SNC por injeção direta (Dorn, G., *et al.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al.* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akane, Y., *et al.* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) e aos pulmões por administração intranasal (Howard, KA., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., *et al* (2004)

*J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., et al (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Para administração de um iRNA sistematicamente para o tratamento de uma doença, o RNA pode ser modificado ou alternativamente administrado usando um sistema de administração de fármacos; ambos os métodos atuam para prevenir a degradação rápida do dsRNA por endo- e exonucleases *in vivo*. A modificação do RNA ou do transportador farmacêutico pode também permitir o direcionamento da composição de iRNA para o tecido alvo e evitar efeitos fora do alvo indesejáveis. As moléculas de iRNA podem ser modificadas por conjugação química com grupos lipofílicos tais como colesterol para intensificar a captação celular e prevenir a degradação. Por exemplo, um iRNA dirigido contra ApoB conjugado com uma fração de colesterol lipofílica foi injetado sistematicamente em camundongos e resultou em silenciamento de mRNA de apoB no fígado e jejuno (Soutschek, J. et al., (2004) *Nature* 432:173-178). Foi mostrado que a conjugação de um iRNA com um aptâmero inibe o crescimento tumoral e medeia a regressão tumoral em um modelo de camundongo de câncer da próstata (McNamara, JO., et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). Em uma modalidade alternativa, o iRNA pode ser administrado usando sistemas de administração de fármacos tais como uma nanopartícula, um dendrímero, um polímero, lipossomas, ou um sistema de administração catiônico. Sistemas de administração catiônicos positivamente carregados facilitam a ligação de uma molécula de iRNA (negativamente carregada) e intensificam também interações na membrana celular negativamente carregada para permitir captação eficaz de um iRNA pela célula. Lípidos catiônicos, dendrímeros, ou polímeros podem ser ligados a um iRNA, ou induzidos para formar uma vesícula ou micélio (ver, por exemplo, Kim SH., et al. (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116) que encerra um iRNA. A formação de vesículas ou micélios previne adicionalmente a degradação do iRNA

quando administrado sistemicamente. Métodos para preparação e administração de complexos de RNAi catiônicos estão bem dentro das capacidades de um perito na técnica (ver, por exemplo, Sorensen, DR., et al (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN., et al (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al. (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, que são incorporados aqui por referência na sua totalidade). Alguns exemplos não limitantes de sistemas de administração de fármacos úteis para administração sistêmica de iRNAs incluem DOTAP (Sorensen, DR., et al. (2003), supra; Verma, UN., et al. (2003), supra), Oligofectamina, "partículas de lípido de ácido nucleico sólidas" (Zimmermann, TS., et al. (2006) *Nature* 441:111-114), cardiolipina (Chien, PY., et al. (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., et al. (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), polietilenoimina (Bonnet ME., et al. (2008) *Pharm. Res.* 16 agosto Epub antes da impressão; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), peptídeos de Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), e poliamidoaminas (Tomalia, DA., et al (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., et al. (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). Em algumas modalidades, um iRNA forma um complexo com ciclodextrina para administração sistêmica. Métodos para administração e composições farmacêuticas de iRNAs e ciclodextrinas podem ser encontrados na Patente dos E.U.A. Nº. 7,427,605, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

#### **A. iRNAs da Invenção codificados por Vetores**

[00390] O RNAi se dirigindo a um gene a CFB, C3, ou C9 pode ser expresso a partir de unidades de transcrição inseridas em vetores de DNA ou RNA (ver, por exemplo, Couture, A, et al., *TIG*. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., Publicação PCT Internacional Nº. WO 00/22113, Conrad, Publicação PCT Internacional No. WO 00/22114, e Conrad, Pat. dos E.U.A. Nº. 6,054,299). A expressão pode ser transiente (da ordem de horas a semanas) ou sustentada (semanas a meses ou mais),

dependendo do constructo específico usado e do tipo de tecido ou célula alvo. Estes transgenes podem ser introduzidos como um constructo linear, um plasmídeo circular, ou um vetor viral, que pode ser um vetor integrante ou não integrante. O transgene pode ser também construído para permitir que seja herdado como um plasmídeo extracromossômico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

[00391] A fita individual ou fitas de um iRNA podem ser transcritas a partir de um promotor em um vetor de expressão. Onde duas fitas separadas são para serem expressas para gerar, por exemplo, um dsRNA, dois vetores de expressão separados podem ser cointroduzidos (por exemplo, por transfecção ou infecção) em uma célula alvo. Alternativamente, cada fita individual de um dsRNA pode ser transcrita por promotores, ambos os quais estão localizados no mesmo plasmídeo de expressão. Em uma modalidade, um dsRNA é expresso como polinucleotídeos com repetições invertidas ligados por uma sequência de polinucleotídeos ligante tal que o dsRNA tenha uma estrutura de haste e alça.

[00392] Vetores de expressão de iRNA são geralmente plasmídeos de DNA ou vetores virais. Vetores de expressão compatíveis com células eucarióticas, preferencialmente aqueles compatíveis com células de vertebrado, podem ser usados para produzir constructos recombinantes para a expressão de um iRNA como descrito aqui. Vetores de expressão de células eucarióticas são bem conhecidos na técnica e estão disponíveis de um número de fontes comerciais. Tipicamente, tais vetores são proporcionados contendo locais de restrição convenientes para inserção do segmento de ácido nucleico desejado. A administração de vetores expressando iRNA pode ser sistêmica, tal como por administração intravenosa ou intramuscular, por administração a células alvo explantadas do paciente seguida de reintrodução no paciente, ou por qualquer outro meio que permita

introdução em uma célula alvo desejada.

[00393] Plasmídeos de expressão de iRNA podem ser transfetados em células alvo como um complexo com transportadores de lípidos catiônicos (por exemplo, Oligofectamina) ou transportadores à base de lípidos não catiônicos (por exemplo, Transit-TKOTM). Múltiplas transfecções de lípidos para silenciamentos mediados por iRNA se dirigindo a diferentes regiões de um RNA alvo ao longo de um período de uma semana ou mais estão também contempladas pela invenção. A introdução bem-sucedida de vetores em células hospedeiras pode ser monitorizada usando vários métodos conhecidos. Por exemplo, a transfecção transiente pode ser sinalizada com um repórter, tal como um marcador fluorescente, tal como Proteína Verde Fluorescente (GFP). A transfecção estável de células ex vivo pode ser assegurada usando marcadores que proporcionam à célula transfetada resistência a fatores ambientais específicos (por exemplo, antibióticos e fármacos), tais como resistência a higromicina B.

[00394] Sistemas de vetores virais que podem ser utilizados com os métodos e composições descritos aqui incluem, mas não estão limitados a, (a) vetores de adenovírus; (b) vetores de retrovírus, incluindo mas não se limitando a vetores lentivirais, vírus da leucemia murina de Moloney, etc.; (c) vetores de vírus adeno-associados; (d) vetores de vírus herpes simplex; (e) vetores de SV 40; (f) vetores de vírus do polioma; (g) vetores de vírus do papiloma; (h) vetores de picornavírus; (i) vetores de vírus da varíola tais como um como ortopox, por exemplo, vetores de vírus vacínia ou avipox, por exemplo, varíola dos canários ou varíola das aves domésticas; e (j) um adenovírus dependente de auxiliares ou gutless. Vírus deficientes quanto à replicação podem ser também vantajosos. Diferentes vetores serão ou não incorporados no genoma das células. Os constructos podem incluir sequências virais para transfecção, se desejado. Alternativamente, o

constructo pode ser incorporado em vetores capazes de replicação epissomal, por exemplo, vetores de EPV e EBV. Constructos para a expressão recombinante de um iRNA irão geralmente requerer elementos reguladores, por exemplo, promotores, intensificadores, etc., para assegurar a expressão do iRNA em células alvo. Outros aspetos a ter em consideração para vetores e constructos são adicionalmente descritos em baixo.

[00395] Vetores úteis para a administração de um iRNA incluirão elementos reguladores (promotor, intensificador, etc.) suficientes para expressão do iRNA na célula ou tecido alvo desejado. Os elementos reguladores podem ser escolhidos para proporcionarem expressão constitutiva ou regulada/induzível.

[00396] A expressão do iRNA pode ser precisamente regulada, por exemplo, por uso de uma sequência reguladora induzível que é sensível a certos reguladores fisiológicos, por exemplo, níveis de glucose em circulação, ou hormônios (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Tais sistemas de expressão induzível, adequados para o controle da expressão de dsRNA em células ou em mamíferos incluem, por exemplo, regulação por ecdisona, por estrogênio, progesterona, tetraciclina, indutores químicos da dimerização, e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Uma pessoa perita na técnica seria capaz de escolher a sequência reguladora/promotora apropriada com base no uso pretendido do transgene de iRNA.

[00397] Podem ser usados vetores virais que contêm sequências de ácidos nucleicos codificando um iRNA. Por exemplo pode ser usado um vetor retroviral (ver Miller et al., Meth. *Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Estes vetores retrovirais contêm os componentes necessários para o empacotamento correto do genoma viral e integração no DNA da célula hospedeira. As sequências de ácidos nucleicos codificando um iRNA são clonadas em um ou mais vetores, o que facilita a administração do

ácido nucleico em um paciente. Mais detalhes sobre vetores retrovirais podem ser encontrados, por exemplo, em Boesen et al., *Biotherapy* 6:291-302 (1994), que descreve o uso de um vetor retroviral para administrar o gene mdr1 a células-tronco hematopoiéticas de modo a tornar as células-tronco mais resistentes a quimioterapia. Outras referências ilustrando o uso de vetores retrovirais em terapia de genes são: Clowes et al., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem et al., *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons e Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); e Grossman e Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Vetores lentivirais contemplados para uso incluem, por exemplo, os vetores baseados em HIV descritos nas Patentes dos E.U.A. N°s. 6.143.520; 5.665.557; e 5.981.276, que são aqui incorporadas por referência.

[00398] Adenovírus são também contemplados para uso na administração de iRNAs da invenção. Adenovírus são veículos especialmente atrativos, por exemplo, para administração de genes a epitélios respiratórios. Os adenovírus infetam naturalmente epitélios respiratórios onde causam uma doença ligeira. Outros alvos de sistemas de administração baseados em adenovírus são fígado, o sistema nervoso central, células endoteliais, e músculo. Os adenovírus têm a vantagem de serem capazes de infetar células não em divisão. Kozarsky e Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) apresentam uma revisão de terapia de genes baseada em adenovírus. Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demonstraram o uso de vetores de adenovírus para transferir genes para os epitélios respiratórios de macacos rhesus. Outros casos de uso de adenovírus em terapia de genes podem ser encontrados em Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); Publicação PCT WO94/12649; e Wang, et al., *Gene Therapy* 2:775-783

(1995). Um vetor AV adequado para expressão de um iRNA apresentado na invenção, um método para construção do vetor AV recombinante, e um método para administração do vetor a células alvo, são descritos em Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

[00399] Vetores de vírus adeno-associados (AAV) podem ser também usados para administrar um RNAi da invenção (Walsh et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300 (1993); Patente U.S. Nº. 5,436,146). Em uma modalidade, o iRNA pode ser expresso como duas moléculas de RNA de fita única complementares, separadas a partir de um vetor AAV recombinante tendo, por exemplo, o promotor de RNA U6 ou H1, ou o promotor do citomegalovírus (CMV). Vetores AAV adequados para expressão do dsRNA apresentado na invenção, métodos para construção do vetor AV recombinante, e métodos para administração dos vetores a células alvo são descritos em Samulski R et al. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; Pat. dos E.U.A. Nº. 5.252.479; Pat. dos E.U.A. Nº. 5.139.941; Pedido de Patente Internacional Nº. WO 94/13788; e Pedido de Patente Internacional Nº. WO 93/24641, as divulgações inteiras dos quais são aqui incorporadas por referência.

[00400] Outro vetor viral adequado para administração de um iRNA da invenção é um vírus da varíola tal como um vírus vacínia, por exemplo uma vacínia atenuada tal como Vírus Ancara Modificado (MVA) ou NYVAC, um avipox tal como varíola das aves domésticas ou varíola dos canários.

[00401] O tropismo dos vetores virais pode ser modificado por pseudotipagem dos vetores com proteínas do envelope ou outros抗ígenos de superfície de outros vírus, ou por substituição de diferentes proteínas da cápside viral, como apropriado. Por exemplo, os vetores lentivirais podem ser pseudotipados com proteínas de superfície

do vírus da estomatite vesicular (VSV), raiva, Ébola, Mokola, e similares. Os vetores AAV podem ser fabricados para se dirigem a diferentes células por manipulação dos vetores para expressarem diferentes serótipos de proteínas da cápside; ver, por exemplo, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801, a divulgação inteira do qual é aqui incorporado por referência.

[00402] A preparação farmacêutica de um vetor pode incluir o vetor em um diluente aceitável, ou pode incluir uma matriz de liberação lenta na qual o veículo de administração de genes está embebido. Alternativamente, onde o vetor completo de administração de genes puder ser produzido intacto a partir de células recombinantes, por exemplo, vetores retrovirais, a preparação farmacêutica pode incluir uma ou mais células que produzem o sistema de administração de genes.

## **VI. Composições Farmacêuticas da Invenção**

[00403] A presente invenção inclui também composições e formulações farmacêuticas que incluem os iRNAs da invenção. Em uma modalidade são proporcionadas aqui composições farmacêuticas contendo um iRNA, como descrito aqui, e um transportador farmaceuticamente aceitável. As composições farmacêuticas contendo o RNAi são úteis para tratamento de uma doença ou distúrbio associado à expressão ou atividade de um gene CFB, C3 e/ou C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento como descrito aqui. Tais composições farmacêuticas são formuladas com base no modo de administração. Um exemplo é composições que são formuladas para administração sistêmica através de administração parenteral, por exemplo, por administração subcutânea (SC) ou intravenosa (IV). Outro exemplo é composições que são formuladas para administração direta no parênquima do cérebro, por exemplo, por infusão no cérebro, tal como por infusão contínua com bomba. As

composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas em dosagens suficientes para inibir a expressão do gene alvo. Em geral, uma dose adequada de um iRNA da invenção estará na gama de cerca de 0,001 a cerca de 200,0 miligramas por quilograma de peso corporal do receptor por dia, geralmente na gama de cerca de 1 a 50 mg por quilograma de peso corporal por dia. Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado a cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 10 mg/kg, cerca de 20 mg/kg, cerca de 30 mg/kg, cerca de 40 mg/kg, ou cerca de 50 mg/kg por dose única.

[00404] Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, ou cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00405] Em outra modalidade, o dsRNA é administrado a uma dose de cerca de 0,1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 50

mg/kg, cerca de 35 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 45 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 30

mg/kg, cerca de 5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 20 mg/kg, ou cerca de 15 a cerca de 20 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00406] Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, ou cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00407] Em outra modalidade, o dsRNA é administrado a uma dose de cerca de 0,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 5 a cerca

de 50 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 45 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 45 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 30

mg/kg, cerca de 4 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 20 mg/kg, ou cerca de 15 a cerca de 20 mg/kg. Em uma modalidade, o dsRNA é administrado a uma dose de cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00408] Por exemplo, pode ser administrada aos indivíduos, por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente, uma quantidade terapêutica única de RNAi, tal como cerca de 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou cerca de 50

mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00409] Em algumas modalidades, pode ser administrada aos indivíduos, por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente, múltiplas doses de uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como uma dose de cerca de 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou cerca de 50 mg/kg. Um regime multidoses pode incluir administração de uma quantidade terapêutica de iRNA diariamente, tal como durante dois dias, três dias, quatro dias, cinco dias, seis dias, sete dias, ou mais.

[00410] Em outras modalidades, pode ser administrada aos indivíduos, por exemplo, subcutaneamente ou intravenosamente, uma dose repetida de uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como uma dose de cerca de 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6,

5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou cerca de 50 mg/kg. Um regime de dose repetida pode incluir administração de uma quantidade terapêutica de iRNA em uma base regular, tal como a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, a cada cinco dias, duas vezes por semana, uma vez por semana, a cada dois meses, ou uma vez por mês.

[00411] A composição farmacêutica pode ser administrada por infusão intravenosa ao longo de um período de tempo, tal como ao longo de um período de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, e 21, 22, 23, 24, ou cerca de 25 minutos. A administração pode ser repetida, por exemplo, em uma base regular, tal como bissemanalmente (isto é, a cada duas semanas) durante um mês, dois meses, três meses, quatro meses ou mais. Após um regime de tratamento inicial, os tratamentos podem ser administrados em uma base menos frequente. Por exemplo, após administração semanal ou bissemanal durante três meses, a administração pode ser repetida uma vez por mês, durante seis meses ou um ano ou mais.

[00412] A composição farmacêutica pode ser administrada uma vez diariamente, ou o iRNA pode ser administrado como duas, três, ou mais subdoses em intervalos apropriados ao longo do dia ou mesmo usando infusão ou administração contínua através de uma formulação de liberação controlada. Em esse caso, o iRNA contido em cada subdose tem de ser correspondentemente menor de modo a alcançar a dosagem diária total. A unidade de dosagem pode ser também composta para administração ao longo de vários dias, por exemplo, usando uma

formulação convencional de liberação sustentada que proporciona liberação sustentada do iRNA ao longo de um período de vários dias. Formulações de liberação sustentada são bem conhecidas na técnica e são particularmente úteis para administração de agentes a um local particular, tal como poderia ser usado com os agentes da presente invenção. Em esta modalidade, a unidade de dosagem contém um múltiplo correspondente da dose diária.

[00413] Em outras modalidades, uma dose única das composições farmacêuticas pode ser duradoura, tal que doses subsequentes sejam administradas em intervalos de não mais do que 3, 4, ou 5 dias, ou em intervalos de não mais do que 1, 2, 3, ou 4 semanas. Em algumas modalidades da invenção, uma dose única das composições farmacêuticas da invenção é administrada uma vez por semana. Em outras modalidades da invenção, uma dose única das composições farmacêuticas da invenção é administrada bimensalmente.

[00414] O especialista perito apreciará que certos fatores podem influenciar a dosagem e calendarização requeridas para tratar eficazmente um indivíduo, incluindo a mas não se limitando à gravidade da doença ou distúrbio, tratamentos prévios, o estado geral de saúde e/ou idade do indivíduo, e outras doenças presentes. Além disso, o tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição pode incluir um único tratamento ou uma série de tratamentos. Podem ser feitas estimativas de dosagens eficazes e meias-vidas in vivo para os iRNAs individuais englobados pela invenção usando metodologias convencionais ou com base em testes in vivo usando um modelo animal apropriado, como descrito em outro lugar aqui.

[00415] Os progressos em genética de camundongos geraram um número de modelos de camundongo para o estudo de várias doenças humanas, tais como um distúrbio que beneficiaria de redução da

expressão de CFB, C3 ou C9. Tais modelos podem ser usados para teste in vivo de iRNA, bem como para determinação de uma dose terapeuticamente eficaz. Modelos de camundongo adequados são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, modelo de camundongo da artrite induzida por colagênio (Courtenay, J.S., et al. (1980) *Nature* 283, 666–668), isquemia do miocárdio (Homeister JW e Lucchesi BR (1994) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:17–40), modelos de camundongo de asma induzida por ovalbumina (e.g., Tomkinson A., et al. (2001). *J. Immunol.* 166, 5792–5800), modelos de camundongo de (NZB×NZW)F1, MRL/Faslpr (MRL/lpr) e BXSB (Theofilopoulos, A. N. e Kono, D. H. 1999. Murine lupus models: gene-specific and genome-wide studies. Em Lahita R. G., ed., *Systemic Lupus Erythematosus*, 3<sup>a</sup> ed, p. 145. Academic Press, San Diego, CA), modelo de aHUS de camundongo (Goicoechea de Jorge et al. (2011) The development of atypical hemolytic uremic syndrome depends on complement C5, *J Am Soc Nephrol* 22:137-145).

[00416] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas de um número de maneiras dependendo de se é desejado tratamento local ou sistêmico e da área a ser tratada. A administração pode ser tópica (por exemplo, por um penso transdérmico), pulmonar, por exemplo, por inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica e transdérmica, oral ou parenteral. A administração parenteral inclui injeção ou infusão intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular; subdérmica, por exemplo, através de um dispositivo implantado; ou intracraniana, por exemplo, por administração intraparenquimal, intratecal ou intraventricular.

[00417] O iRNA pode ser administrado de um modo para se dirigir a um tecido particular, tal como o fígado (por exemplo, os hepatócitos do fígado).

[00418] Composições e formulações farmacêuticas para administração tópica podem incluir pensos transdérmicos, pomadas, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, pulverizações, líquidos e pós. Transportadores farmacêuticos convencionais, bases aquosas, em pó ou oleosas, espessantes e similares podem ser necessários ou desejáveis. Preservativos revestidos, luvas e similares podem ser também úteis. Formulações tópicas adequadas incluem aquelas nas quais os iRNAs apresentados na invenção estão em mistura com um agente de administração tópica tal como lípidos, lipossomas, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, esteroides, agentes quelantes e tensoativos. Lípidos e lipossomas adequados incluem neutros (por exemplo, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, diestearolifosfatidil colina), negativos (por exemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) e catiônicos (por exemplo, dioleoltetrametilaminopropil DOTAP e dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). Os iRNAs apresentados na invenção podem ser encapsulados dentro de lipossomas ou podem formar complexos com os mesmos, em particular com lipossomas catiônicos. Alternativamente, os iRNAs podem ser complexados com lípidos, em particular com lípidos catiônicos. Ácidos graxos e ésteres adequados incluem mas não estão limitados a ácido araquidônico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido laurílico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerila, 1-dodecilazaciclo-heptan-2-ona, uma acilcarnitina, uma acilcolina, ou um éster de alquila C<sub>1-20</sub> (por exemplo, miristato de isopropila IPM), monoglicerídeo, diglicerídeo ou seu sal farmaceuticamente aceitável. Formulações tópicas são descritas em detalhe na Patente dos E.U.A. Nº 6.747.014, que é incorporada aqui por referência.

***i.A. Formulações de iRNA Compreendendo Montagens Moleculares***

### ***Membranosas***

[00419] Um iRNA para uso nas composições e métodos da invenção pode ser formulado para administração em uma montagem molecular membranosa, por exemplo, um lipossoma ou um micélio. Como usado aqui, o termo "lipossoma" se refere a uma vesícula composta por lípidos anfifílicos dispostos em pelo menos uma bicamada, por exemplo, uma bicamada ou uma pluralidade de bicamadas. Os lipossomas incluem vesículas unilamelares e multilamelares que têm uma membrana formada de um material lipofílico e um interior aquoso. A porção aquosa contém a composição de iRNA. O material lipofílico isola o interior aquoso de um exterior aquoso, que tipicamente não inclui a composição de iRNA, embora, em alguns exemplos, o possa. Os lipossomas são úteis para a transferência e administração de ingredientes ativos ao local de ação. Uma vez que a membrana lipossomal é estruturalmente similar a membranas biológicas, quando lipossomas são aplicados em um tecido, a bicamada lipossomal é fundida à bicamada das membranas celulares. À medida que a fusão do lipossoma e célula progride, os conteúdos aquosos internos que incluem o iRNA são administrados à célula onde o iRNA pode se ligar especificamente a um RNA alvo e pode mediar RNAi. Em alguns casos, os lipossomas são também especificamente direcionados, por exemplo, para dirigir o iRNA para tipos de células particulares.

[00420] Um lipossoma contendo um agente de RNAi pode ser preparado por uma variedade de métodos. Em um exemplo, o componente de lípido de um lipossoma é dissolvido em um detergente tal que sejam formados micélios com o componente de lípido. Por exemplo, o componente de lípido pode ser um lípido ou conjugado de lípido catiônico anfipático. O detergente pode ter uma elevada concentração crítica de micélios e pode ser não iônico. Detergentes exemplares incluem colato, CHAPS, octilglucosídeo, desoxicolato, e

lauroíl sarcosina. A preparação do agente de RNAi é depois adicionada aos micélios que incluem o componente de lípido. Os grupos catiônicos no lípido interagem com o agente de RNAi e condensam em torno do agente de RNAi para formar um lipossoma. Após condensação, o detergente é removido, por exemplo, por diálise, para originar a uma preparação lipossomal de agente de RNAi.

[00421] Se necessário, um composto transportador que auxilia a condensação pode ser adicionado durante a reação de condensação, por exemplo, por adição controlada. Por exemplo, o composto transportador pode ser um polímero sem ser um ácido nucleico (por exemplo, espermina ou espermidina). O pH pode ser também ajustado para favorecer a condensação.

[00422] Métodos para produção de veículos de administração de polinucleotídeos estáveis, que incorporam um complexo polinucleotídeo/lípido catiônico como componentes estruturais do veículo de administração, são adicionalmente descritos em, por exemplo, WO 96/37194, os conteúdos inteiros da qual são incorporados aqui por referência. A formação de lipossomas pode também incluir um ou mais aspectos de exemplos de métodos descritos em Felgner, P. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987; Patente dos E.U.A. Nº. 4.897.355; Pat. dos E.U.A. Nº. 5.171.678; Bangham, *et al.* *M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194, 1978; Mayhew, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; e Fukunaga, *et al.* *Endocrinol.* 115:757, 1984. Técnicas habitualmente usadas para preparação de agregados de lípidos de tamanho apropriado para uso como veículos de administração incluem sonicação e congelação-descongelação mais extrusão (ver, por exemplo, Mayer, *et al.* *Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986). Pode ser usada microfluidização quando forem

desejados agregados consistentemente pequenos (50 a 200 nm) e relativamente uniformes Mayhew, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984). Estes métodos são facilmente adaptados ao empacotamento de preparações de agente de RNAi em lipossomas.

[00423] Os lipossomas são classificados em duas amplas classes. Lipossomas catiônicos são lipossomas positivamente carregados que interagem com as moléculas de ácidos nucleicos negativamente carregadas para formar um complexo estável. O complexo ácido nucleico/lipossoma positivamente carregado se liga à superfície celular negativamente carregada e é internalizado em um endossoma. Devido ao pH ácido dentro do endossoma, os lipossomas sofrem rutura, liberando seus conteúdos no citoplasma da célula (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

[00424] Os lipossomas que são sensíveis ao pH ou negativamente carregados aprisionam ácidos nucleicos em vez de se complexarem com ele. Uma vez que tanto o ácido nucleico como o lípido estão similarmente carregados ocorre repulsão em vez de formação de complexo. Ainda assim, algum ácido nucleico fica aprisionado dentro do interior aquoso destes lipossomas. Lipossomas sensíveis ao pH têm sido usados para administrar ácidos nucleicos codificando o gene da timidina cinase a monocamadas de células em cultura. A expressão do gene exógeno foi detetada nas células alvo (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

[00425] Um grande tipo de composição lipossomal inclui fosfolípidos sem ser fosfatidilcolina naturalmente derivada. Composições de lipossomas neutras, por exemplo, podem ser formadas a partir de dimiristoíl fosfatidilcolina (DMPC) ou dipalmitoíl fosfatidilcolina (DPPC). Composições de lipossomas aniônicas são geralmente formadas a partir de dimiristoíl fosfatidilglicerol, enquanto lipossomas fusogênicos aniônicos são formados principalmente a partir de dioleoíl

fosfatidiletanolamina (DOPE). Outro tipo de composição lipossomal é formada a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por exemplo, PC de soja, e PC de ovo. Outro tipo é formado a partir de misturas de fosfolípido e/ou fosfatidilcolina e/ou colesterol.

[00426] Exemplos de outros métodos para introduzir lipossomas em células in vitro e in vivo incluem a Pat. dos E.U.A. Nº. 5.283.185; Pat. dos E.U.A. Nº. 5.171.678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993; e Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992.

[00427] Sistemas lipossomais não iônicos foram também examinados para se determinar a sua utilidade na administração de fármacos à pele, em particular sistemas compreendendo tensoativo não iônico e colesterol. Formulações lipossomais não iônicas compreendendo NovasomeTM I (dilaurato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) e NovasomeTM II (diestearato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) foram usadas para administrar ciclosporina-A à derme de pele de camundongos. Os resultados indicaram que tais sistemas lipossomais não iônicos foram eficazes na facilitação da deposição de ciclosporina A em diferentes camadas da pele (Hu et al. *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4(6) 466).

[00428] Os lipossomas incluem também lipossomas "estericamente estabilizados", um termo que, como usado aqui, se refere a lipossomas compreendendo um ou mais lípidos especializados que, quando incorporados em lipossomas, resultam em tempos de vida em circulação intensificados em relação a lipossomas não tendo tais lípidos especializados. Exemplos de lipossomas estericamente estabilizados são aqueles nos quais parte da porção de lípido formadora de vesícula do lipossoma (A) compreende um ou mais glicolípidos, tais como monossialogangliosídeo GM1, ou (B) é derivatizada com um ou mais

polímeros hidrofílicos, tais como uma fração de polietileno glicol (PEG). Embora não desejando estar limitado por qualquer teoria particular se pensa na técnica que, pelo menos para lipossomas estericamente estabilizados contendo gangliosídeos, esfingomielina, ou lípidos derivatizados com PEG, a meia-vida em circulação intensificada destes lipossomas estericamente estabilizados deriva de uma captação reduzida em células do sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., (1987) FEBS Letters, 223:42; Wu et al., (1993) Cancer Research, 53:3765).

[00429] Vários lipossomas compreendendo um ou mais glicolípidos são conhecidos na técnica. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) relataram a capacidade de monossialogangliosídeo GM<sub>1</sub>, sulfato de galactocerebrosídeo e fosfatidilinositol de melhorar as meias-vidas de lipossomas no sangue. Estas descobertas foram expostas por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). As Patentes dos E.U.A. Nº. 4.837.028 e WO 88/04924, ambas em nome de Allen et al., divulgam lipossomas compreendendo (1) esfingomielina e (2) o gangliosídeo GM1 ou um éster de sulfato de galactocerebrosídeo. A Pat. dos E.U.A. Nº. 5.543.152 (Webb et al.) divulga lipossomas compreendendo esfingomielina. Lipossomas compreendendo 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina são descritos em WO 97/13499 (Lim et al.).

[00430] Em uma modalidade são usados lipossomas catiônicos. Os lipossomas catiônicos têm a vantagem de serem capazes de se fundir à membrana celular. Os lipossomas não catiônicos, apesar de não serem capazes de se fundir tão eficazmente à membrana plasmática, são absorvidos por macrófagos *in vivo* e podem ser usados para administrar agentes de RNAi a macrófagos.

[00431] Vantagens adicionais de lipossomas incluem: os lipossomas obtidos de fosfolípidos naturais são biocompatíveis e biodegradáveis;

os lipossomas podem incorporar uma gama ampla de fármacos solúveis em água e lípidos; os lipossomas podem proteger agentes de RNAi encapsulados em seus compartimentos internos do metabolismo e degradação (Rosoff, em "Pharmaceutical Dosage Forms", Lieberman, Rieger e Bunker (Editores), 1988, volume 1, p. 245). Considerações importantes na preparação de formulações de lipossomas são a carga superficial do lípido, tamanho da vesícula e o volume aquoso dos lipossomas.

[00432] Um lípido catiônico sintético positivamente carregado, cloreto de N-[1-(2,3-dioleilóxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), pode ser usado para formar lipossomas pequenos que interagem espontaneamente com ácido nucleico para formar complexos lípido-ácido nucleico que são capazes de se fundir aos lípidos negativamente carregados das membranas celulares de células de cultura de tecidos, resultando na administração do agente de RNAi (ver, por exemplo, Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 e Patente E.U.A. Nº. 4,897,355 quanto a uma descrição de DOTMA e seu uso com DNA).

[00433] Um análogo de DOTMA, 1,2-bis(oleoilóxi)-3-(trimetilamônia)propano (DOTAP), pode ser usado em combinação com um fosfolípido para formar vesículas que complexam com DNA. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) é um agente eficaz para a administração de ácidos nucleicos altamente aniónicos em células de cultura de tecidos vivos que compreendem lipossomas de DOTMA positivamente carregados que interagem espontaneamente com polinucleotídeos negativamente carregados para formar complexos. Quando são usados suficientes lipossomas positivamente carregados, a carga líquida dos complexos resultantes é também positiva. Complexos positivamente carregados preparados desta maneira se anexam espontaneamente a superfícies celulares

negativamente carregadas, se fundem à membrana plasmática, e distribuem eficazmente ácidos nucleicos funcionais a, por exemplo, células de cultura de tecidos. Outro lípido catiônico comercialmente disponível, 1,2-bis(oleoilóxi)-3,3-(trimetilamônia)propano ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) difere de DOTMA pelo fato de as frações oleoíla estarem ligadas por ligações de éster, em vez de éter.

[00434] Outros compostos de lípidos catiônicos relatados incluem aqueles que foram conjugados com uma variedade de frações, incluindo, por exemplo, carboxiespermina que foi conjugada com um de dois tipos de lípidos e inclui compostos tais como dioctaoleoílamida de 5-carboxiespermilglicina ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) e 5-carboxiespermil-amida de dipalmitoilfosfatidiletanolamina ("DPPE") (ver, por exemplo, Pat. dos E.U.A. Nº. 5.171.678).

[00435] Outro conjugado de lípido catiônico inclui derivatização do lípido com colesterol ("DC-Chol") que foi formulado em lipossomas em combinação com DOPE (Ver Gao, X. e Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Foi relatado que lipopolilisina, preparada por conjugação de polilisina com DOPE, é eficaz para transfecção na presença de soro (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Para certas linhagens celulares se diz que estes lipossomas contendo lípidos catiônicos conjugados exibem toxicidade mais baixa e proporcionam transfecção mais eficaz do que as composições contendo DOTMA. Outros produtos de lípidos catiônicos comercialmente disponíveis incluem DMRIE e DMRIE-HP (Vical, La Jolla, Califórnia) e Lipofectamina (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Outros lípidos catiônicos adequados para a administração de oligonucleotídeos são descritos em WO 98/39359 e WO 96/37194.

[00436] Formulações lipossomais são particularmente adequadas para administração tópica, os lipossomas apresentam várias vantagens em relação a outras formulações. Tais vantagens incluem efeitos secundários reduzidos relacionados com elevada absorção sistêmica do fármaco administrado, acúmulo aumentado do fármaco administrado no alvo desejado, e a capacidade de administrar um agente de RNAi na pele. Em algumas implementações são usados lipossomas para administrar um agente de RNAi a células epidérmicas e também para intensificar a penetração do agente de RNAi em tecidos da derme, por exemplo, na pele. Por exemplo, os lipossomas podem ser aplicados topicalmente. A administração tópica de fármacos formulados como lipossomas na pele foi documentada (ver, por exemplo, Weiner *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2, 405-410 e du Plessis *et al.*, *Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. e Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. *et al.* *Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau, C. *et al.* *Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. e Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. e Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

[00437] Sistemas lipossomais não iônicos foram também examinados para se determinar a sua utilidade na administração de fármacos à pele, em particular sistemas compreendendo tensoativo não iônico e colesterol. Formulações lipossomais não iônicas compreendendo Novosome I (dilaurato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) e Novosome II (diestearato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) foram usadas para administrar um fármaco à derme da pele de camundongo. Tais formulações com agente de RNAi são úteis para tratamento de um distúrbio dermatológico.

[00438] Os lipossomas que incluem iRNA podem ser tornados altamente deformáveis. Tal deformabilidade pode permitir que os

lipossomas penetrem através de poros que são mais pequenos do que o raio médio do lipossoma. Por exemplo, transferossomas são um tipo de lipossomas deformáveis. Os transferossomas podem ser preparados por adição de ativadores da borda de superfície, usualmente tensoativos, a uma composição liposomal padrão. Os transferossomas que incluem um agente de RNAi podem ser administrados, por exemplo, subcutaneamente por injeção de modo a administrar o agente de RNAi a queratinócitos da pele. De modo a atravessarem pele intacta de mamífero, vesículas de lípidos têm de passar através de uma série de poros finos, cada um com um diâmetro menor do que 50 nm, sob a influência de um gradiente transdérmico adequado. Adicionalmente, devido às propriedades dos lípidos, estes transferossomas podem ser auto-otimizantes (adaptação à forma dos poros, por exemplo, na pele), autorreparantes, e conseguem frequentemente alcançar seus alvos sem fragmentação, e frequentemente autocarregantes.

[00439] Outras formulações convenientes para a presente invenção são descritas nos pedidos provisórios dos Estados Unidos N°s. de série 61/018,616, depositado a 2 de janeiro, 2008; 61/018,611, depositado a 2 de janeiro, 2008; 61/039,748, depositado a 26 de março, 2008; 61/047,087, depositado a 22 de abril, 2008, e 61/051,528, depositado a 8 de maio, 2008. O pedido PCT N°. PCT/US2007/080331, depositado a 3 de outubro, 2007, descreve também formulações que são convenientes para a presente invenção.

[00440] Transferossomas são ainda outro tipo de lipossomas, e são agregados de lípidos altamente deformáveis que são candidatos atrativos para veículos de administração de fármacos. Os transferossomas podem ser descritos como gotículas de lípidos que são tão altamente deformáveis que conseguem facilmente penetrar através de poros que são mais pequenos do que a gotícula. Os transferossomas são adaptáveis ao ambiente no qual são usados, por exemplo, são auto-

otimizantes (adaptativos à forma dos poros na pele), autorreparantes, alcançam frequentemente seus alvos sem fragmentação, e frequentemente autocarregantes. Para preparar transferossomas é possível adicionar ativadores de borda de superfície, habitualmente tensoativos, a uma composição lipossomal padrão. Os transferossomas foram usados para administrar albumina do soro à pele. Foi mostrado que a administração de albumina do soro mediada por transferossomas é tão eficaz como injeção subcutânea de uma solução contendo albumina do soro.

[00441] Os tensoativos encontram ampla aplicação em formulações tais como emulsões (incluindo microemulsões) e lipossomas. A maneira mais comum de classificar e ordenar as propriedades dos muitos tipos diferentes de tensoativos, tanto naturais como sintéticos, é pelo uso do equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB). A natureza do grupo hidrofílico (também conhecido como a "cabeça") proporciona o meio mais útil para categorização dos diferentes tensoativos usados em formulações (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., 1988, p. 285).

[00442] Se a molécula de tensoativo não estiver ionizada é classificada como um tensoativo não iônico. Os tensoativos não iônicos encontram ampla aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos e são usáveis ao longo de uma ampla gama de valores de pH. Em geral, seus valores de HLB variam de 2 a cerca de 18 dependendo da sua estrutura. Tensoativos não iônicos incluem ésteres não iônicos tais como ésteres de etileno glicol, ésteres de propileno glicol, ésteres de glicerila, ésteres de poliglicerila, ésteres de sorbitana, ésteres de sacarose, e ésteres etoxilados. Alcanolamidas e éteres não iônicos tais como etoxilatos de álcoois graxos, álcoois propoxilados, e polímeros em bloco etoxilados/propoxilados estão também incluídos em esta classe. Os tensoativos de polioxietileno são os membros mais populares da

classe dos tensoativos não iônicos.

[00443] Se a molécula de tensoativo transportar uma carga negativa quando é dissolvida ou dispersa em água, o tensoativo é classificado como aniónico. Tensoativos aniónicos incluem carboxilatos tais como sabões, lactilatos de acila, amidas de acila de aminoácidos, ésteres do ácido sulfúrico tais como sulfatos de alquila e sulfatos de alquila etoxilados, sulfonatos tais como benzenossulfonatos de alquila, isetionatos de acila, tauratos de acila e sulfossuccinatos, e fosfatos. Os membros mais importantes da classe dos tensoativos aniónicos são os sulfatos de alquila e os sabões.

[00444] Se a molécula de tensoativo transportar uma carga positiva quando é dissolvida ou dispersa em água, o tensoativo é classificado como catiônico. Tensoativos catiônicos incluem sais de amônio quaternário e aminas etoxiladas. Os sais de amônio quaternário são os membros mais usados desta classe.

[00445] Se a molécula de tensoativo tiver a capacidade de transportar uma carga positiva ou negativa, o tensoativo é classificado como anfotérico. Tensoativos anfotéricos incluem derivados do ácido acrílico, alquilamidas substituídas, N-alquilbetaínas e fosfatídeos.

[00446] O uso de tensoativos em produtos, formulações e em emulsões de fármacos foi revisto (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., 1988, p. 285).

[00447] O iRNA para uso nos métodos da invenção pode ser também proporcionado como formulações micelares. "Micélios" são definidos aqui como um tipo particular de montagem molecular na qual moléculas anfipáticas são dispostas em uma estrutura esférica tal que todas as porções hidrofóbicas das moléculas estão dirigidas para dentro, deixando as porções hidrofílicas em contato com a fase aquosa envolvente. Existe a disposição inversa se o ambiente for hidrofóbico.

[00448] Uma formulação micelar mista adequada para administração

através de membranas transdérmicas pode ser preparada por mistura de uma solução aquosa da composição de siRNA, um sulfato de alquila C8 a C22 de metal alcalino, e um composto formador de micélios. Compostos formadores de micélios exemplares incluem lecitina, ácido hialurônico, sais farmaceuticamente aceitáveis do ácido hialurônico, ácido glicólico, ácido láctico, extrato de camomila, extrato de pepino, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico, monooleína, monooleatos, monolauratos, óleo de borragem, óleo de círio-do-norte, mentol, triidróxi oxo colanil glicina e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, glicerina, poliglycerina, lisina, polilisina, trioleína, éteres de polioxietileno e seus análogos, éteres de alquila de polidocanol e seus análogos, quenodesoxicólico, desoxicólico, e suas misturas. Os compostos formadores de micélios podem ser adicionados ao mesmo tempo que o ou após adição do sulfato de alquila de metal alcalino. Micélios mistos serão formados com substancialmente qualquer tipo de mistura dos ingredientes mas mistura vigorosa de modo a proporcionar micélios de tamanhos mais pequenos.

[00449] Em um método é preparada uma primeira composição micelar que contém a composição de siRNA e pelo menos o sulfato de alquila de metal alcalino. A primeira composição micelar é depois misturada com pelo menos três compostos formadores de micélios para formar uma composição micelar mista. Em outro método, a composição micelar é preparada por mistura da composição de siRNA, do sulfato de alquila de metal alcalino e pelo menos um dos compostos formadores de micélios, seguido por adição dos restantes compostos formadores de micélios, com mistura vigorosa.

[00450] Fenol e/ou m-cresol podem ser adicionados à composição micelar mista para estabilizar a formulação e proteger contra crescimento bacteriano. Alternativamente, fenol e/ou m-cresol podem ser adicionados com os ingredientes formadores de micélios. Um

agente isotônico tal como glicerina pode ser também adicionado após formação da composição micelar mista.

[00451] Para administração da formulação micelar como uma pulverização, a formulação pode ser colocada em um distribuidor de aerossol e o distribuidor é carregado com um propulsor. O propulsor, que está sob pressão, está em forma líquida no distribuidor. As razões dos ingredientes são ajustadas tal que as fases aquosa e propulsora se tornem uma, isto é, existe uma fase. Se existirem duas fases é necessário agitar o distribuidor antes de administrar uma porção dos conteúdos, por exemplo através de uma válvula calibrada. A dose administrada do agente farmacêutico é propelida da válvula calibrada em uma pulverização fina.

[00452] Os propulsores podem incluir clorofluorocarbonetos contendo de hidrogênio, fluorocarbonetos contendo de hidrogênio, éter de dimetila e éter de dietila. Em certas modalidades pode ser usado HFA 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano).

[00453] As concentrações específicas dos ingredientes essenciais podem ser determinadas por experimentação relativamente simples. Para absorção através das cavidades orais é frequentemente desejável aumentar, por exemplo, pelo menos duplicar ou triplicar, a dosagem para através de injeção ou administração através do trato gastrointestinal.

## B. Partículas de lípidos

[00454] Os iRNAs, por exemplo, dsRNAs da invenção podem ser totalmente encapsulados em uma formulação de lípidos, por exemplo, uma LNP, ou outra partícula de ácido nucleico-lípido.

[00455] Como usado aqui, o termo "LNP" se refere a uma partícula estável de ácido nucleico-lípido. As LNPs contêm tipicamente um lípido catiônico, um lípido não catiônico, e um lípido que previne agregação da partícula (por exemplo, um conjugado PEG-lípido). As LNPs são

extremamente úteis para aplicações sistêmicas, pois exibem tempos de vida em circulação prolongados após injeção intravenosa (i.v.) e se acumulam em locais distais (por exemplo, locais fisicamente separados do local de administração). As LNPs incluem "pSPLP", que incluem um complexo de agente de condensação-ácido nucleico encapsulado como apresentado na Publicação PCT Nº. WO 00/03683. As partículas da presente invenção têm tipicamente um diâmetro médio de cerca de 50 nm a cerca de 150 nm, mais tipicamente cerca de 60 nm a cerca de 130 nm, mais tipicamente cerca de 70 nm a cerca de 110 nm, o mais tipicamente cerca de 70 nm a cerca de 90 nm, e são substancialmente não tóxicas. Adicionalmente, os ácidos nucleicos, quando presentes nas partículas ácido nucleico-lípido da presente invenção, são resistentes em solução aquosa à degradação com uma nuclease. Partículas de ácido nucleico-lípido e seu método de preparação são descritos nas, por exemplo, Patentes dos E.U.A. Nºs. 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; Publicação dos E.U.A. Nº. 2010/0324120 e Publicação PCT Nº. WO 96/40964.

[00456] Em uma modalidade, a razão de lípido em relação ao fármaco (razão massa/massa) (por exemplo, razão de lípido em relação a dsRNA) estará na gama de cerca de 1:1 a cerca de 50:1, de cerca de 1:1 a cerca de 25:1, de cerca de 3:1 a cerca de 15:1, de cerca de 4:1 a cerca de 10:1, de cerca de 5:1 a cerca de 9:1, ou cerca de 6:1 a cerca de 9:1. Gamas intermédias das gamas recitadas acima são também contempladas como sendo parte da invenção.

[00457] O lípido catiônico pode ser, por exemplo, cloreto de N,N-dioleil-N,N-dimetilamônio (DODAC), brometo de N,N-diestearil-N,N-dimetilamônio (DDAB), cloreto de N-(1-(2,3-dioleoilóxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP), cloreto de N-(1-(2,3-dioleoilóxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), N,N-dimetil-(2,3-dioleoilóxi)propilamina (DODMA), 1,2-DiLinoleilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-

Dilinolenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-Dilinoleilcarbamoilóxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleíxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleíxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoíl-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-Dilinoleíltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-Linoleoíl-2-linoleíxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal de cloreto de 1,2-Dilinoleíxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloreto de 1,2-Dilinoleíl-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleíxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ) ou 3-(N,N-Dilinoleílamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleílamino)-1,2-propanodio (DOAP), 1,2-Dilinoleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinolenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) ou seus análogos, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetra-hidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100), 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ila (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodiil)didodecan-2-ol (Tech G1), ou uma sua mistura. O lípido catiônico pode compreender de cerca de 20% em mol a cerca de 50% em mol ou cerca de 40% em mol do lípido total presente na partícula.

[00458] Em outra modalidade, o composto 2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano pode ser usado para preparar nanopartículas de lípido-siRNA. A síntese de 2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano é descrita no pedido de patente provisória dos Estados Unidos número 61/107,998 depositada a 23 de outubro, 2008, que é aqui incorporada por referência.

[00459] Em uma modalidade, a partícula de lípido-siRNA inclui 2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano a 40%: DSPC a 10%: Colesterol a 40%: PEG-C-DOMG a 10% (percentagem molar) com um

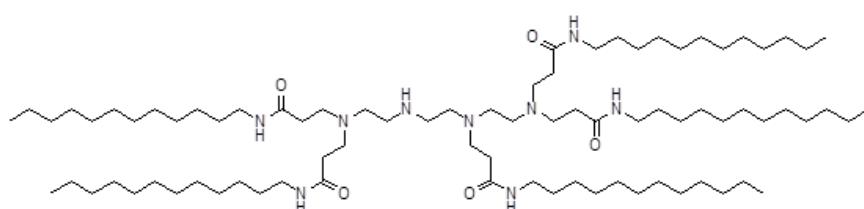
tamanho das partículas de  $63,0 \pm 20$  nm e uma Razão de siRNA/Lípido de 0,027.

[00460] O lípido ionizável/não catiônico pode ser um lípido aniónico ou um lípido neutro, incluindo, mas não se limitando, a diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoifosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoifosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-ethanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoíl-fosfatidiletanolamina (SOPE), colesterol, ou uma sua mistura. O lípido não catiônico pode compreender de cerca de 5% em mol a cerca de 90% em mol, cerca de 10% em mol, ou cerca de 58% em mol se colesterol estiver incluído, do lípido total presente na partícula.

[00461] O lípido conjugado que inibe agregação de partículas pode ser, por exemplo, um polietilenoglicol (PEG)-lípido incluindo, sem limitação, um PEG-diacilglicerol (DAG), um PEG-dialquiloglicopila (DAA), um PEG-fosfolípido, um PEG-ceramida (Cer), ou uma sua mistura. O conjugado PEG-DAA pode ser, por exemplo, um PEG-dilauriloxipropila (Ci2), um PEG-dimiristiloxipropila (Ci4), um PEG-dipalmitiloxipropila (Ci6), ou um PEG-diesteariloxipropila (Ci8). O lípido conjugado que previne agregação de partículas pode ser de 0% em mol a cerca de 20% em mol ou cerca de 2% em mol do lípido total presente na partícula.

[00462] Em algumas modalidades, a partícula de ácido nucleico-lípido inclui adicionalmente colesterol a, por exemplo, cerca de 10% molar a cerca de 60% molar ou cerca de 48% molar do lípido total presente na partícula.

[00463] Em uma modalidade, o lipidoide ND98·4HCl (PM 1487) (ver Pedido de Patente dos E.U.A. Nº. 12/056,230, depositado a 3/26/2008, que é incorporado aqui por referência), Colesterol (Sigma-Aldrich), e PEG-Ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) podem ser usados para preparar nanopartículas de lípido-dsRNA (isto é, partículas LNP01). Soluções de estoque de cada em etanol podem ser preparadas como se segue: ND98, 133 mg/mL; Colesterol, 25 mg/mL, PEG-Ceramida C16, 100 mg/mL. As soluções de estoque de ND98, Colesterol, e PEG-Ceramida C16 podem ser depois combinadas em uma, por exemplo, razão molar 42:48:10. A solução de lípido combinada pode ser misturada com dsRNA aquoso (por exemplo, em acetato de sódio pH 5) tal que a concentração final de etanol seja cerca de 35-45% e a concentração final de acetato de sódio seja cerca de 100-300 mM. As nanopartículas de lípido-dsRNA são tipicamente formadas espontaneamente após mistura. Dependendo da distribuição do tamanho das partículas desejada, a mistura de nanopartículas resultante pode ser extrudada através de uma membrana de policarbonato (por exemplo, limite de exclusão de 100 nm) usando, por exemplo, uma extrusora thermobarrel, tal como Extrusora Lipex (Northern Lipids, Inc). Em alguns casos, o passo de extrusão pode ser omitido. A remoção de etanol e mudança de tampão simultânea podem ser alcançadas por, por exemplo, diálise ou filtração com fluxo tangencial. O tampão pode ser mudado com, por exemplo, salino tamponado com fosfato (PBS) a cerca de pH 7, por exemplo, cerca de pH 6,9, cerca de pH 7,0, cerca de pH 7,1, cerca de pH 7,2, cerca de pH 7,3, ou cerca de pH 7,4.



ND98 Isômero I

**Fórmula 1**

[00464] Formulações de LNP01 são descritas, por exemplo, na Publicação do Pedido Internacional Nº. WO 2008/042973, que é deste modo incorporada por referência.

[00465] Formulações de lípido-dsRNA exemplares adicionais são descritas na Tabela 1.

**Tabela 1**

	<b>Lípido Ionizável/Catiônico</b>	<b>Lípido catiônico/lípido não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lípido</b> <b>Razão Lípido:siRNA</b>
SNALP-1	1,2-Dilinolenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) Lípido:siRNA ~ 7:1
2-XTC	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 Lípido:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 Lípido:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 Lípido:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, Lípido:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, Lípido:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA 10:1

<b>Lípido Ionizável/Catiônico</b>		<b>lípido catiônico/lípido não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lípido</b> <b>Razão Lípido:siRNA</b>
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetra-hidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA 10:1
LNP11	4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ila (MC3)	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(2-hidroxidodecil)-amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)-etil)piperazin-1-il)etilazanodil)didodecan-2-ol (Tech G1)	Tech G1/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 40/15/40/5 Lípido:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Lípido:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA: 12:1

Lípido Ionizável/Catiônico		lípido catiônico/lípido não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lípido Razão Lípido:siRNA
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/35/5 Lípido:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lípido:siRNA: 10:1

DSPC: diestearoilfosfatidilcolina

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

PEG-DMG: PEG-didimiristoíl glicerol (C14-PEG, ou PEG-C14)  
(PEG com peso molecular médio de 2000)

PEG-DSG: PEG-diestiril glicerol (C18-PEG, ou PEG-C18) (PEG com peso molecular médio de 2000)

PEG-cDMA: PEG-carbamoíl-1,2-dimiristiloxipropilamina (PEG com peso molecular médio de 2000)

Formulações compreendendo SNALP (1,2-Dilinolenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)) são descritas na Publicação Internacional No. WO2009/127060, depositada a 15 de abril, 2009, que é deste modo incorporada por referência.

[00466] Formulações compreendendo XTC são descritas, por exemplo, no Pedido Provisório dos E.U.A. Nº. de Série 61/148,366, depositado a 29 de janeiro, 2009; Pedido Provisório dos E.U.A. Nº. de Série 61/156,851, depositado a 2 de março, 2009; Pedido Provisório dos E.U.A. Nº. de Série depositado a 10 de junho, 2009; Pedido Provisório dos E.U.A. Nº. de Série 61/228,373, depositado a 24 de julho, 2009; Pedido Provisório dos E.U.A. Nº. de Série 61/239,686, depositado a 3

de setembro, 2009, e Pedido Internacional Nº. PCT/US2010/022614, depositado a 29 de janeiro, 2010, que são deste modo incorporados por referência.

[00467] Formulações compreendendo MC3 são descritas, por exemplo, na Publicação dos E.U.A. Nº. 2010/0324120, depositada a 10 de junho, 2010, os conteúdos inteiros da qual são deste modo incorporados por referência.

[00468] Formulações compreendendo ALNY-100 são descritas, por exemplo, no Pedido de patente internacional número PCT/US09/63933, depositado a 10 de novembro, 2009, que é deste modo incorporado por referência.

[00469] Formulações compreendendo C12-200 são descritas no Pedido Provisório dos E.U.A. Nº. de Série 61/175,770, depositado a 5 de maio, 2009, e Pedido Internacional Nº. PCT/US10/33777, depositado a 5 de maio, 2010, que são deste modo incorporados por referência.

### ***Síntese de Lípidos Ionizáveis/Catiônicos***

[00470] Qualquer um dos compostos, por exemplo, lípidos catiônicos e similares, usado nas partículas de ácido nucleico-lípido da invenção pode ser preparado por técnicas conhecidas de síntese orgânica, incluindo os métodos descritos em mais detalhe nos Exemplos. Todos os substituintes são como definidos em baixo a não ser que indicado de outro modo.

[00471] "Alquila" significa um hidrocarboneto alifático saturado, não cíclico ou cíclico, de cadeia linear ou ramificado contendo de 1 a 24 átomos de carbono. Alquilas de cadeia linear saturadas representativas incluem metila, etila, n-propila, n-butila, n-pentila, n-hexila, e similares; enquanto alquilas ramificadas saturadas incluem isopropila, sec-butila, isobutila, tert-butila, isopentila, e similares. Alquilas cíclicas saturadas representativas incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclohexila, e similares; enquanto alquilas cíclicas insaturadas incluem

ciclopentenila e ciclo-hexenila e similares.

[00472] "Alquenila" significa uma alquila, como definido acima, contendo pelo menos uma ligação dupla entre átomos de carbono adjacentes. Alquenilas incluem isômeros cis e trans. Alquenilas representativas de cadeia linear e ramificadas incluem etilenila, propilenila, 1-butenila, 2-butenila, isobutilenila, 1-pentenila, 2-pentenila, 3-metil-1-butenila, 2-metil-2-butenila, 2,3-dimetil-2-butenila e similares.

[00473] "Alquinila" significa qualquer alquila ou alquenila, como definido acima, que contém adicionalmente pelo menos uma ligação tripla entre carbonos adjacentes. Alquinilas representativas de cadeia linear e ramificadas incluem acetilenila, propinila, 1-butinila, 2-butinila, 1-pentinila, 2-pentinila, 3-metil-1-butinila e similares.

[00474] "Acila" significa qualquer alquila, alquenila, ou alquinila em que o carbono no ponto de anexação está substituído por um grupo oxo, como definido em baixo. Por exemplo,  $-\text{C}(=\text{O})\text{alquila}$ ,  $-\text{C}(=\text{O})\text{alquenila}$ , e  $-\text{C}(=\text{O})\text{alquinila}$  são grupos acila.

[00475] "Heterociclo" significa um anel heterocíclico monocíclico de 5 a 7 membros, ou bicíclico de 7 a 10 membros, que é saturado, insaturado, ou aromático, e que contém de 1 ou 2 heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e em que os heteroátomos de nitrogênio e enxofre podem estar opcionalmente oxidados, e o heteroátomo de nitrogênio pode estar opcionalmente quaternizado, incluindo anéis bicíclicos em que qualquer um dos heterociclos acima está fundido a um anel benzeno. O heterociclo pode estar anexado através de qualquer heteroátomo ou átomo de carbono. Heterociclos incluem heteroarilas como definido em baixo. Heterociclos incluem morfolinila, pirrolidinonila, pirrolidinila, piperidinila, piperazinila, hidantoinila, valerolactamila, oxiranila, oxetanila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidropiranila, tetra-hidropiridinila, tetra-hidroprimidinila, tetra-hidrotiofenila, tetra-hidrotiopiranila, tetra-

hidropirimidinila, tetra-hidrotiofenila, tetra-hidrotiopiranila e similares

[00476] Os termos "alquila opcionalmente substituída", "alquenila opcionalmente substituída", "alquinila opcionalmente substituída", "acila opcionalmente substituída", e "heterociclo opcionalmente substituído" significam que, quando substituídos, pelo menos um átomo de hidrogênio está substituído por um substituinte. No caso de um substituinte oxo (=O) estão substituídos dois átomos de hidrogênio. A este respeito, substituintes incluem oxo, halogênio, heterociclo, -CN, -ORx, -NRxRy, -NRxC(=O)Ry, -NRxSO2Ry, -C(=O)Rx, -C(=O)ORx, -C(=O)NRxRy, -SOnRx e -SOnNRxRy, em que n é 0, 1 ou 2, Rx e Ry são iguais ou diferentes e são independentemente hidrogênio, alquila ou heterociclo, e cada um dos referidos substituintes de alquila e heterociclo pode estar adicionalmente substituído por um ou mais de oxo, halogênio, -OH, -CN, alquila, -ORx, heterociclo, -NRxRy, -NRxC(=O)Ry, -NRxSO2Ry, -C(=O)Rx, -C(=O)ORx, -C(=O)NRxRy, -SOnRx e -SOnNRxRy.

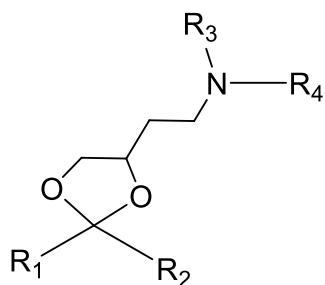
[00477] "Halogênio" significa flúor, cloro, bromo e iodo.

[00478] Em algumas modalidades, os métodos da invenção podem requerer o uso de grupos protetores. A metodologia de grupos protetores é bem conhecida daqueles peritos na técnica (ver, por exemplo, Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, Cidade de Nova Iorque, 1999). Brevemente, grupos protetores, dentro do contexto desta invenção, são qualquer grupo que reduza ou elimine a reatividade indesejada de um grupo funcional. Um grupo protetor pode ser adicionado a um grupo funcional para mascarar a sua reatividade durante certas reações e depois é removido para revelar o grupo funcional original. Em algumas modalidades é usado um "grupo protetor de álcool". Um "grupo protetor de álcool" é qualquer grupo que diminua ou elimine a reatividade indesejada de um grupo funcional álcool. Grupos protetores podem ser adicionados e removidos

usando técnicas bem conhecidas na técnica.

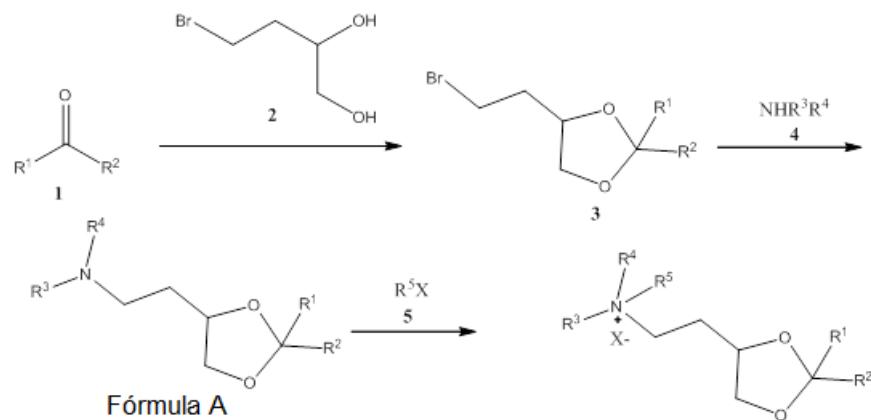
### Síntese da Fórmula A

[00479] Em algumas modalidades, partículas de ácido nucleico-lípido da invenção são formuladas usando um lípido catiônico da fórmula A:



onde  $R_1$  e  $R_2$  são independentemente alquila, alquenila ou alquinila, cada uma pode estar opcionalmente substituída, e  $R_3$  e  $R_4$  são independentemente alquila inferior ou  $R_3$  e  $R_4$  podem ser tomados em conjunto para formar um anel heterocíclico opcionalmente substituído. Em algumas modalidades, o lípido catiônico é XTC (2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano). Em geral, o lípido da fórmula A acima pode ser preparado pelos seguintes Esquemas de Reação 1 ou 2, em que todos os substituintes são como definido acima a não ser que indicado de outro modo.

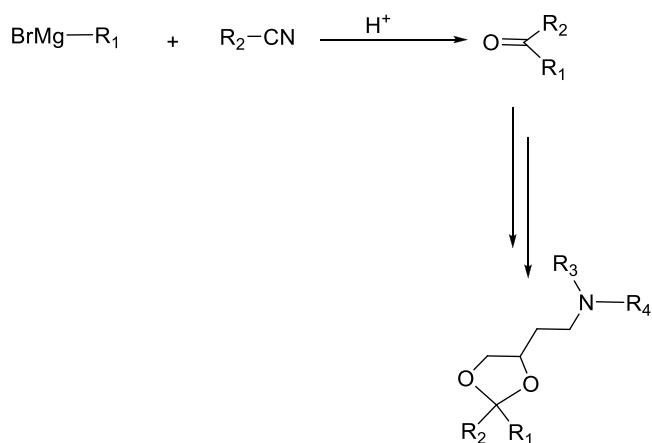
### Esquema 1



[00480] O lípido A, em que  $R_1$  e  $R_2$  são independentemente alquila, alquenila ou alquinila, cada uma pode estar opcionalmente substituída,

e R3 e R4 são independentemente alquila inferior ou R3 e R4 podem ser tomados em conjunto para formar um anel heterocíclico opcionalmente substituído, pode ser preparado de acordo com o Esquema 1. A cetona 1 e o brometo 2 podem ser comprados ou preparados de acordo com métodos conhecidos daqueles com perícia ordinária na técnica. A reação de 1 e 2 origina o cetal 3. O tratamento do cetal 3 com a amina 4 origina lípidos da fórmula A. Os lípidos da fórmula A podem ser convertidos no correspondente sal de amônio com um sal orgânico da fórmula 5, onde X é um contraíon aniónico selecionado de halogênio, hidróxido, fosfato, sulfato, ou similares.

### Esquema 2



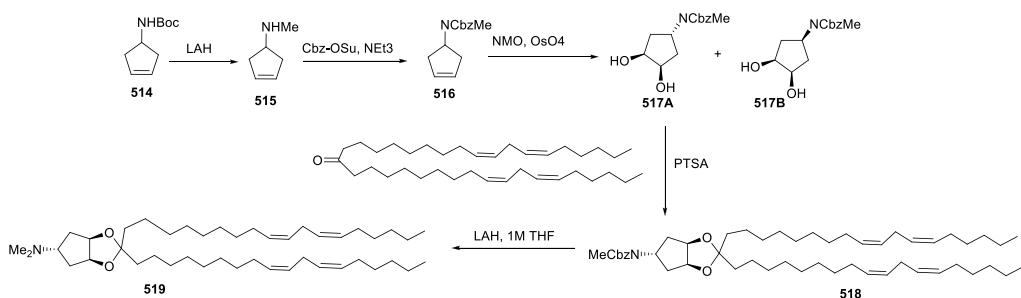
[00481] Alternativamente, o material de início cetona 1 pode ser preparado de acordo com o Esquema 2. O reagente de Grignard 6 e o cianeto 7 podem ser comprados ou preparados de acordo com métodos conhecidos daqueles com perícia ordinária na técnica. A reação de 6 e 7 origina a cetona 1. A conversão da cetona 1 nos correspondentes lípidos de fórmula A é como descrito no Esquema 1.

### Síntese de MC3

[00482] A preparação de DLin-M-C3-DMA (isto é, 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ila) foi como se segue. Uma solução de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol (0,53 g), hidrocloreto do ácido 4-N,N-dimetilaminobutírico (0,51 g), 4-N,N-dimetilaminopiridina (0,61 g) e

hidrocloreto de 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,53 g) em diclorometano (5 mL) foi agitada à temperatura ambiente durante uma noite. A solução foi lavada com ácido clorídrico diluído seguido de bicarbonato de sódio aquoso diluído. As frações orgânicas foram secas sobre sulfato de magnésio anidro, filtradas e o solvente foi removido em um rotovap. O resíduo foi passado em uma coluna de sílica-gel (20 g) usando um gradiente de eluição de metanol/diclorometano a 1-5%. As frações contendo o produto purificado foram combinadas e o solvente removido, originando um óleo incolor (0,54 g). *Síntese de ALNY-100.*

[00483] A síntese do cetal 519 [ALNY-100] foi realizada usando o seguinte esquema 3:



### Síntese de 515

[00484] A uma suspensão agitada de LiAlH4 (3,74 g, 0,09852 mol) em 200 mL de THF anidro em um BFR de duas tubuladuras (1 L) foi adicionada uma solução de 514 (10 g, 0,04926 mol) em 70 mL de THF lentamente a 0°C sob atmosfera de nitrogênio. Após adição completa, a mistura reacional foi aquecida até à temperatura ambiente e depois aquecida até ao refluxo durante 4 horas. A progressão da reação foi monitorizada por TLC. Após completação da reação (por TLC), a mistura foi resfriada até 0°C e extinta com adição cuidadosa de solução saturada de Na2SO4. A mistura reacional foi agitada durante 4 horas à temperatura ambiente e filtrada. O resíduo foi bem lavado com THF. O filtrado e as lavagens foram misturados e diluídos com 400 mL de dioxano e 26 mL de HCl conc. e agitados durante 20 minutos à temperatura ambiente. As volatilidades foram extraídas sob vácuo para

originar o sal de hidrocloreto de 515 como um sólido branco. Rendimento: 7,12 g 1H-RMN (DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 9,34 (largo, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

### **Síntese de 516**

[00485] A uma solução agitada do composto 515 em 100 mL de DCM seco em um BFR de duas tubuladuras de 250 mL foi adicionado NEt3 (37,2 mL, 0,2669 mol) e resfriado até 0°C sob atmosfera de nitrogênio. Após uma adição lenta de N-(benzilóxi-carbonilóxi)-succinimida (20 g, 0,08007 mol) em 50 mL de DCM seco se permitiu que a mistura reacional aquecesse até à temperatura ambiente. Após completação da reação (2-3 h por TLC), a mistura foi lavada sucessivamente com solução de HCl a 1 N (1 x 100 mL) e solução saturada de NaHCO3 (1 x 50 mL). A camada orgânica foi depois seca sobre Na2SO4 anid. e o solvente foi evaporado para dar material em bruto que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica-gel para se obter 516 como massa pegajosa. Rendimento: 11 g (89%). 1H-RMN (CDCl3, 400MHz):  $\delta$  = 7,36-7,27(m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (largo, 1H) 2,74 (s, 3H), 2,60(m, 2H), 2,30-2,25(m, 2H). LC-MS [M+H] -232,3 (96,94%).

### **Síntese de 517A e 517B**

[00486] O ciclopenteno 516 (5 g, 0,02164 mol) foi dissolvido em uma solução de 220 mL de acetona e água (10:1) em um BFR de uma tubuladura de 500 mL e foi-lhe adicionado morfolina-N-óxido de N-metila (7,6 g, 0,06492 mol) seguido de 4,2 mL de solução de OsO4 a 7,6% (0,275 g, 0,00108 mol) em tert-butanol à temperatura ambiente. Após completação da reação (~ 3 h), a mistura foi extinta com adição de Na2SO3 sólido e a mistura resultante foi agitada durante 1,5 h à temperatura ambiente. A mistura reacional foi diluída com DCM (300 mL) e lavada com água (2 x 100 mL) seguido de solução saturada de NaHCO3 (1 x 50 mL), água (1 x 30 mL) e finalmente com salmoura (1x 50 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na2SO4 an. e o solvente foi

removido in vacuo. A purificação cromatográfica em coluna de sílica-gel do material em bruto foi originada uma mistura de diastereômeros, que foram separados por HPLC prep. Rendimento: - 6 g em bruto 517A - Pico 1 (sólido branco), 5,13 g (96%).  $^1\text{H-RMN}$  (DMSO, 400MHz):  $\delta$ = 7,39-7,31(m, 5H), 5,04(s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,48-4,47(d, 2H), 3,94-3,93(m, 2H), 2,71(s, 3H), 1,72- 1,67(m, 4H).  $\text{LC-MS}$  -  $[\text{M}+\text{H}]\text{-266,3}$ ,  $[\text{M}+\text{NH}_4^+]\text{-283,5}$  presente,  $\text{HPLC-97,86\%}$ . Estereoquímica confirmada por raios X.

### *Síntese de 518*

[00487] Usando um procedimento análogo àquele descrito para a síntese do composto 505, o composto 518 (1,2 g, 41%) foi obtido como um óleo incolor.  $^1\text{H-RMN}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$ = 7,35-7,33 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 1H), 5,37-5,27 (m, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,58-4,57 (m, 2H), 2,78-2,74 (m, 7H), 2,06-2,00 (m, 8H), 1,96-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,37-1,25 (m, 1a, 36H), 0,87 (m, 6H).  $\text{HPLC-98,65\%}$ .

### *Procedimento Geral para a Síntese do Composto 519*

[00488] Uma solução do composto 518 (1 eq) em hexano (15 mL) foi adicionada de um modo gota a gota a uma solução gelada de LAH em THF (1 M, 2 eq). Após adição completa, a mistura foi aquecida a 40°C ao longo de 0,5 h, depois resfriada novamente em um banho de gelo. A mistura foi cuidadosamente hidrolisada com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  aquoso saturado, depois filtrada através de celite e reduzida a um óleo. A cromatografia em coluna proporcionou o 519 puro (1,3 g, 68%) que foi obtido como um óleo incolor.  $^{13}\text{C RMN}$   $\delta$  = 130,2, 130,1 (x2), 127,9 (x3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (x2), 29,7, 29,6 (x2), 29,5 (x3), 29,3 (x2), 27,2 (x3), 25,6, 24,5, 23,3, 2,6, 14,1; Eletropulverização MS (+ve): Peso molecular para  $\text{C44H80NO}_2$  ( $\text{M} + \text{H}$ )<sup>+</sup> Calc. 654,6, Experimental 654,6.

[00489] As formulações preparadas pelo método padrão ou isento

de extrusão podem ser caracterizadas de maneiras similares. Por exemplo, as formulações são tipicamente caracterizadas por inspeção visual. Devem ser soluções translúcidas esbranquiçadas isentas de agregados ou sedimento. O tamanho das partículas e a distribuição do tamanho das partículas de nanopartículas de lípido podem ser medidos por dispersão de luz usando, por exemplo, um Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA). As partículas devem ter um tamanho de cerca de 20-300 nm, tal como 40-100 nm. A distribuição do tamanho das partículas deve ser unimodal. A concentração total de dsRNA na formulação, bem como a fração aprisionada, é estimada usando um ensaio de exclusão de corante. Uma amostra do dsRNA formulado pode ser incubada com um corante de ligação a RNA, tal como Ribogreen (Molecular Probes), na presença ou ausência de um tensoativo desagregador da formulação, por exemplo, Triton-X100 a 0,5%. O dsRNA total presente na formulação pode ser determinado pelo sinal da amostra contendo o tensoativo, em relação a uma curva padrão. A fração aprisionada é determinada por subtração do conteúdo de dsRNA "livre" (como medido pelo sinal na ausência de tensoativo) do conteúdo de dsRNA total. A percentagem de dsRNA aprisionado é tipicamente >85%. Para a formulação de SNALP, o tamanho das partículas é pelo menos 30 nm, pelo menos 40 nm, pelo menos 50 nm, pelo menos 60 nm, pelo menos 70 nm, pelo menos 80 nm, pelo menos 90 nm, pelo menos 100 nm, pelo menos 110 nm, e pelo menos 120 nm. A gama adequada é tipicamente cerca de pelo menos 50 nm a cerca de pelo menos 110 nm, cerca de pelo menos 60 nm a cerca de pelo menos 100 nm, ou cerca de pelo menos 80 nm a cerca de pelo menos 90 nm.

[00490] Composições e formulações para administração oral incluem pós ou grânulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensões ou soluções em água ou meios não aquosos, cápsulas, cápsulas de gel,

saquetas, comprimidos ou minicomprimidos. Podem ser desejáveis espessantes, agentes aromatizantes, diluentes, emulsificantes, auxiliares de dispersão ou ligantes. Em algumas modalidades, formulações orais são aquelas nas quais dsRNAs apresentados na invenção são administrados em conjunto com um ou mais tensoativos intensificadores da penetração e quelantes. Tensoativos adequados incluem ácidos graxos e/ou seus ésteres ou sais, ácidos biliares e/ou seus sais. Ácidos biliares/sais adequados incluem ácido quenodeoxicólico (CDCA) e ácido ursodeoxiquenodeoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido desidrocólico, ácido deoxicólico, ácido glucocólico, ácido glicocólico, ácido glicodeoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodeoxicólico, tauro-24,25-di-hidro-fusidato de sódio e glicodihidrofusidato de sódio. Ácidos graxos adequados incluem ácido araquidônico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerila, 1-dodecilazaciclo-heptan-2-ona, uma acilcarnitina, uma acilcolina, ou um monoglicerídeo, um diglicerídeo ou um seu sal farmaceuticamente aceitável (por exemplo, sódio). Em algumas modalidades são usadas combinações de intensificadores da penetração, por exemplo, ácidos graxos/sais em combinação com ácidos biliares/sais. Uma combinação exemplar é o sal de sódio do ácido láurico, ácido cáprico e UDCA. Intensificadores da penetração adicionais incluem éter de polioxietileno-9-laurila, éter de polioxietileno-20-cetila. DsRNAs apresentados na invenção podem ser administrados oralmente, em forma granular incluindo partículas secas pulverizadas, ou complexados para formarem micro ou nanopartículas. Agentes de complexação de dsRNA incluem poliaminoácidos; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albuminas, amidos,

acrilatos, polietilenoglicóis (PEG) e amidos; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivatizadas com DEAE, pululanas, celuloses e amidos. Agentes de complexação adequados incluem quitosana, N-trimetilquitosana, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometiletileno P(TDAE), poliaminoestireno (por exemplo, p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albumina e DEAE-dextrana, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato, e polietilenoglicol (PEG). Formulações orais para dsRNAs e sua preparação são descritas em detalhe na Patente dos E.U.A. 6.887.906, Publn dos EUA Nº. 20030027780, e Patente dos E.U.A. Nº. 6.747.014, cada uma das quais é incorporada aqui por referência.

[00491] Composições e formulações para administração parenteral, intraparênquima (no cérebro), intratecal, intraventricular ou intra-hepática podem incluir soluções aquosas estéreis que podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados tais como, mas não se limitando a, intensificadores da penetração, compostos transportadores e outros transportadores ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

[00492] As composições farmacêuticas da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, soluções, emulsões, e formulações contendo lipossomas. Estas composições podem ser geradas a partir de uma variedade de componentes que incluem, mas não estão limitados a, líquidos pré-formados, sólidos autoemulsificantes e semissólidos autoemulsificantes. São particularmente preferenciais formulações que se dirigem ao fígado quando se tratam distúrbios hepáticos tais como carcinoma hepático.

[00493] As formulações farmacêuticas da presente invenção, que podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária, podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas na indústria farmacêutica. Tais técnicas incluem o passo de colocação em associação dos ingredientes ativos com o(s) transportador(es) ou excipiente(s) farmacêutico(s). Em geral, as formulações são preparadas por colocação em associação uniforme e íntima dos ingredientes ativos com transportadores líquidos ou transportadores sólidos finamente divididos ou ambos, e, depois, se necessário, moldagem do produto.

[00494] As composições da presente invenção podem ser formuladas em qualquer uma de muitas formas de dosagem possíveis, tais como, mas não se limitando a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, xaropes líquidos, géis moles, supositórios, e enemas. As composições da presente invenção podem ser também formuladas como suspensões em meios aquosos, não aquosos ou mistos. As suspensões aquosas podem adicionalmente conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrana. A suspensão pode também conter estabilizantes.

### **C. Formulações Adicionais**

#### **i. Emulsões**

[00495] As composições da presente invenção podem ser preparadas e formuladas como emulsões. Emulsões são tipicamente sistemas heterogêneos de um líquido disperso em outro na forma de gotículas com um diâmetro usualmente excedendo 0,1 µm (ver, por exemplo, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>a</sup> ed.), Nova Iorque, NI; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 199; Rosoff, em

*Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., Volume 1, p. 245; Block em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 2, p. 335; Higuchi *et al.*, em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). As emulsões são frequentemente sistemas bifásicos compreendendo duas fases líquidas imiscíveis intimamente misturadas e dispersas entre si. Em geral, emulsões podem ser da variedade água-em-óleo (w/o) ou óleo-em-água (o/w). Quando uma fase aquosa é finamente dividida e dispersa como gotículas mínimas em uma fase oleosa volumosa, a composição resultante é chamada uma emulsão água-em-óleo (w/o). Alternativamente, quando uma fase oleosa é finamente dividida e dispersa como gotículas mínimas em uma fase aquosa volumosa, a composição resultante é chamada uma emulsão óleo-em-água (o/w). As emulsões podem conter componentes adicionais adicionalmente às fases dispersas, e o fármaco ativo, que pode estar presente como uma solução em qualquer uma das fases aquosa, fase oleosa ou o próprio como uma fase separada. Excipientes farmacêuticos tais como emulsificantes, estabilizantes, corantes, e antioxidantes, podem estar também presentes em emulsões como necessário. Emulsões farmacêuticas podem ser também emulsões múltiplas que são compreendidas por mais do que duas fases tais como, por exemplo, no caso de emulsões óleo-em-água-em-óleo (o/w/o) e água-em-óleo-em-água (w/o/w). Tais formulações complexas proporcionam frequentemente certas vantagens que emulsões binárias simples não apresentam. Emulsões múltiplas nas quais gotículas de óleo individuais de uma emulsão o/w encerram pequenas gotículas de água constituem uma emulsão w/o/w. Do mesmo modo, um sistema de gotículas de óleo encerradas em glóbulos de água estabilizados em uma fase oleosa contínua proporciona uma emulsão o/w/o.

[00496] As emulsões são caracterizadas por estabilidade termodinâmica pequena ou nula. Frequentemente, a fase dispersa ou descontínua da emulsão está bem dispersa na fase externa ou contínua e mantida em esta forma através de emulsificantes ou da viscosidade da formulação. Qualquer uma das fases da emulsão pode ser um semissólido ou um sólido, como é o caso de bases e cremes de pomadas do estilo emulsão. Outros meios de estabilização de emulsões implicam o uso de emulsificantes que podem ser incorporados em qualquer uma das fases da emulsão. Os emulsificantes podem ser amplamente classificados em quatro categorias: tensoativos sintéticos, emulsificantes ocorrendo naturalmente, bases de absorção, e sólidos finamente dispersos (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>a</sup> ed.), Nova Iorque, NI; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 199).

[00497] Os tensoativos, também conhecidos como agentes com superfície ativa, sintéticos têm encontrado ampla aplicabilidade na formulação de emulsões e foram revistos na literatura (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>a</sup> ed.), Nova Iorque, NI; Rieger, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 285; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., 1988, volume 1, p. 199). Os tensoativos são tipicamente anfifílicos e compreendem uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica. A razão da natureza hidrofílica em relação à hidrofóbica do tensoativo foi denominada equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB) e é uma ferramenta valiosa na categorização e

seleção de tensoativos na preparação de formulações. Os tensoativos podem ser classificados em diferentes classes com base na natureza do grupo hidrofílico: não iônico, aniônico, catiônico e anfotérico (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>a</sup> ed.), Nova Iorque, NI, Rieger, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 285).

[00498] Os emulsificantes ocorrendo naturalmente usados em formulações de emulsão incluem lanolina, cera de abelhas, fosfatídeos, lecitina e acácia. As bases de absorção possuem propriedades hidrofílicas tal que possam embeber água para formar emulsões w/o retendo no entanto suas consistências semissólidas, tais como lanolina anidra e petrolato hidrofílico. Sólidos finamente divididos têm sido também usados como bons emulsificantes, especialmente em combinação com tensoativos e em preparações viscosas. Estes incluem sólidos inorgânicos polares, tais como hidróxidos de metais pesados, argilas não expansíveis tais como bentonita, atapulgita, hectorita, caulim, montmorilonita, silicato de alumínio coloidal e silicato de alumínio e magnésio coloidal, pigmentos e sólidos não polares tais como carbono ou triestearato de glicerila.

[00499] Uma grande variedade de materiais não emulsificantes está também incluída em formulações de emulsão e contribui para as propriedades de emulsões. Estes incluem gorduras, óleos, ceras, ácidos graxos, álcoois graxos, ésteres graxos, umectantes, coloides hidrofílicos, conservantes e antioxidantes (Block, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 335; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p.199).

[00500] Coloides hidrofílicos ou hidrocoloides incluem gomas ocorrendo naturalmente e polímeros sintéticos tais como polissacarídeos (por exemplo, acácia, ágar, ácido algínico, carragenano, goma de guar, goma Karaya, e tragacanto), derivados de celulose (por exemplo, carboximetilcelulose e carboxipropilcelulose), e polímeros sintéticos (por exemplo, carbômeros, éteres de celulose, e polímeros de carboxivinila). Estes se dispersam ou dilatam em água para formar soluções coloidais que estabilizam emulsões por formação de filmes interfaciais fortes em torno das gotículas da fase dispersa e por aumento da viscosidade da fase externa.

[00501] Uma vez que as emulsões contêm frequentemente um número de ingredientes tais como carboidratos, proteínas, esteróis e fosfatídeos, que podem facilmente suportar o crescimento de micróbios, estas formulações incorporam frequentemente conservantes. Conservantes comumente usados incluídos em formulações de emulsão incluem parabeno de metila, parabeno de propila, sais de amônio quaternário, cloreto de benzalcônio, ésteres do ácido p-hidroxibenzoico, e ácido bórico. Antioxidantes são também comumente adicionados a formulações de emulsão para prevenir deterioração da formulação. Os antioxidantes usados podem ser agentes de remoção de radicais livres tais como tocoferóis, galatos de alquila, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ou agentes redutores tais como ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, e agentes sinérgicos antioxidantes tais como ácido cítrico, ácido tartárico, e lecitina.

[00502] A aplicação de formulações de emulsão através de rotas dermatológicas, orais e parenterais e métodos para sua preparação foram revistos na literatura (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>a</sup> ed.), Nova Iorque, NY;

Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Edits.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 199). Formulações de emulsão para administração oral têm sido muito amplamente usadas devido à facilidade de formulação, bem como eficácia do ponto de vista da absorção e biodisponibilidade (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>a</sup> ed.), Nova Iorque, NI; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 245; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 199). Laxantes à base de óleos minerais, vitaminas solúveis em óleo e preparações nutritivas com elevado conteúdo de gordura estão entre os materiais que têm sido comumente administrados oralmente como emulsões o/w.

## *ii. Microemulsões*

[00503] Em uma modalidade da presente invenção, as composições de iRNAs e ácidos nucleicos são formuladas como microemulsões. Uma microemulsão pode ser definida como um sistema de água, óleo e anfifílico que é uma solução líquida única opticamente isotrópica e termodinamicamente estável (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>a</sup> ed.), Nova Iorque, NI; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 245). Tipicamente, as microemulsões são sistemas que são preparados primeiramente por dispersão de um óleo em uma solução aquosa de tensoativo e depois adição de uma quantidade suficiente de um quarto componente, geralmente um álcool com comprimento intermédio da

cadeia, para formar um sistema transparente. Portanto, as microemulsões têm sido também descritas como dispersões termodinamicamente estáveis, isotropicamente límpidas de dois líquidos imiscíveis que são estabilizadas por filmes interfaciais de moléculas com superfície ativa (Leung e Shah, em: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nova Iorque, páginas 185-215). As microemulsões são comumente preparadas através de uma combinação de três a cinco componentes que incluem óleo, água, tensoativo, cotonsoativo e eletrólito. Se a microemulsão é do tipo água-em-óleo (w/o) ou óleo-em-água (o/w) está dependente das propriedades do óleo e tensoativo usados e da estrutura e empacotamento geométrico das cabeças polares e caudas de hidrocarbonetos das moléculas de tensoativo (Schott, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

[00504] A abordagem fenomenológica utilizando diagramas de fase tem sido extensamente estudada e originou um conhecimento abrangente, para um perito na técnica, de como formular microemulsões (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8<sup>a</sup> ed.), Nova Iorque, NI; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 245; Block, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 335). Em comparação com emulsões convencionais, as microemulsões oferecem a vantagem de solubilização de fármacos insolúveis em água em uma formulação de gotículas termodinamicamente estáveis que se formam espontaneamente.

[00505] Os tensoativos usados na preparação de microemulsões

incluem, mas não estão limitados a, tensoativos iônicos, tensoativos não iônicos, Brij 96, éteres de oleíla e polioxetileno, ésteres de ácidos graxos e poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), sozinhos ou em combinação com cotonsoativos. O cotonsoativo, usualmente um álcool de cadeia curta tal como etanol, 1-propanol, e 1-butanol, serve para aumentar a fluidez interfacial por penetração no filme de tensoativo e consequentemente criação de um filme desordenado devido ao espaço vazio gerado entre moléculas de tensoativo. No entanto podem ser preparadas microemulsões sem o uso de cotonsoativos e sistemas de microemulsão autoemulsificantes isentos de álcool são conhecidos na técnica. A fase aquosa pode tipicamente ser, mas não está limitada a, água, uma solução aquosa do fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceróis, propileno glicóis, e derivados de etileno glicol. A fase de óleo pode incluir, mas não está limitada a, materiais tais como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos graxos, mono, di, e triglicerídeos de cadeia média (C8-C12), ésteres de ácidos graxos e glicerila polietoxilados, álcoois graxos, glicerídeos poliglicolizados, glicerídeos C8-C10 saturados poliglicolizados, óleos vegetais e óleo de silicone.

[00506] As microemulsões são particularmente de interesse do ponto de vista da solubilização de fármacos e da absorção intensificada de fármacos. Microemulsões à base de lípidos (o/w e w/o) têm sido propostas para intensificar a biodisponibilidade oral de fármacos, incluindo peptídeos (ver, por exemplo, Patentes dos E.U.A. N°s. 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find.*

*Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). As microemulsões proporcionam vantagens de solubilização melhorada de fármacos, proteção de fármacos da hidrólise enzimática, possível intensificação da absorção de fármacos devido a alterações, induzidas por tensoativos, da fluidez e permeabilidade membranares, facilidade de preparação, facilidade de administração oral em relação a formas de dosagem sólidas, potência clínica melhorada, e toxicidade diminuída (ver, por exemplo, Patentes dos E.U.A. N°s. 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7,157,099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Frequentemente, as microemulsões podem se formar espontaneamente quando seus componentes são colocados em contato à temperatura ambiente. Isto pode ser particularmente vantajoso quando se formulam fármacos termolábeis, peptídeos ou iRNAs. As microemulsões têm sido também eficazes na administração transdérmica de componentes ativos em aplicações cosméticas e farmacêuticas. Se espera que as composições e formulações de microemulsão da presente invenção facilitarão a absorção sistêmica aumentada de iRNAs e ácidos nucleicos a partir do trato gastrointestinal, bem como melhorarão a captação celular local de iRNAs e ácidos nucleicos.

[00507] As microemulsões da presente invenção podem também conter componentes e aditivos suplementares tais como monoestearato de sorbitana (Grill 3), Labrasol, e intensificadores da penetração para melhorar as propriedades da formulação e intensificar a absorção dos iRNAs e ácidos nucleicos da presente invenção. Os intensificadores da penetração usados nas microemulsões da presente invenção podem ser classificados como pertencendo a uma de cinco amplas categorias - tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não tensoativos não quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada uma destas classes foi

discutida acima.

***iii. Micropartículas***

[00508] Um agente de RNAi da invenção pode ser incorporado em uma partícula, por exemplo, uma micropartícula. As micropartículas podem ser produzidas por secagem por pulverização, mas podem ser também produzidas por outros métodos incluindo lyophilização, evaporação, secagem em leito fluidizado, secagem por vácuo, ou uma combinação destas técnicas.

***iv. Intensificadores da Penetração***

[00509] Em uma modalidade, a presente invenção emprega vários intensificadores da penetração para efetuar a administração eficaz de ácidos nucleicos, particularmente iRNAs, à pele de animais. A maioria dos fármacos está presente em solução em ambas as formas ionizada e não ionizada. No entanto, usualmente apenas fármacos solúveis em lípidos ou lipofílicos atravessam prontamente membranas celulares. Foi descoberto que mesmo fármacos não lipofílicos conseguem atravessar membranas celulares se a membrana a ser atravessada for tratada com um intensificador da penetração. Adicionalmente a auxiliarem a difusão de fármacos não lipofílicos através de membranas celulares, os intensificadores da penetração intensificam também a permeabilidade de fármacos lipofílicos.

[00510] Os intensificadores da penetração podem ser classificados como pertencendo a uma de cinco amplas categorias, isto é, tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não tensoativos não quelantes (ver, por exemplo, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, Nova Iorque, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92). Cada uma das classes acima mencionadas de intensificadores da penetração é descrita em baixo em mais detalhe.

[00511] Tensoativos (ou "agentes com atividade de superfície") são

entidades químicas que, quando dissolvidas em uma solução aquosa, reduzem a tensão superficial da solução ou a tensão interfacial entre a solução aquosa e outro líquido, com o resultado de a absorção de iRNAs através da mucosa ser intensificada. Adicionalmente a sais biliares e ácidos graxos, estes intensificadores da penetração incluem, por exemplo, lauril sulfato de sódio, éter de polioxietileno-9-laurila e éter de polioxietileno-20-cetila (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nova Iorque, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92); e emulsões perfluoroquímicas, tais como FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252.

[00512] Vários ácidos graxos e seus derivados que atuam como intensificadores da penetração incluem, por exemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoíl-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidônico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazaciclo-heptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, seus ésteres de alquila C1-20 (por exemplo, metila, isopropila e t-butila), e seus mono- e di-glicerídeos (isto é, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (ver por exemplo, Touitou, E., et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

[00513] O papel fisiológico da bílis inclui a facilitação da dispersão e absorção de lípidos e vitaminas solúveis em gordura (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nova Iorque, NY, 2002; Brunton, Capítulo 38 em: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9<sup>a</sup> Ed., Hardman

*et al.* Eds., McGraw-Hill, Nova Iorque, 1996, pp. 934-935). Vários sais biliares naturais, e seus derivados sintéticos, atuam como intensificadores da penetração. Assim, o termo "sais biliares" inclui qualquer um dos componentes ocorrendo naturalmente da bílis bem como qualquer um de seus derivados sintéticos. Sais biliares adequados incluem, por exemplo, ácido cólico (ou seu sal de sódio farmaceuticamente aceitável, colato de sódio), ácido desidrocólico (desidrocolato de sódio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sódio), ácido glucocólico (glucocolato de sódio), ácido glicocólico (glicocolato de sódio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sódio), ácido taurocólico (taurocolato de sódio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sódio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sódio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-di-hidro-fusidato de sódio (STDHF), glicodi-hidrofusidato de sódio e éter de polioxietileno-9-laurila (POE) (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nova Iorque, NI, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92; Swinyard, Capítulo 39 Em: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18<sup>a</sup> Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

[00514] Agentes quelantes, como usados em conexão com a presente invenção, podem ser definidos como compostos que removem íons metálicos da solução por formação de complexos com eles, com o resultado de a absorção de iRNAs através da mucosa ser intensificada. No que diz respeito ao seu uso como intensificadores da penetração na presente invenção, os agentes quelantes têm a vantagem adicional de também servirem como inibidores de DNase, pois a maioria das DNA

nucleases caracterizadas requer um íon metálico divalente para catálise e é assim inibida por agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Agentes quelantes adequados incluem mas não estão limitados a etilenodiaminotetraacetato dissódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por exemplo, salicilato de sódio, 5-metoxissalicilato e homovanilato), derivados de N-acila de colagênio, derivados de lauret-9 e N-aminoacila de beta-dicetonas (enaminas) (ver, por exemplo, Katdare, A. et al., "Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery", CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., "Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems", 1991, página 92; Muranishi, "Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems", 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

[00515] Como usado aqui, compostos intensificadores da penetração não tensoativos não quelantes podem ser definidos como compostos que demonstram atividade insignificante como agentes quelantes ou como tensoativos mas que ainda assim intensificam a absorção de iRNAs através da mucosa alimentar (ver, por exemplo, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta classe de intensificadores da penetração inclui, por exemplo, ureias cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquil- e 1-alquenilazaciclo-alcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); e agentes anti-inflamatórios não esteroides tais como diclofenac de sódio, indometacina e fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

[00516] Agentes que intensificam a captação de iRNAs ao nível celular podem ser também adicionados à composição farmacêutica e outras composições da presente invenção. Por exemplo sabe-se também que lípidos catiônicos, tais como lipofectina (Junichi et al., Patente dos E.U.A. No. 5,705,188), derivados catiônicos de glicerol, e

moléculas policationicas, tais como polilisina (Lollo et al., Pedido PCT WO 97/30731), intensificam a captação celular de dsRNAs. Exemplos de reagentes de transfecção comercialmente disponíveis incluem, por exemplo, Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStile™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Reagente de Transfecção X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Suíça), Reagente de Transfecção Lipossômica DOTAP (Grenzacherstrasse, Suíça), Reagente de Transfecção Lipossômica DOSPER (Grenzacherstrasse, Suíça), ou Fugene (Grenzacherstrasse, Suíça), Reagente Transfectam® (Promega; Madison, WI), Reagente de Transfecção TransFast™ (Promega; Madison, WI), Reagente Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), Reagente Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marselha, França), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marselha, França), Reagente de Transfecção TransPass™ D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, EUA), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção PerFectina (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), reagente de Transfecção GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), reagente de Transfecção GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção Cytofectina (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de transfecção TrojanPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, EUA), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, EUA), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, EUA), UniFECTOR

(B-Bridge International; Mountain View, CA, EUA), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EUA), ou HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, EUA), entre outros.

[00517] Podem ser utilizados outros agentes para intensificar a penetração dos ácidos nucleicos administrados, incluindo glicóis tais como etileno glicol e propileno glicol, pirróis tais como 2-pirrol, azonas, e terpenos tais como limoneno e mentona.

**v. *Transportadores***

[00518] Certas composições da presente invenção incorporam também compostos transportadores na formulação. Como usado aqui, "composto transportador" ou "transportador" pode se referir a um ácido nucleico, ou seu análogo, que é inerte (isto é, não possui atividade biológica per se) mas que é reconhecido como um ácido nucleico por processos *in vivo* que reduzem a biodisponibilidade de um ácido nucleico tendo atividade biológica por, por exemplo, degradação do ácido nucleico biologicamente ativo ou promoção da sua remoção da circulação. A coadministração de um ácido nucleico e um composto transportador, tipicamente com um excesso da última substância, pode resultar em uma redução substancial da quantidade de ácido nucleico recuperada no fígado, rim ou outros reservatórios extracirculatórios, presumivelmente devido a competição entre o composto transportador e o ácido nucleico para um receptor comum. Por exemplo, a recuperação de um dsRNA parcialmente de fosforotioato em tecido hepático pode ser reduzida quando é coadministrado com ácido poliinosínico, sulfato de dextrana, ácido policitídico ou ácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-dissulfônico (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

**vi. *Excipientes***

[00519] Em contraste com um composto transportador, um

"transportador farmacêutico" ou "excipiente" é um solvente, agente de suspensão farmaceuticamente aceitável ou qualquer outro veículo farmacologicamente inerte para administração de um ou mais ácidos nucleicos a um animal. O excipiente pode ser líquido ou sólido e é selecionado, com o modo de administração planejado em mente, de modo a proporcionar a voluminosidade, consistência, etc., desejadas quando combinado com um ácido nucleico e os outros componentes de uma dada composição farmacêutica. Transportadores farmacêuticos típicos incluem, mas não estão limitados a, agentes de ligação (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou metilcelulose de hidroxipropila, etc.); enchimentos (por exemplo, lactose e outros açúcares, celulose microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de cálcio, celulose de etila, poliacrilatos ou hidrogenofosfato de cálcio, etc.); lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco, sílica, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, óleos vegetais hidrogenados, amido de milho, polietileno glicóis, benzoato de sódio, acetato de sódio, etc.); desintegrantes (por exemplo, amido, glicolato de amido sódico, etc.); e agentes molhantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio, etc.).

[00520] Excipientes orgânicos ou inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reagem prejudicialmente com ácidos nucleicos podem ser também usados para formular as composições da presente invenção. Transportadores farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, água, soluções salinas, álcoois, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

[00521] As formulações para administração tópica de ácidos nucleicos podem incluir soluções aquosas estéreis e não estéreis,

soluções não aquosas em solventes comuns tais como álcoois, ou soluções dos ácidos nucleicos em bases de óleo líquidas ou sólidas. As soluções podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados. Podem ser usados excipientes orgânicos ou inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reajam prejudicialmente com ácidos nucleicos.

[00522] Excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem mas, não estão limitados a, água, soluções de sal, álcool, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

#### ***vii. Outros Componentes***

[00523] As composições da presente invenção podem adicionalmente conter outros componentes adjuntos convencionalmente encontrados em composições farmacêuticas, a seus níveis de uso estabelecidos na técnica. Assim, por exemplo, as composições podem conter materiais adicionais, compatíveis e farmaceuticamente ativos tais como, por exemplo, antipruríticos, adstringentes, anestésicos locais ou agentes anti-inflamatórios, ou podem conter materiais adicionais úteis na formulação física de várias formas de dosagem das composições da presente invenção, tais como corantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espessantes e estabilizantes. No entanto, tais materiais, quando adicionados, não devem interferir indevidamente com as atividades biológicas dos componentes das composições da presente invenção. As formulações podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizantes, agentes molhantes, emulsificantes, sais para influência da pressão osmótica, tampões, substâncias corantes, aromatizantes e/ou aromáticas e similares que não interajam prejudicialmente com o(s)

ácido(s) nucleico(s) da formulação.

[00524] As suspensões aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrana. A suspensão pode também conter estabilizantes.

[00525] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas apresentadas na invenção incluem (a) um ou mais compostos de iRNA e (b) um ou mais agentes que funcionam por um mecanismo não de RNAi e que são úteis no tratamento de um distúrbio hemolítico. Exemplos de tais agentes incluem, mas não estão limitados a, um agente anti-inflamatório, agente antiesteatose, agente antiviral, e/ou antifibrose. Adicionalmente, outras substâncias comumente usadas para proteger o fígado, tais como silimarina, podem ser também usadas em conjunto com os iRNAs descritos aqui. Outros agentes úteis para tratamento de doenças do fígado incluem telbivudina, entecavir, e inibidores de proteases tais como telaprevir, e outros descritos, por exemplo, em Tung et al., Publicações de Pedidos dos E.U.A. N°s. 2005/0148548, 2004/0167116, e 2003/0144217; e em Hale et al., Publicação de Pedido dos E.U.A. N°. 2004/0127488.

[00526] A toxicidade e eficácia terapêutica de tais compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de células ou animais experimentais, por exemplo, para determinação da LD50 (a dose letal para 50% da população) e da ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de doses entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expressa como a razão LD50/ED50. São preferenciais compostos que exibem elevados índices terapêuticos.

[00527] Os dados obtidos de ensaios de cultura celular e estudos animais podem ser usados na formulação de uma gama de dosagens para uso em humanos. A dosagem de composições apresentadas aqui

na invenção está geralmente dentro de uma gama de concentrações em circulação que incluem a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta gama dependendo da forma de dosagem empregue e da rota de administração utilizada. Para qualquer composto usado nos métodos apresentados na invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser inicialmente estimada a partir de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para se alcançar uma gama de concentrações no plasma em circulação do composto ou, quando apropriado, do produto de polipeptídeo de uma sequência alvo (por exemplo, alcance de uma concentração diminuída do polipeptídeo) que inclui a IC50 (isto é, a concentração do composto de teste que alcança uma inibição semimáxima de sintomas) como determinado em cultura de células. Tal informação pode ser usada para determinar mais precisamente doses úteis em humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de elevado desempenho.

[00528] Adicionalmente à sua administração, como discutido acima, os RNAi apresentados na invenção podem ser administrados em combinação com outros agentes conhecidos eficazes no tratamento de processos patológicos mediados por expressão de CFB, C3, e/ou C9. Em qualquer caso, o médico administrador pode ajustar a quantidade e calendarização da administração de iRNA com base em resultados observados usando medições de eficácia padrão conhecidas na técnica ou descritas aqui.

## **VII. Métodos para Inibição da Expressão do Componente do Complemento**

[00529] A presente invenção fornece métodos de inibição da expressão de um gene do componente do complemento como descrito aqui. Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de inibição da expressão de CFB em uma célula. Os métodos incluem contato de

uma célula com um agente de RNAi, por exemplo, um agente de RNAi de fita dupla, em uma quantidade eficaz para inibir a expressão de CFB na célula, inibindo deste modo a expressão de CFB na célula.

[00530] A presente invenção também fornece métodos de inibição da expressão de C3 em uma célula. Os métodos incluem contato de uma célula com um agente de RNAi, por exemplo, um agente de RNAi de fita dupla, em uma quantidade eficaz para inibir a expressão de C3 na célula, inibindo deste modo a expressão de C3 na célula.

[00531] Adicionalmente, a presente invenção fornece métodos de inibição da expressão de C9 em uma célula. Os métodos incluem contato de uma célula com um agente de RNAi, por exemplo, um agente de RNAi de fita dupla, em uma quantidade eficaz para inibir a expressão de C9 na célula, inibindo deste modo a expressão de C9 na célula.

[00532] O contato de uma célula com um agente de RNAi de fita dupla pode ser feito in vitro ou in vivo. O contato de uma célula in vivo com o agente de RNAi inclui contato de uma célula ou grupo de células dentro de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo humano, com o agente de RNAi. Combinações de métodos de contato in vitro e in vivo são também possíveis. O contato pode ser direto ou indireto, como discutido acima. Além do mais, o contato de uma célula pode ser alcançado através de um ligante de direcionamento, incluindo qualquer ligante descrito aqui ou conhecido na técnica. Em modalidades, o ligante de direcionamento é uma fração carboidrato, por exemplo, um ligante de GalNAc3, ou qualquer outro ligante que dirige o agente de RNAi a um local de interesse, por exemplo, o fígado de um indivíduo.

[00533] O termo "inibição", como usado aqui, é usado indistintamente com "redução", "silenciamento", "subregulação" e outros termos similares, e inclui qualquer nível de inibição.

[00534] A frase "inibição da expressão de um CFB" se destina a se

referir à inibição da expressão de qualquer gene CFB (tal como, por exemplo, um gene CFB de camundongo, um gene CFB de rato, um gene CFB de macaco, ou um gene CFB de humano) bem como variantes ou mutantes de um gene CFB. Assim, o gene CFB pode ser um gene CFB de tipo selvagem, um gene CFB mutante, ou um gene CFB transgênico no contexto de uma célula, grupo de células, ou organismo geneticamente manipulado.

[00535] "Inibição da expressão de um gene CFB" inclui qualquer nível de inibição de um gene CFB, por exemplo, supressão pelo menos parcial da expressão de um gene CFB. A expressão do gene CFB pode ser avaliada com base no nível, ou na mudança no nível, de qualquer variável associada à expressão do gene CFB, por exemplo, nível de mRNA de CFB, nível da proteína CFB, ou, por exemplo, atividade de CH<sub>50</sub> como uma medida do complemento hemolítico total, AH<sub>50</sub> para medir a atividade hemolítica da via alternativa do complemento, e/ou níveis de lactato desidrogenase (LDH) como uma medida da hemólise intravascular, e/ou níveis de hemoglobina. Os níveis de C3, C9, C5, C5a, C5b, e complexo C5b-9 solúvel podem ser também medidos para avaliar a expressão de CFB. A inibição pode ser avaliada por uma diminuição em um nível absoluto ou relativo de uma ou mais destas variáveis em comparação com um nível de controle. O nível de controle pode ser qualquer tipo de nível de controle que seja utilizado na área, por exemplo, um nível de referência pré-dose, ou um nível determinado a partir de um indivíduo, célula, ou amostra similar não tratado ou tratado com um controle (tal como, por exemplo, controle só de tampão ou controle de agente inativo).

[00536] A frase "inibição da expressão de um C3" se destina a se referir à inibição da expressão de qualquer gene C3 (tal como, por exemplo, um gene C3 de camundongo, um gene C3 de rato, um gene C3 de macaco, ou um gene C3 de humano) bem como variantes ou

mutantes de um gene C3. Assim, o gene C3 pode ser um gene C3 de tipo selvagem, um gene C3 mutante, ou um gene C3 transgênico no contexto de uma célula, grupo de células, ou organismo geneticamente manipulado.

[00537] "Inibição da expressão de um gene C3" inclui qualquer nível de inibição de um gene C3, por exemplo, supressão pelo menos parcial da expressão de um gene C3. A expressão do gene C3 pode ser avaliada com base no nível, ou na mudança no nível, de qualquer variável associada à expressão do gene C3, por exemplo, nível de mRNA de C3, nível da proteína C3, ou, por exemplo, atividade de CH<sub>50</sub> como uma medida do complemento hemolítico total, AH<sub>50</sub> para medir a atividade hemolítica da via alternativa do complemento, e/ou níveis de lactato desidrogenase (LDH) como uma medida da hemólise intravascular, e/ou níveis de hemoglobina. Os níveis de CFB, C9, C5, C5a, C5b, e complexo C5b-9 solúvel podem ser também medidos para avaliar a expressão de C3. A inibição pode ser avaliada por uma diminuição em um nível absoluto ou relativo de uma ou mais destas variáveis em comparação com um nível de controle. O nível de controle pode ser qualquer tipo de nível de controle que seja utilizado na área, por exemplo, um nível de referência pré-dose, ou um nível determinado a partir de um indivíduo, célula, ou amostra similar não tratado ou tratado com um controle (tal como, por exemplo, controle só de tampão ou controle de agente inativo).

[00538] A frase "inibição da expressão de um C93" se destina a se referir à inibição da expressão de qualquer gene C9 (tal como, por exemplo, um gene C9 de camundongo, um gene C9 de rato, um gene C9 de macaco, ou um gene C9 de humano) bem como variantes ou mutantes de um gene C9. Assim, o gene C9 pode ser um gene C9 de tipo selvagem, um gene C9 mutante, ou um gene C9 transgênico no contexto de uma célula, grupo de células, ou organismo geneticamente

manipulado.

[00539] "Inibição da expressão de um gene C9" inclui qualquer nível de inibição de um gene C9, por exemplo, supressão pelo menos parcial da expressão de um gene C9. A expressão do gene C9 pode ser avaliada com base no nível, ou na mudança no nível, de qualquer variável associada à expressão do gene C9, por exemplo, nível de mRNA de C9, nível da proteína C9, ou, por exemplo, atividade de CH<sub>50</sub> como uma medida do complemento hemolítico total, AH<sub>50</sub> para medir a atividade hemolítica da via alternativa do complemento, e/ou níveis de lactato desidrogenase (LDH) como uma medida da hemólise intravascular, e/ou níveis de hemoglobina. Os níveis de CFB, C3, C5, C5a, C5b, e complexo C5b-9 solúvel podem ser também medidos para avaliar a expressão de C9. A inibição pode ser avaliada por uma diminuição em um nível absoluto ou relativo de uma ou mais destas variáveis em comparação com um nível de controle. O nível de controle pode ser qualquer tipo de nível de controle que seja utilizado na área, por exemplo, um nível de referência pré-dose, ou um nível determinado a partir de um indivíduo, célula, ou amostra similar não tratado ou tratado com um controle (tal como, por exemplo, controle só de tampão ou controle de agente inativo).

[00540] Em algumas modalidades dos métodos da invenção, a expressão de um gene alvo, por exemplo, CFB, C3, ou C9, é inibida por pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 91%, pelo menos cerca de 92%, pelo menos cerca de

93%, pelo menos cerca de 94%, pelo menos cerca de 95%, pelo menos cerca de 96%, pelo menos cerca de 97%, pelo menos cerca de 98%, ou pelo menos cerca de 99%.

[00541] A inibição da expressão de um gene alvo, por exemplo, um gene CFB, C3, ou C9, pode ser manifestada por uma redução da quantidade de mRNA expressa por uma primeira célula ou grupo de células (tais células podem estar presentes, por exemplo, em uma amostra derivada de um indivíduo) no qual um gene alvo é transscrito e que foi ou foram tratado(s) (por exemplo, por contato da célula ou células com um agente de RNAi da invenção, ou por administração de um agente de RNAi da invenção a um indivíduo no qual as células estão ou estiveram presentes) tal que a expressão de um gene alvo seja inibida, em comparação com uma segunda célula ou grupo de células substancialmente idêntica à primeira célula ou grupo de células mas que não foi ou foram assim tratada(s) (célula(s) de controle). Em modalidades, a inibição é avaliada por expressão do nível de mRNA em células tratadas como uma percentagem do nível de mRNA em células de controle, usando a seguinte fórmula:

$$\frac{(\text{mRNA em células de controle}) - (\text{mRNA em células tratadas})}{(\text{mRNA em células de controle})} \cdot 100\%$$

[00542] A inibição da expressão de uma proteína do componente do complemento pode ser manifestada por uma redução no nível da proteína que é expressa por uma célula ou grupo de células (por exemplo, no nível de proteína expressa em uma amostra derivada de um indivíduo). Como explicado acima para a avaliação da supressão de mRNA, a inibição dos níveis de expressão de proteína em uma célula ou grupo de células não tratado pode ser similarmente expressa como uma percentagem do nível de proteína em uma célula ou grupo de células de controle.

[00543] Uma célula ou grupo de células de controle que pode ser

usado para avaliar a inibição da expressão de um gene alvo inclui uma célula ou grupo de células que não foi ainda contatado com um agente de RNAi da invenção. Por exemplo, a célula ou grupo de células de controle pode ser derivado de um indivíduo individual (por exemplo, um indivíduo humano ou animal) antes do tratamento do indivíduo com um agente de RNAi.

[00544] O nível de mRNA de CFB, C3, ou C9 que é expresso por uma célula ou grupo de células pode ser determinado usando qualquer método conhecido na técnica para avaliação da expressão de mRNA. Em uma modalidade, o nível de expressão de CFB, C3, e/ou C9 em uma amostra é determinado por detecção de um polinucleotídeo transcrito, ou sua porção, por exemplo mRNA do gene CFB, C3, e/ou C9. O RNA pode ser extraído de células usando técnicas de extração de RNA incluindo, por exemplo, uso de extração com fenol ácido/isotiocianato de guanidina (RNazol B; Biogenesis), estojos de preparação de RNA RNeasy (Qiagen) ou PAXgene (PreAnalytix, Suíça). Formatos de ensaio típicos utilizando hibridação de ácido ribonucleico incluem ensaios de operação nucleares, RT-PCR, ensaios de proteção RNase (Melton et al., Nuc. Acids Res. 12:7035), transferência de Northern, hibridação in situ, e análise por microrrede.

[00545] Em uma modalidade, o nível de expressão de CFB, C3, e/ou C9 é determinado usando uma sonda de ácido nucleico. O termo "sonda", como usado aqui, se refere a qualquer molécula que é capaz de se ligar seletivamente a um CFB, C3, ou C9 específico. As sondas podem ser sintetizadas por um com perícia na técnica, ou derivadas de preparações biológicas apropriadas. As sondas podem ser especificamente desenhadas para serem marcadas. Exemplos de moléculas que podem ser utilizadas como sondas incluem, mas não estão limitados a, RNA, DNA, proteínas, anticorpos, e moléculas orgânicas.

[00546] mRNA isolado pode ser usado em ensaios de hibridação ou amplificação que incluem, mas não estão limitados a, análises de Southern ou Northern, análises por reação em cadeia da polimerase (PCR) e redes de sonda. Um método para a determinação de níveis de mRNA envolve contato do mRNA isolado com uma molécula de ácido nucleico (sonda) que pode hibridar, por exemplo, hibridar especificamente com o mRNA de CFB, C3 ou C9. Em uma modalidade, o mRNA é imobilizado em uma superfície sólida e contatado com uma sonda, por exemplo por uso do mRNA isolado em um gel de agarose e transferência do mRNA do gel para uma membrana, tal como nitrocelulose. Em uma modalidade, a(s) sonda(s) são imobilizadas em uma superfície sólida e o mRNA é contatado com a(s) sonda(s), por exemplo, em uma rede de chip de genes Affymetrix. Um perito na especialidade consegue prontamente adaptar métodos conhecidos de detecção de mRNA para uso na determinação do nível de mRNA de CFB, C3, e/ou C9.

[00547] Um método alternativo para determinação do nível de expressão de CFB, C3, ou C9 em uma amostra envolve o processo de amplificação de ácido nucleico e/ou transcriptase reversa (para preparar cDNA) de por exemplo mRNA na amostra, por exemplo, por RT-PCR (a modalidade experimental apresentada em Mullis, 1987, Patente dos E.U.A. No. 4,683,202), reação em cadeia da ligase (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), replicação de sequência autossustentada (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificação transcrecional (Kwoh et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), replicação com círculo rolante (Lizardi et al., Pat. dos E.U.A. Nº. 5.854.033) ou qualquer outro método de amplificação de ácidos nucleicos, seguido pela detecção das moléculas amplificadas usando técnicas bem conhecidas daqueles com

perícia na técnica. Estes esquemas de detecção são especialmente úteis para a detecção de moléculas de ácido nucleico se tais moléculas estiverem presentes em números muito baixos. Em aspectos particulares da invenção, o nível de expressão de CFB, C3, ou C9 é determinado por RT-PCR fluorogênico quantitativo (*isto é*, o Sistema TaqMan<sup>TM</sup>).

[00548] Os níveis de expressão de mRNA de CFB, C3, e/ou C9 podem ser monitorizados usando uma transferência de membrana (tal como usada em análise de hibridação tal como Northern, Southern, dot, e similares), ou micropoços, tubos de amostra, géis, esférulas ou fibras (ou qualquer suporte sólido compreendendo ácidos nucleicos ligados). Ver Pat. dos E.U.A. N<sup>os</sup>. 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 e 5.445.934, que são incorporadas aqui por referência. A determinação do nível de expressão de PCSK9 pode também compreender uso de sondas de ácido nucleico em solução.

[00549] Em modalidades preferenciais, o nível de expressão de mRNA é avaliado usando ensaios de DNA ramificado (bDNA) ou PCR em tempo real (qPCR). O uso destes métodos é descrito e exemplificado nos Exemplos apresentados aqui.

[00550] O nível de expressão da proteína CFB, C3, e/ou C9 pode ser determinado usando qualquer método conhecido na técnica para a medição de níveis de proteína. Tais métodos incluem, por exemplo, eletroforese, eletroforese capilar, cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC), cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia por hiperdifusão, reações de precipitina de fluido ou gel, espectroscopia por absorção, um ensaio colorimétrico, ensaios espectrofotométricos, citometria de fluxo, imunodifusão (única ou dupla), imunoelétroforese, transferência de Western, radioimunoensaio (RIA), ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISAs), ensaios imunofluorescentes, ensaios eletroquimioluminescentes, e similares.

[00551] O termo "amostra" como usado aqui se refere a uma coleção de fluidos, células, ou tecidos similares isolados de um indivíduo, bem como fluidos, células, ou tecidos presentes dentro de um indivíduo. Exemplos de fluidos biológicos incluem sangue, soro e fluidos serosos, plasma, linfa, urina, fluido cerebroespinhal, saliva, fluidos oculares, e similares. Amostras de tecidos podem incluir amostras de tecidos, órgãos ou regiões localizadas. Por exemplo podem ser derivadas amostras de órgãos particulares, partes de órgãos, ou fluidos ou células dentro desses órgãos. Em certas modalidades podem ser derivadas amostras do fígado (por exemplo, fígado inteiro ou certos segmentos do fígado ou certos tipos de células no fígado, tais como, por exemplo, hepatócitos). Em modalidades preferenciais, uma "amostra derivada de um indivíduo" se refere a sangue ou plasma retirado do indivíduo. Em modalidades adicionais, uma "amostra derivada de um indivíduo" se refere a tecido do fígado derivado do indivíduo.

[00552] Em algumas modalidades dos métodos da invenção, o agente de RNAi é administrado a um indivíduo tal que o agente de RNAi seja administrado a um local específico dentro do indivíduo. A inibição da expressão de CFB, C3, e/ou C9 pode ser avaliada usando medições do nível ou mudança no nível de mRNA de CFB, C3, e/ou C9 e/ou proteína CFB, C3, e/ou C9 em uma amostra derivada de fluido ou tecido do local específico dentro do indivíduo. Em modalidades preferenciais, o local é o fígado. O local pode ser também uma subseção ou subgrupo de células de qualquer um dos locais acima mencionados. O local pode também incluir células que expressam um tipo particular de receptor.

### **VIII. Métodos para Tratamento ou Prevenção de uma Doença Associado ao Componente do Complemento**

[00553] A presente invenção fornece métodos terapêuticos e profiláticos que incluem administração a um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento, como descrito aqui,

por exemplo, PNH ou aHUS, um agente de RNAi, composições farmacêuticas compreendendo um agente de RNAi, ou vetor compreendendo um RNAi da invenção.

[00554] É para ser entendido, que qualquer dos métodos da invenção pode ser praticado com um único agente de RNAi da invenção ou uma combinação de agentes de RNAi da invenção. Por exemplo, em alguns aspectos, os métodos (e usos) da invenção incluem a utilização de um agente de RNAi se dirigindo a um gene CFB e um agente de RNAi se dirigindo a um gene C3. Em alguns aspectos, os métodos (e usos) da invenção incluem a utilização de um agente de RNAi se dirigindo a um gene CFB e um agente de RNAi se dirigindo a um gene C9. Em alguns aspectos, os métodos (e usos) da invenção incluem a utilização de um agente de RNAi se dirigindo a um gene C3 e um agente de RNAi se dirigindo a um gene C9. Em outros aspectos, os métodos (e usos) da invenção incluem a utilização de um agente de RNAi se dirigindo a um gene CFB, um agente de RNAi se dirigindo a um gene C3, e um agente de RNAi se dirigindo a um gene C9. Em alguns aspectos da invenção, os métodos que incluem quer um único agente de RNAi da invenção ou uma combinação de agentes de RNAi, incluem adicionalmente administrar ao indivíduo um ou mais agentes terapêuticos adicionais tal como, por exemplo, Soliris® (como adicionalmente descritos em baixo).

[00555] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB, por exemplo, "uma doença associada ao componente do complemento", por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos de tratamento (e usos) da invenção incluem administração ao indivíduo, por exemplo, um humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi se dirigindo a um gene CFB ou uma composição farmacêutica compreendendo um

agente de RNAi se dirigindo a um gene CFB, tratando deste modo o indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB.

[00556] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3, por exemplo, "uma doença associada ao componente do complemento", por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos de tratamento (e usos) da invenção incluem administração ao indivíduo, por exemplo, um humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de iRNA se dirigindo a um gene C3 ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de iRNA se dirigindo a um gene C3, tratando deste modo o indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3.

[00557] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9, por exemplo, "uma doença associada ao componente do complemento", por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos de tratamento (e usos) da invenção incluem administração ao indivíduo, por exemplo, um humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de iRNA se dirigindo a um gene C9 ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de iRNA se dirigindo a um gene C9, tratando deste modo o indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9.

[00558] Em um aspecto, a invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos incluem administração ao

indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, ou vetor da invenção, prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB. Por exemplo, a invenção fornece métodos para prevenção da hemólise em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00559] Em um aspecto, a invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, ou vetor da invenção, prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3. Por exemplo, a invenção fornece métodos para prevenção da hemólise em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00560] Em um aspecto, a invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, ou vetor da invenção, prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9. Por exemplo, a invenção fornece métodos

para prevenção da hemólise em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00561] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece usos de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de CFB.

[00562] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece usos de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C3.

[00563] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece usos de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C9.

[00564] Em ainda outro aspecto, a presente invenção fornece uso de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção se dirigindo a um gene CFB ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene CFB na fabricação de um medicamento para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão CFB, tal como um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00565] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece uso de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção se dirigindo a um gene C3 ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene C3 na

fabricação de um medicamento para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão C3, tal como um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00566] Em ainda um aspecto adicional, a presente invenção fornece uso de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção se dirigindo a um gene C9 ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene C9 na fabricação de um medicamento para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão C9, tal como um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00567] Em um outro aspecto, a invenção fornece usos de um RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de CFB, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00568] Em um outro aspecto, a invenção fornece usos de um RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C3, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00569] Em um outro aspecto, a invenção fornece usos de um RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção para prevenção de pelo menos

um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C9, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00570] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi da invenção na fabricação de um medicamento para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de CFB, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00571] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi da invenção na fabricação de um medicamento para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C3, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00572] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi da invenção na fabricação de um medicamento para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C9, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00573] Em alguns aspectos da invenção, os métodos que incluem quer um único agente de RNAi da invenção ou uma combinação de agentes de RNAi, incluem adicionalmente administrar ao indivíduo um ou mais agentes terapêuticos adicionais.

[00574] Em alguns aspectos, o agente terapêutico adicional é um agente RNAi se dirigindo a um gene C5, tal como descrito no Pedido de Patente Provisória dos E.U.A. Nº.: 61/782,531, depositado a 14 de março, 2013, Pedido de Patente Provisória dos E.U.A. Nº.: 61/837,3991,

depositado a 20 de junho, 2013, e Pedido de Patente Provisória dos E.U.A. Nº.: 61/904,579, depositado a 15 de novembro, 2013, os conteúdos de cada uma das quais estão neste modo incorporados aqui por referência.

[00575] Em um outro aspecto, o agente terapêutico adicional é um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao antígeno (por exemplo, eculizumab). O eculizumab é anticorpo de cadeia leve kappa, de IgG2/4 monoclonal que se liga especificamente ao componente do complemento C5 com elevada afinidade e inibe a clivagem de C5 em C5a e C5b, inibindo deste modo a geração do complexo do complemento terminal C5b-9. O eculizumab é descrito na Patente dos E.U.A. Nº. 6,355,245, os conteúdos inteiros que são incorporados aqui por referência.

[00576] Em ainda um outro aspecto, o agente terapêutico adicional é um inibidor do peptídeo C3, ou seu análogo. Em uma modalidade, o inibidor do peptídeo C3 é compstatina. Compstatina é um tridecapeptídeo cíclico com uma atividade inibidora de C3 potente e seletiva. Compstatina, e seus análogos, são descritos na Patente E.U.A. Nºs. 7.888.323, 7.989.589, e 8.442.776, na Publicação de Patente dos E.U.A. Nº. 2012/0178694 e 2013/0053302, e na Publicação PCT Nºs. WO 2012/174055, WO 2012/2178083, WO 2013/036778, os conteúdos de cada uma das quais estão incorporados aqui por referência.

[00577] Em conformidade, em um aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS, ou artrite reumatoide, que incluem administração ao indivíduo, por exemplo, um humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi se dirigindo a um gene CFB ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um

gene CFB, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igenio (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), tratando deste modo o indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB.

[00578] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS, ou artrite reumatoide, que incluem administração ao indivíduo, por exemplo, um humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi se dirigindo a um gene C3 ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene C3, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igenio (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), tratando deste modo o indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3.

[00579] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS, ou artrite reumatoide, que incluem administração ao indivíduo, por exemplo, um humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi se dirigindo a um gene C9 ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene C9, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igenio (por

exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), tratando deste modo o indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9.

[00580] Em um outro aspecto, a invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, ou vetor da invenção, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igen (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de CFB.

[00581] Em um outro aspecto, a invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, ou vetor da invenção, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igen (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no

indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C3.

[00582] Em um outro aspecto, a invenção fornece métodos de prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, ou vetor da invenção, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗原 (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão de C9.

[00583] Em outro aspecto, a presente invenção fornece usos de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗原 (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de CFB.

[00584] Em outro aspecto, a presente invenção fornece usos de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗原 (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo

ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C3.

[00585] Em outro aspecto, a presente invenção fornece usos de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗原 (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C9.

[00586] Em outro aspecto, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção se dirigindo a um gene CFB ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene CFB na fabricação de um medicamento para uso em combinação com um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento CFB, ou seu fragmento de ligação ao抗原 (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão CFB, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00587] Em outro aspecto, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção se dirigindo a um gene C3 ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene C3 na fabricação de um

medicamento para uso em combinação com um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C3, ou seu fragmento de ligação ao抗igenio (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão C3, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00588] Em outro aspecto, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção se dirigindo a um gene C9 ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene C9 na fabricação de um medicamento para uso em combinação com um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C9, ou seu fragmento de ligação ao抗igenio (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão C9, por exemplo, uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00589] Ainda em outro aspecto, a invenção fornece usos de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igenio (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução

e/ou inibição da expressão de CFB, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00590] Ainda em outro aspecto, a invenção fornece usos de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igen (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C3, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00591] Ainda em outro aspecto, a invenção fornece usos de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção, e um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igen (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C9, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00592] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi da invenção na fabricação de um medicamento para uso em combinação com um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao抗igen (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi

se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de CFB, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00593] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi da invenção na fabricação de um medicamento para uso em combinação com um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao antígeno (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C3, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00594] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi da invenção na fabricação de um medicamento para uso em combinação com um agente terapêutico adicional, tal como um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao antígeno (por exemplo, eculizumab), um agente de RNAi se dirigindo ao componente do complemento C5, e/ou um inibidor do peptídeo C3 (por exemplo, compstatina), para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão de C9, tal como uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS ou artrite reumatoide.

[00595] Em uma modalidade, um agente de RNAi se dirigindo a CFB, C3, ou C9 é administrado a um indivíduo tendo uma doença associada

ao componente do complemento descrita aqui tal que os níveis de CFB, C3 e/ou C9, por exemplo, em uma célula, tecido, sangue, urina ou outro tecido ou fluido do indivíduo sejam reduzidos em pelo menos cerca de 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos cerca de 99% ou mais e, subsequentemente, um terapêutico adicional é administrado ao indivíduo.

[00596] O terapêutico adicional pode ser um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao antígeno ou derivado. Em uma modalidade, o anticorpo anticomponente do complemento C5 é eculizumab (SOLIRIS®), ou seu fragmento de ligação ao antígeno ou derivado.

[00597] Os métodos da invenção compreendendo administração de um agente de RNAi da invenção e eculizumab a um indivíduo podem adicionalmente compreender administração de uma vacina meningocócica ao indivíduo.

[00598] O terapêutico adicional, por exemplo, eculizumab e/ou uma vacina meningocócica, pode ser administrado ao indivíduo ao mesmo tempo do agente de RNAi se dirigindo a CFB, C3, e/ou C9 (e/ou C5) ou em um momento diferente.

[00599] Além do mais, o terapêutico adicional, por exemplo, eculizumab, pode ser administrado ao indivíduo na mesma formulação como o agente de RNAi se dirigindo a CFB, C3, e/ou C9 (e/ou C5) ou em uma formulação diferente do agente de RNAi se dirigindo a CFB,

C3, e/ou C9 (e/ou C5).

[00600] Regimes de dosagem de eculizumab são descritos, por exemplo, na bula de produto para eculizumab (SOLIRIS®) e Pedido de Patente dos E.U.A. Nº. 2012/0225056, os conteúdos inteiros de cada um dos quais são incorporados aqui por referência. Em exemplos de métodos da invenção para tratamento de uma doença associada ao componente do complemento, por exemplo, PNH, aHUS, ou artrite reumatoide, um agente de RNAi se dirigindo a, por exemplo, CFB, C3, ou C9, é administrado (por exemplo, subcutaneamente) ao indivíduo primeiramente, tal que os níveis de C5 no indivíduo sejam reduzidos (por exemplo, por pelo menos cerca de 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos cerca de 99% ou mais) e subsequentemente eculizumab é administrado a doses menores do que aquelas descritas na bula de produto para SOLIRIS®. Por exemplo, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo semanalmente a uma dose menor do que cerca de 600 mg durante 4 semanas seguida por uma quinta dose a cerca de uma semana mais tarde de menos do que cerca de 900 mg, seguida por uma dose menor do que cerca de 900 mg a cerca de cada duas semanas subsequentemente. O eculizumab pode ser também administrado ao indivíduo semanalmente a uma dose menor do que cerca de 900 mg durante 4 semanas seguida por uma quinta dose a cerca de uma semana mais tarde de menos do que cerca de 1200 mg, seguida por uma dose menor do que cerca de 1200 mg a cerca de cada duas semanas subsequentemente. Se o indivíduo tiver menos do que

18 anos de idade, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo semanalmente a uma dose menor do que cerca de 900 mg durante 4 semanas seguido por uma quinta dose a cerca de uma semana mais tarde de menos do que cerca de 1200 mg, seguido por uma dose menor do que cerca de 1200 mg cerca de a cada duas semanas subsequentemente; ou, se o indivíduo tiver menos do que 18 anos de idade, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo semanalmente a uma dose menor do que cerca de 600 mg durante 2 semanas seguido por uma terceira dose a cerca de uma semana mais tarde de menos do que cerca de 900 mg, seguido por uma dose menor do que cerca de 900 mg cerca de a cada duas semanas subsequentemente; ou, se o indivíduo tiver menos do que 18 anos de idade, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo semanalmente a uma dose menor do que cerca de 600 mg durante duas semanas seguido por uma terceira dose a cerca de uma semana mais tarde de menos do que cerca de 600 mg, seguido por uma dose menor do que cerca de 600 mg cerca de a cada duas semanas subsequentemente; ou, se o indivíduo tiver menos do que 18 anos de idade, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo semanalmente a uma dose menor do que cerca de 600 mg durante uma semana seguido por uma segunda dose a cerca de uma semana mais tarde de menos do que cerca de 300 mg, seguido por uma dose menor do que cerca de 300 mg cerca de a cada duas semanas subsequentemente; ou, se o indivíduo tiver menos do que 18 anos de idade, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo semanalmente a uma dose menor do que cerca de 300 mg durante uma semana seguido por uma segunda dose a cerca de uma semana mais tarde de menos do que cerca de 300 mg, seguido por uma dose menor do que cerca de 300 mg cerca de a cada duas semanas subsequentemente. Se o indivíduo está recebendo plasmaferese ou troca de plasma, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo a uma dose menor do

que cerca de 300 mg (por exemplo, se a dose mais recente de eculizumab tiver sido cerca de 300 mg) ou menor do que cerca de 600 mg (por exemplo, se a dose mais recente de eculizumab tiver sido cerca de 600 mg ou mais). Se o indivíduo está recebendo infusão de plasma, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo a uma dose menor do que cerca de 300 mg (por exemplo, se a dose mais recente de eculizumab tiver sido cerca de 300 mg ou mais). As doses menores de eculizumab permitem administração subcutânea ou intravenosa do eculizumab.

[00601] Nas terapias de combinação da presente invenção compreendendo eculizumab, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo, por exemplo, subcutaneamente, a uma dose de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, ou cerca de 5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, ou cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg. Por exemplo, o eculizumab pode ser administrado ao indivíduo, por exemplo, subcutaneamente, a uma dose de cerca de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9 mg/kg, 9,5 mg/kg, 10 mg/kg, 10,5 mg/kg, 11 mg/kg, 11,5 mg/kg, 12 mg/kg, 12,5 mg/kg, 13 mg/kg, 13,5 mg/kg, 14 mg/kg, 14,5 mg/kg, ou 15 mg/kg.

[00602] Os métodos e usos da invenção incluem administração de uma composição descrita aqui tal que a expressão do gene alvo CFB, C3 e/ou C9 (e/ou C5) seja diminuída, tal como durante cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 ou cerca de 80 horas. Em uma modalidade, a expressão do gene alvo é diminuída durante um período prolongado, por exemplo, pelo menos cerca de dois, três, quatro, cinco, seis, sete dias ou mais, por exemplo, cerca de uma semana, duas semanas, três semanas, ou cerca de quatro semanas ou mais.

[00603] A administração do dsRNA de acordo com os métodos e

usos da invenção pode resultar em uma redução da gravidade, sinais, sintomas, e/ou marcadores de tais doenças ou distúrbios em um paciente com uma doença associada ao componente do complemento. Por "redução" em este contexto se significa uma diminuição estatisticamente significativa em tal nível. A redução pode ser, por exemplo, pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou cerca de 100%.

[00604] A eficácia do tratamento ou prevenção de doença pode ser avaliada, por exemplo por medição da progressão da doença, remissão da doença, gravidade de sintomas, redução na dor, qualidade de vida, dose de uma medicação requerida para sustar um efeito do tratamento, nível de um marcador de doença ou qualquer outro parâmetro mensurável apropriado para uma dada doença sendo tratada ou dirigida para prevenção. Está bem dentro da capacidade de um perito na técnica monitorizar a eficácia do tratamento ou prevenção por medição de qualquer um de tais parâmetros, ou qualquer combinação de parâmetros. Por exemplo, a eficácia do tratamento de um distúrbio da hemólise pode ser avaliada, por exemplo, por monitorização periódica dos níveis de LDH e CH50. Comparações das últimas leituras com as leituras iniciais proporcionam a um médico uma indicação de se o tratamento é eficaz. Está bem dentro da capacidade de um perito na técnica monitorizar a eficácia do tratamento ou prevenção por medição de qualquer um de tais parâmetros, ou qualquer combinação de parâmetros. Em conexão com a administração de um RNAi se dirigindo a CFB, C3, e/ou C9 ou sua composição farmacêutica, "eficaz contra" uma doença associada ao componente do complemento indica que a administração de um modo clinicamente apropriado resulta em um efeito benéfico para pelo menos uma fração estatisticamente significativa de pacientes, tal como melhoria de sintomas, uma cura,

uma redução na doença, extensão da vida, melhoria na qualidade de vida, ou outro efeito geralmente reconhecido como positivo por médicos familiarizados com o tratamento de uma doença associada ao componente do complemento e das causas relacionadas.

[00605] Um efeito de tratamento ou preventivo é evidente quando existe uma melhoria estatisticamente significativa em um ou mais parâmetros do estado de doença, ou por uma ausência do agravamento ou do desenvolvimento de sintomas onde seriam de outro modo antecipados. Como um exemplo, uma alteração favorável de pelo menos 10% em um parâmetro mensurável de doença, e preferencialmente pelo menos 20%, 30%, 40%, 50% ou mais, pode ser indicativa de tratamento eficaz. A eficácia de um dado fármaco de iRNA ou formulação desse fármaco pode ser também avaliada usando um modelo animal experimental para a dada doença como conhecido na técnica. Quando se usa um modelo animal experimental, a eficácia do tratamento é evidenciada quando é observada uma redução estatisticamente significativa em um marcador ou sintoma.

[00606] Alternativamente, a eficácia pode ser medida por uma redução na gravidade da doença como determinado por um perito na técnica de diagnóstico com base em uma escala de graduação da gravidade de doença clinicamente aceite, somente como um exemplo a Escala de Gravidade da Artrite Reumatoide (RASS). Qualquer mudança positiva resultando em, por exemplo, atenuação da gravidade de doença medida usando a escala apropriada, representa tratamento adequado usando um iRNA ou formulação de iRNA como descrito aqui.

[00607] Pode ser administrada ao indivíduo uma quantidade terapêutica de iRNA, tal como cerca de 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,85

mg/kg, 0,9 mg/kg, 0,95 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,1 mg/kg, 2,2 mg/kg, 2,3 mg/kg, 2,4 mg/kg, 2,5 mg/kg de dsRNA, 2,6 mg/kg de dsRNA, 2,7 mg/kg de dsRNA, 2,8 mg/kg de dsRNA, 2,9 mg/kg de dsRNA, 3,0 mg/kg de dsRNA, 3,1 mg/kg de dsRNA, 3,2 mg/kg de dsRNA, 3,3 mg/kg de dsRNA, 3,4 mg/kg de dsRNA, 3,5 mg/kg de dsRNA, 3,6 mg/kg de dsRNA, 3,7 mg/kg de dsRNA, 3,8 mg/kg de dsRNA, 3,9 mg/kg de dsRNA, 4,0 mg/kg de dsRNA, 4,1 mg/kg de dsRNA, 4,2 mg/kg de dsRNA, 4,3 mg/kg de dsRNA, 4,4 mg/kg de dsRNA, 4,5 mg/kg de dsRNA, 4,6 mg/kg de dsRNA, 4,7 mg/kg de dsRNA, 4,8 mg/kg de dsRNA, 4,9 mg/kg de dsRNA, 5,0 mg/kg de dsRNA, 5,1 mg/kg de dsRNA, 5,2 mg/kg de dsRNA, 5,3 mg/kg de dsRNA, 5,4 mg/kg de dsRNA, 5,5 mg/kg de dsRNA, 5,6 mg/kg de dsRNA, 5,7 mg/kg de dsRNA, 5,8 mg/kg de dsRNA, 5,9 mg/kg de dsRNA, 6,0 mg/kg de dsRNA, 6,1 mg/kg de dsRNA, 6,2 mg/kg de dsRNA, 6,3 mg/kg de dsRNA, 6,4 mg/kg de dsRNA, 6,5 mg/kg de dsRNA, 6,6 mg/kg de dsRNA, 6,7 mg/kg de dsRNA, 6,8 mg/kg de dsRNA, 6,9 mg/kg de dsRNA, 7,0 mg/kg de dsRNA, 7,1 mg/kg de dsRNA, 7,2 mg/kg de dsRNA, 7,3 mg/kg de dsRNA, 7,4 mg/kg de dsRNA, 7,5 mg/kg de dsRNA, 7,6 mg/kg de dsRNA, 7,7 mg/kg de dsRNA, 7,8 mg/kg de dsRNA, 7,9 mg/kg de dsRNA, 8,0 mg/kg de dsRNA, 8,1 mg/kg de dsRNA, 8,2 mg/kg de dsRNA, 8,3 mg/kg de dsRNA, 8,4 mg/kg de dsRNA, 8,5 mg/kg de dsRNA, 8,6 mg/kg de dsRNA, 8,7 mg/kg de dsRNA, 8,8 mg/kg de dsRNA, 8,9 mg/kg de dsRNA, 9,0 mg/kg de dsRNA, 9,1 mg/kg de dsRNA, 9,2 mg/kg de dsRNA, 9,3 mg/kg de dsRNA, 9,4 mg/kg de dsRNA, 9,5 mg/kg de dsRNA, 9,6 mg/kg de dsRNA, 9,7 mg/kg de dsRNA, 9,8 mg/kg de dsRNA, 9,9 mg/kg de dsRNA, 9,0 mg/kg de dsRNA, 10 mg/kg de dsRNA, 15 mg/kg de dsRNA, 20 mg/kg de dsRNA, 25 mg/kg de dsRNA, 30 mg/kg de dsRNA, 35 mg/kg de dsRNA, 40

mg/kg de dsRNA, 45 mg/kg de dsRNA, ou cerca de 50 mg/kg de dsRNA. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00608] Em certas modalidades, por exemplo, quando uma composição da invenção compreende um dsRNA como descrito aqui e um lípido, pode ser administrada aos indivíduos uma quantidade terapêutica de iRNA, tal como cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,4 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,4 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 3 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 3 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 3,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 5,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 6,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 7 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 7,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 8 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 8,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 9 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, ou cerca de 9,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00609] Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, ou cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00610] Em outras modalidades, por exemplo, quando uma composição da invenção compreende um dsRNA como descrito aqui e uma N-acetilgalactosamina, pode ser administrada aos indivíduos uma quantidade terapêutica de iRNA, tal como uma dose de cerca de 0,1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 45 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 45

mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 20

mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 20 mg/kg, ou cerca de 15 a cerca de 20 mg/kg. Em uma modalidades, quando uma composição da invenção compreende um dsRNA como descrito aqui e uma N-acetilgalactosamina, pode ser administrada aos indivíduos uma quantidade terapêutica de cerca de 10 a cerca de 30 mg/kg de dsRNA. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00611] Por exemplo, pode ser administrada aos indivíduos em uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou cerca de 50 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00612] Em certas modalidades da invenção, por exemplo, quando um agente de RNAi de fita dupla inclui uma modificação (por exemplo, um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos), incluindo um tal motivo no ou perto do local de clivagem do agente, seis ligações fosforotioato, e um ligante, tal agente é administrado a uma dose de cerca de 0,01 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca

de 0,01 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, sobre 0,01 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, ou cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg. Valores e gamas intermédios dos recitados valores anteriores também pretendem ser parte da presente invenção, por exemplo, o agente de RNAi pode ser administrado ao indivíduo a uma dose de cerca de 0,015 mg/kg a cerca de 0,45 mg/mg.

[00613] Por exemplo, o agente de RNAi, por exemplo o agente de RNAi em uma composição farmacêutica pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,01 mg/kg, 0,0125 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,0175 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,0225 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,0275 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,0325 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,0375 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,0425 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,0475 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,0525 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,0575 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,0625 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,0675 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,0725 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,0775 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,0825 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,0875 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,0925 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,0975 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,125 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,175 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, ou cerca de 0,5 mg/kg. É também pretendido que valores intermédios aos valores anteriormente listados sejam parte desta invenção.

[00614] O iRNA pode ser administrado por infusão intravenosa ao longo de um período de tempo, tal como ao longo de um período de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou cerca de 25 minutos. A administração pode ser repetida, por exemplo, em uma base regular, tal como bissemanalmente (isto é, a cada duas semanas) durante um mês, dois meses, três meses, quatro meses ou mais. Após um regime de tratamento inicial, os tratamentos podem ser administrados em uma base menos frequente. Por exemplo, após administração semanal ou bissemanal durante três meses, a administração pode ser repetida uma vez por mês, durante seis meses ou um ano ou mais.

[00615] A administração do RNAi pode reduzir os níveis de CFB, C3, e/ou C9 (e/ou C5), por exemplo, em uma célula, tecido, sangue, urina ou outro compartimento do paciente em pelo menos cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%,

20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos cerca de 99% ou mais.

[00616] Antes da administração de uma dose completa do iRNA pode ser administrada ao paciente uma dose mais pequena, tal como uma infusão a 5%, e estes monitorizados quanto a efeitos adversos, tais como uma reação alérgica. Em outro exemplo, o paciente pode ser monitorizado quanto a efeitos imunoestimuladores indesejados, tais como níveis de citocinas (por exemplo, TNF-alfa ou INF-alfa) aumentados.

[00617] Devido aos efeitos inibidores na expressão de CFB, C3, e/ou C9 uma composição de acordo com a invenção ou uma composição farmacêutica preparada a partir dela pode intensificar a qualidade de vida.

[00618] Um iRNA da invenção pode ser administrado em forma "nua", ou como um "iRNA livre". Um iRNA nu é administrado na ausência de uma composição farmacêutica. O iRNA nu pode estar em uma solução tampão adequada. A solução tampão pode compreender acetato, citrato, prolamina, carbonato, ou fosfato, ou qualquer sua combinação. Em uma modalidade, a solução tampão é salino tamponado com fosfato (PBS). O pH e osmolaridade da solução tampão contendo o iRNA podem ser ajustados tal que a solução seja adequada para administração a um indivíduo.

[00619] Alternativamente, um iRNA da invenção pode ser administrado como uma composição farmacêutica, tal como uma

formulação lipossomal de dsRNA.

[00620] Os indivíduos que beneficiariam de uma redução e/ou inibição da expressão do gene CFB, C3, e/ou C9 são aqueles tendo uma doença ou distúrbio associado ao componente do complemento como descrito aqui. Em uma modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem hemoglobinúria paroxística noturna (PNH). Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem asma. Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem artrite reumatoide. Ainda em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem lúpus eritematoso sistêmico. Em uma modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem glomerulonefrite. Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem psoríase. Ainda em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem dermatomiosite penfigoide bolhoso. Em uma modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem síndrome urêmica hemolítica atípica. Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem síndrome urêmica hemolítica relacionada com toxina Shiga de *E. coli*. Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem miastenia grave. Ainda em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem neuromielite ótica. Em uma modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem doença do depósito denso. Em uma modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem neuropatia C3. Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem

degeneração macular relacionada com a idade. Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem doença da aglutinina fria. Em um modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem vasculite associada a anticorpos citoplasmáticos antineutrófilos. Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem rejeição de transplante humorar e vascular. Em uma modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem disfunção de enxerto. Em uma modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento teve um infarto do miocárdio. Em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento é um recipiente sensibilizado de um transplante. Ainda em outra modalidade, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento tem sepsia.

[00621] O tratamento de um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão do gene CFB, C3, e/ou C9 inclui tratamento terapêutico e profilático (por exemplo, o indivíduo será submetido a tratamento por cirurgia de transplante sensibilizado (ou alogênica)).

[00622] A invenção fornece adicionalmente métodos e usos de um agente de RNAi ou uma sua composição farmacêutica (incluindo métodos e usos de um agente de RNAi ou uma sua composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi e um agente terapêutico adicional, por exemplo um anticorpo anticomponente do complemento C5, ou seu fragmento de ligação ao antígeno) para tratamento de um indivíduo que beneficiaria de redução e/ou inibição da expressão de um gene alvo da invenção, por exemplo, expressão de CFB, C3, e C9, por exemplo, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento, em combinação com outros

farmacêuticos e/ou outros métodos terapêuticos, por exemplo, com farmacêuticos conhecidos e/ou métodos terapêuticos conhecidos, tais como, por exemplo, aqueles que são correntemente empregues para o tratamento destes distúrbios. Por exemplo, em certas modalidades, um RNAi se dirigindo a CFB é administrado em combinação com, por exemplo, um agente útil no tratamento de uma doença associada ao componente do complemento, como descrito aqui em outro local.

[00623] Por exemplo, terapêuticos e métodos terapêuticos adicionais adequados para tratamento de um indivíduo que beneficiaria de redução na expressão de CFB, C3, e/ou C9, por exemplo, um indivíduo tendo uma doença associada ao componente do complemento, incluem plasmaforese, terapia trombolítica (por exemplo, estreptocinase), agentes antiplaquetários, ácido fólico, corticoesteroides; agentes imunossupressores; estrogênios, metotrexato, 6-MP, azatioprina, sulfasalazina, mesalazina, olsalazina, cloroquinina/hidroxicloroquina, pencilamina, aurotiomalato (intramuscular e oral), azatioprina, colchicina, corticoesteroides (oral, inalados e injeção local), agonistas de adrenorreceptores beta-2 (salbutamol, terbutalina, salmeterol), xantinas (teofilina, aminofilina), cromoglicato, nedocromil, cetotifeno, ipratrópio e oxitrópico, ciclosporina, FK506, rapamicina, micofenolato mofetil, leflunomida, NSAIDs, por exemplo, ibuprofeno, corticoesteroides tais como prednisolona, inibidores de fosfodiesterase, agonistas de adenosina, agentes antitrombóticos, inibidores do complemento, agentes adrenérgicos, agentes que interferem com a sinalização por citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  ou IL-1 (por exemplo, inibidores de IRAK, NIK, IKK, p38 ou MAP cinase), inibidores da enzima de conversão de IL-1 $\beta$ , inibidores da enzima de conversão de TNF $\alpha$  (TACE), inibidores da sinalização de células T, tais como inibidores de cinase, inibidores de metaloproteinase, sulfassalazina, azatioprina, 6-mercaptopurinas, inibidores da enzima de conversão de angiotensina, receptores de

citocina solúveis e seus derivados (por exemplo, receptores de TNF p55 ou p75 solúveis e os derivados p75TNFRIG (EnbrelTM e p55TNFRIG (Lenercept)), sIL-1RI, sIL-1RII, e sIL-6R), citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 e TGF $\beta$ ), celecoxibe, ácido fólico, sulfato de hidroxicloroquina, rofecoxibe, etanercepte, anticorpo monoclonal infliximabe, naproxeno, valdecoxibe, sulfassalazina, metilprednisolona, meloxicam, acetato de metilprednisolona, tiomalato de sódio de ouro, aspirina, acetonida de triamcinolona, napsolato de propoxifeno/apap, folato, nabumetona, diclofenac, piroxicam, etodolac, diclofenac de sódio, oxaprozina, hidrocloreto de oxicodona, bitartarato de hidrocodona/apap, diclofenac de sódio/misoprostol, fentanil, anakinra, recombinante humano, hidrocloreto de tramadol, salsalato, sulindac, cianocobalamina/ácido fólico/piridoxina, acetaminofen, alendronato de sódio, prednisolona, sulfato de morfina, hidrocloreto de lidocaína, indometacina, sulfato de glucosamina/condroitina, hidrocloreto de amitriptilina, sulfadiazina, hidrocloreto de oxicodona/acetaminofeno, hidrocloreto de olopatadina, misoprostol, naproxeno de sódio, omeprazol, ciclofosfamida, anticorpo monoclonal orituxi, IL-1 TRAP, MRA, CTLA4-IG, IL-18 BP, anti-IL-18, Anti-IL15, BIRB-796, SCIO-469, VX-702, AMG-548, VX-740, Roflumilast, IC-485, CDC-801, Mesopram, ciclosporina, fármaco(s) anti-inflamatório(s) supressor(es) de citocina (CSAIDs); CDP-571/BAY-10-3356 (anticorpo anti-TNF $\alpha$  humanizado; Celltech/Bayer); anticorpo cA2/monoclonal infliximabe (anticorpo anti-TNF $\alpha$  quimérico; Centocor); TNFR-IgG/etanercept de 75 kD (proteína de fusão receptor de TNF-IgG de 75 kD; Immunex; ver, por exemplo, (1994) Arthr. Rheum. 37: S295; (1996) J. Invest. Med. 44: 235A); TNF-IgG de 55 kD (proteína de fusão receptor de TNF-IgG de 55 kD; Hoffmann-LaRoche); IDEC-CE9.1/SB 210396 (anticorpo anti-CD4 primatizado não esgotante; IDEC/SmithKline; ver, por exemplo, (1995) Arthr. Rheum. 38: S185); DAB 486-IL-2 e/ou DAB 389-IL-2 (proteínas de fusão de IL-2; Seragen; ver,

por exemplo, (1993) Arthrit. Rheum. 36: 1223); Anti-Tac (anti-IL-2Ra humanizado; Protein Design Labs/Roche); IL-4 (citocina anti-inflamatória; DNAX/Schering); IL-10 (SCH 52000; IL-10 recombinante, citocina anti-inflamatória; DNAX/Schering); IL-4; agonistas de IL-10 e/ou IL-4 (por exemplo, anticorpos agonistas); IL-1RA (antagonista de receptores de IL-1; Synergen/Amgen); anakinra (Kineret®/Amgen); TNF-bp/s-TNF (proteína de ligação a TNF solúvel; ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento)): S284; (1995) Amer. J. Physiol. - Heart and Circ. Physiol. 268: 37-42); R973401 (inibidor do Tipo IV de fosfodiesterase; ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S282); MK-966 (Inibidor de COX-2; ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S81); Iloprost (ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S82); metotrexato; talidomida (ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S282) e fármacos relacionados com talidomida (por exemplo, Celgen); leflunomida (inibidor anti-inflamatório e de citocina; ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S131; (1996) Inflamm. Res. 45: 103-107); ácido tranexâmico (inibidor da ativação de plasminogênio; ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S284); T-614 (inibidor de citocina; ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S282); prostaglandina E1 (ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S282); Tenidap (fármaco anti-inflamatório não esteroide; ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S280); Naproxeno (fármaco anti-inflamatório não esteroide; ver, por exemplo, (1996) Neuro. Report 7: 1209-1213); Meloxicam (fármaco anti-inflamatório não esteroide); Ibuprofeno (fármaco anti-inflamatório não esteroide); Piroxicam (fármaco anti-inflamatório não esteroide); Diclofenac (fármaco anti-inflamatório não esteroide); Indometacina (fármaco anti-inflamatório não esteroide); Sulfassalazina (ver, por exemplo, (1996) Arthr. Rheum. 39(9 (suplemento): S281); Azatioprina

(ver, por exemplo, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (suplemento): S281); inibidor de ICE (inibidor da enzima de conversão da enzima interleucina-1 $\beta$ ); inibidor de zap-70 e/ou lck (inibidor da tirosina cinase zap-70 ou lck); inibidor de VEGF e/ou inibidor de VEGF-R (inibidores do fator de crescimento celular endotelial vascular ou receptor do fator de crescimento celular endotelial vascular; inibidores da angiogênese); fármacos anti-inflamatórios corticoesteroides (por exemplo, SB203580); inibidores de TNF-convertase; anticorpos anti-IL-12; anticorpos anti-IL-18; interleucina-11 (ver, por exemplo, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (suplemento): S296); interleucina-13 (ver, por exemplo, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (suplemento): S308); inibidores de interleucina-17 (ver, por exemplo, (1996) *Arthr. Rheum.* 39(9 (suplemento): S120); ouro; penicilamina; cloroquina; clorambucil; hidroxicloroquina; ciclosporina; ciclofosfamida; irradiação linfoide total; globulina anti-timócito; anticorpos anti-CD4; toxinas de CD5; peptídeos e colagênio oralmente administrados; lobenzarit dissódico; Agentes Reguladores da Citocina (CRAs) HP228 e HP466 (Houghten Pharmaceuticals, Inc.); oligodesoxinucleotídeos de fosforotioato antissenso ICAM-1 (ISIS 2302; Isis Pharmaceuticals, Inc.); receptor do complemento solúvel 1 (TP10; T Cell Sciences, Inc.); prednisona; orgoteína; polissulfato de glicosaminoglicana; minociclina; anticorpos anti-IL2R; lípidos marinhos e botânicos (ácidos graxos de peixe e sementes de planta; ver, por exemplo, DeLuca et al. (1995) *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 21: 759-777); auranofina; fenilbutazona; ácido meclofenâmico; ácido flufenâmico; globulina imune intravenosa; zileuton; azaribina; ácido micofenólico (RS-61443); tacrolimus (FK-506); sirolimus (rapamicina); amiprilose (terafectina); cladribina (2-clorodeoxiadenosina); metotrexato; inibidores de bcl-2 (ver Bruncko, M. et al. (2007) *J. Med. Chem.* 50(4): 641-662); agentes antivirais e imunomoduladores, inibidor de molécula pequena de KDR, inibidor de molécula pequena de Tie-2; metotrexato; prednisona;

celecoxibe; ácido fólico; sulfato de hidroxicloroquina; rofecoxibe; etanercept; anticorpo monoclonal infliximabe; leflunomida; naproxeno; valdecoxibe; sulfassalazina; metilprednisolona; ibuprofeno; meloxicam; acetato de metilprednisolona; tiomalato de sódio de ouro; aspirina; azatioprina; acetonida de triamcinolona; napsilato de propoxifeno/apap; folato; nabumetona; diclofenac; piroxicam; etodolac; diclofenac de sódio; oxaprozina; oxicodona hcl; bitartarato de hidrocodona/apap; diclofenac de sódio/misoprostol; fentanil; anakinra, recombinante humano; tramadol hcl; salsalato; sulindac; cianocobalamina/fa/piridoxina; acetaminofen; alendronato de sódio; prednisolona; sulfato de morfina; hidrocloreto de lidocaína; indometacina; sulfato de glucosamina/condroitina; ciclosporina; hidrocloreto de amitriptilina; sulfadiazina; oxicodona hcl/acetaminofen; olopatadina hcl; misoprostol; naproxeno de sódio; omeprazol; micofenolato mofetil; ciclofosfamida; anticorpo monoclonal rituxi; IL-1 TRAP; MRA; CTLA4-IG; IL-18 BP; IL-12/23; anti-IL 18; anti-IL 15; BIRB-796; SCIO-469; VX-702; AMG-548; VX-740; Roflumilast; IC-485; CDC-801; mesopram, albuterol, salmeterol/fluticasona, montelukast de sódio, propionato de fluticasona, budesonida, prednisona, xinafoato de salmeterol, levalbuterol hcl, sulfato de albuterol/ipratrópio, fosfato de sódio prednisolona, acetonida de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, brometo de ipratrópio, azitromicina, acetato de pirbuterol, prednisolona, teofilina anidra, succinato de sódio de metilprednisolona, claritromicina, zafirlukast, fumarato de formoterol, vacina contra o vírus da gripe, metilprednisolona, amoxicilina triidratada, flunisolida, injeção contra alergias, cromolin de sódio, hidrocloreto de fexofenadina, flunisolida/mentol, amoxicilina/clavulanato, levofloxacina, dispositivo inalador de assistência, guaifenesina, fosfato de sódio de dexametasona, moxifloxacina hcl, hclato de doxiciclina, guaifenesina/d-metorfán, p-efedrina/cod/clorfenir, gatifloxacina, hidrocloreto de cetirizina, furoato de mometasona, xinafoato de salmeterol, benzonatato,

cefalexina, pe/hidrocodona/clorfenir, cetirizina hcl/pseudoefed, fenilefrina/cod/prometazina, codeína/prometazina, cefprozil, dexametasona, guaifenesina/pseudoefedrina, clorfeniramina/hidrocodona, nedocromil de sódio, sulfato de terbutalina, epinefrina, metilprednisolona, sulfato de metaproterenol, aspirina, nitroglicerina, tartarato de metoprolol, enoxaparina de sódio, heparina de sódio, bissulfato de clopidogrel, carvedilol, atenolol, sulfato de morfina, succinato de metoprolol, warfarina de sódio, lisinopril, mononitrato de isosorbídeo, digoxina, furosemida, simvastatina, ramipril, tenecteplase, maleato de enalapril, torsemida, retavase, losartan de potássio, quinapril hcl/mag carb, bumetanida, alteplase, enalaprilat, hidrocloreto de amiodarona, tirofiban hcl m-hidratado, hidrocloreto de diltiazem, captoril, irbesartan, valsartan, hidrocloreto de propranolol, fosinopril de sódio, hidrocloreto de lidocaína, eptifibatida, cefazolina de sódio, sulfato de atropina, ácido aminocaproico, espironolactona, interferon, hidrocloreto de sotalol, cloreto de potássio, docusato de sódio, dobutamina hcl, alprazolam, pravastatina de sódio, atorvastatina de cálcio, hidrocloreto de midazolam, hidrocloreto de meperidina, dinitrato de isosorbídeo, epinefrina, hidrocloreto de dopamina, bivalirudina, rosuvastatina, ezetimiba/simvastatina, avasimiba, e cariporida.

[00624] O agente de iRNA (e/ou um anticorpo anticomponente do complemento C5) e um agente terapêutico e/ou tratamento adicional podem ser administrados ao mesmo tempo e/ou na mesma combinação, por exemplo, parenteralmente, ou o agente terapêutico adicional pode ser administrado como parte de uma composição separada ou em momentos separados e/ou por outro método conhecido na técnica ou descrito aqui.

[00625] A não ser que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comummente entendido por um com perícia ordinária na técnica à qual

esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste dos iRNAs e métodos apresentados na invenção, métodos e materiais adequados são descritos em baixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes, e outras referências mencionadas aqui são incorporados por referência na sua totalidade. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo definições, controlará. Adicionalmente, os materiais, métodos, e exemplos são somente ilustrativos e não se destinam a ser limitantes.

## **EXEMPLOS**

### **Exemplo 1. Síntese de iRNA**

#### ***Fonte de reagentes***

[00626] Onde a fonte de um reagente não for especificamente dada aqui, tal reagente pode ser obtido de qualquer fornecedor de reagentes para biologia molecular a um padrão de qualidade/pureza para aplicação em biologia molecular.

#### ***Transcritos***

[00627] O desenho de siRNA foi levado a cabo para identificar siRNAs se dirigindo a transcritos de humano (*Homo sapiens*), macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*; daqui em diante "cyno"), camundongo (*Mus musculus*), e rato (*Rattus norvegicus*). Em geral, o desenho de duplexes utilizou transcritos de humano, camundongo, e rato da coleção RefSeq do NCBI, anotados na base de dados Gene do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). Para cyno, o desenho utilizou quer transcritos descarregados do projeto do genoma de *M. fascicularis* (<http://macaque.genomics.org.cn/page/species/download.jsp>) e/ou transcritos obtidos de uma biblioteca de cDNA derivada de fígado.

[00628] O desenho de siRNAs CFB usou os seguintes transcritos da coleção RefSeq do NCBI: Humano - NM\_001710; Cyno (do projeto do genoma de *M. fascicularis*) - ENSMMUP00000000985

(locus=scaffold3881:47830:53620); Camundongo - NM\_001142706 e NM\_008198; e Rato – NM\_212466.3.

[00629] O desenho de siRNAs C3 usou os seguintes transcritos da coleção RefSeq do NCBI: Humano - NM\_000064; Cyno (do projeto do genoma de *M. fascicularis*) - ENSP00000245907 (locus=chr19:6921416:6963034); Camundongo - NM\_009778; e Rato – NM\_016994

[00630] O desenho de siRNAs C9 usou os seguintes transcritos da coleção RefSeq do NCBI: Humano - NM\_001737; Cyno (de biblioteca de cDNA de fígado) - isotig05361; Camundongo - NM\_013485; E Rato – NM\_057146.

[00631] Os dúplexes de siRNA foram desenhados em vários lotes separados, incluindo mas não se limitando a lotes contendo dúplexes correspondendo somente a transcritos de humano; transcritos de humano e cyno; transcritos de humano, cyno e camundongo; e transcritos de humano, cyno, camundongo e rato. A maioria dos dúplexes de siRNA foram desenhados de modo a partilharem 100% de identidade com o transrito de humano e transcritos de outras espécies listados considerados em cada lote de projeto (acima). Em alguns casos, no entanto, quando o par de bases complementar com fita antissenso:mRNA alvo era um par GC ou CG, os dúplexes de siRNA foram desenhados com não correspondências entre o duplex e o alvo de mRNA na primeira posição antissenso (última senso) (ver, por exemplo, Tabela 5, os oligos com marcações G21U, G21a, C21A, G21a). Em estes casos, foram desenhados dúplexes com pares de base UA ou AU no par primeiro antissenso:último senso. Assim, os dúplexes mantiveram a complementaridade mas tinham não correspondências em relação ao alvo (U:C, U:G, A:C, ou A:G).

### ***Desenho, Especificidade, e Previsão da Eficácia de siRNA***

[00632] A especificidade prevista de todos os possíveis 19meros foi

prevista a partir de cada sequência. Foram depois selecionados os 19meros candidatos que não tinham repetições mais longas do que 7 nucleotídeos.

[00633] Os seguintes conjuntos de siRNAs candidatos foram usados em pesquisas abrangentes contra os transcritomas apropriados (definidos como o conjunto de registros NM\_ e XM\_ dentro dos conjuntos Refseq de humano, camundongo, ou rato do NCBI, e o conjunto de transcritoma de cyno do NCBI de nucleotídeos) usando um algoritmo "de força bruta" abrangente implementado no script Python "BruteForce.py".

[00634] C3: 46 humano/cyno/camundongo/rato, 80 humano/cyno/camundongo, 2384 humano/cyno.

[00635] C9: 7 humano/cyno/camundongo/rato, 12 humano/cyno/camundongo, 816 humano/cyno.

[00636] CFB: 23 humano/cyno/camundongo, 1232 humano/cyno.

[00637] O script analisou de seguida os alinhamentos transrito-oligo para gerar uma pontuação baseada na posição e número de não correspondências entre o siRNA e qualquer transrito potencial "fora do alvo". A pontuação fora do alvo é ponderada para enfatizar diferenças na região de "semente" de siRNAs, nas posições 2-9 a partir da extremidade 5' da molécula.

[00638] A cada par oligo-transrito da pesquisa de força bruta foi dada uma pontuação de não correspondências por soma das pontuações das não correspondências individuais; as não correspondências na posição 2-9 foram contabilizadas como 2,8, as não correspondências nas posições dos locais de clivagem 10-11 foram contabilizadas como 1,2, e as não correspondências presentes na região 12-19 contabilizaram como 1,0. Foi levada cabo uma previsão adicional fora do alvo por comparação da frequência de heptâmeros e octômeros derivados de 3 hexâmeros distintos, derivados da semente,

de cada oligo. Os hexâmeros das posições 2-7 em relação ao início 5' foram usados para criar 2 heptâmeros e um octâmero. O "heptâmero1" foi criado por adição de um 3'-A ao hexâmero; o heptâmero2 foi criado por adição de um 5'-A ao hexâmero; o octômero foi criado por a adição de um A a ambas as extremidades 5' e 3' do hexâmero. A frequência de octâmeros e heptâmeros no 3'-UTRoma humano, rhesus, camundongo, ou rato (definido como a subsequência do transcritoma da base de dados Refseq do NCBI onde a extremidade da região codificante, a "CDS", está claramente definida) foi pré-calculada. A frequência dos octâmeros foi normalizada para a frequência dos heptâmeros usando o valor mediano da gama de frequências de octâmeros. Uma "mirSeedScore" foi depois calculada por cálculo da soma de ((3 X contagem de octâmeros normalizada) + (2 X contagem de heptâmero2) + (1 X contagem de heptâmero1)).

[00639] Ambas as fitas dos siRNAs foram atribuídas a uma categoria de especificidade de acordo com as pontuações calculadas: uma pontuação acima de 3 se qualifica como altamente específica, igual a 3 como específica e entre 2,2 e 2,8 como moderadamente específica. Os dúplexes foram separados pela especificidade da fita antissenso e aqueles dúplexes cujos oligos antissenso não tinham GC na primeira posição, não tinham G em ambas as posições 13 e 14, e tinham 3 ou mais Us ou As na região de semente foram selecionados.

[00640] Para dúplexes conjugados com GalNaC, oligos 21mero senso e 23mero antissenso foram desenhados por prolongamento de 13meros antissenso (descritos acima) até 23 nucleotídeos de sequência complementar com o alvo. Todos os transcritos de espécies incluídos no lote de desenho foram checados quanto à complementaridade. Somente os 23meros que conservaram 100% de complementaridade de sequência em pelo menos duas espécies foram usados. Para cada duplex, o 21mero senso foi especificado como o complemento reverso

dos primeiros 21 nucleotídeos da fita antissenso.

***Seleção de sequências de siRNA***

[00641] Os seguintes conjuntos de duplex 21/23mero para desenho de conjugados com GalNaC foram sintetizados e formados em duplexes.

[00642] C3: vinte senso e 20 antissenso pares de oligos derivados de humano/cyno/camundongo/rato, incluindo 6 onde a primeira posição antissenso foi trocado para UA (acima); 10 senso e 10 antissenso pares de oligos derivados de humano/cyno/camundongo, incluindo 3 onde a primeira posição antissenso foi trocado para UA (acima); 12 senso e 12 antissenso pares de oligos derivados de humano/cyno.

[00643] C9: um senso e um antissenso par de oligos derivados de humano/cyno/camundongo/rato; 2 senso e 2 antissenso pares de oligos derivados de humano/cyno/camundongo; 1 senso e 1 antissenso pares de oligos derivados de humano/cyno/rato; 19 senso e 19 antissenso pares de oligos derivados de humano/cyno.

[00644] CFB: nove senso e 9 antissenso pares de oligos derivados de humano/cyno/camundongo, incluindo 4 onde a primeira posição antissenso foi trocado para UA (acima); 23 senso e 23 antissenso pares de oligos derivados de humano/cyno.

[00645] Uma lista detalhada de sequências de fita senso e antisenso de CFB é mostrada nas Tabelas 3-4.

[00646] Uma lista detalhada de sequências de fita senso e antissenso de C3 é mostrada nas Tabelas 5-6.

[00647] Uma lista detalhada de sequências de fita senso e antissenso de C9 é mostrada nas Tabelas 7-8.

**b. Síntese de siRNA**

**c. Procedimento de Síntese Geral de RNA em Pequena e Média Escala**

[00648] Oligonucleotídeos de RNA foram sintetizados em escalas entre 0,2–500 µmol usando monômeros de 5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)-2'-

O-*t*-butildimetilsilil-3'-O-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropil)fosforamidita de uridina, 4-*N*-acetilcitidina, 6-*N*-benzoíladenosina e 2-*N*-isobutirilguanosina e as correspondentes fosforamiditas de 2'-O-metila e 2'-flúor comercialmente disponíveis de acordo com protocolos de síntese de oligonucleotídeos de fase sólida padrão. As soluções de amidita foram preparadas a concentração de 0,1-0,15 M e 5-etylto-1H-tetrazol (0,25-0,6 M em acetonitrila) foi usado como o ativador. Modificações na estrutura principal de fosforotioato foram introduzidas durante a síntese usando dissulfeto de fenilacetila( PADS) a 0,2 M em lutidina:acetonitrila (1:1) (v;v) ou 3-(dimetilaminometileno) amino-3H-1,2,4-ditiazol-5-tiona (DDTT) a 0,1 M em piridina para o passo de oxidação. Após completação da síntese, as sequências foram clivadas do suporte sólido e desprotegidas usando metilamina seguida por trietilamina.3HF para remover quaisquer grupos protetores 2'-O-*t*-butildimetilsilila.

[00649] Para escalas de síntese entre 5–500 µmol e sequências completamente modificadas em 2' (2'-flúor e/ou 2'-O-metila ou suas combinações), os oligonucleotídeos foram desprotegidos usando etanol e amônia aquosa concentrada (28-32%) 3:1 (v/v) a 35°C 16 h ou 55°C durante 5,5 h. Antes da desproteção com amônia, os oligonucleotídeos foram tratados com piperidina a 0,5 M em acetonitrila durante 20 min no suporte sólido. Os oligonucleotídeos em bruto foram analisados por LC-MS e HPLC com permuta aniónica (IEX-HPLC). A purificação dos oligonucleotídeos foi levada a cabo por IEX HPLC usando: fosfato a 20 mM, ACN a 10%-15%, pH = 8,5 (tampão A) e fosfato a 20 mM, ACN a 10%-15%, NaBR a 1 M, pH = 8,5 (tampão B). As frações foram analisadas quanto à pureza por HPLC analítica. As frações contendo produto com pureza adequada foram agrupadas e concentradas em um evaporador rotativo antes de dessalinização. As amostras foram dessalinizadas por cromatografia por exclusão de tamanhos e

liofilizadas até à secura. Quantidades molares iguais de fitas senso e antissenso foram emparelhadas em tampão 1x PBS para preparar os correspondentes duplexes de siRNA.

[00650] Para escalas pequenas (0,2–1  $\mu$ mol), a síntese foi realizada em um sintetizador MerMade 192 em um formato de 96 poços. No caso de sequências completamente modificadas em 2' (2'-flúor e/ou 2'-O-metila ou suas combinações), os oligonucleotídeos foram desprotegidos usando metilamina à temperatura ambiente durante 30-60 min seguido por incubação a 60°C durante 30 min ou usando etanol e amônia aquosa concentrada (28-32%) 3:1 (v/v) à temperatura ambiente durante 30-60 min seguido por incubação a 40°C durante 1,5 horas. Os oligonucleotídeos em bruto foram depois precipitados em uma solução de acetonitrila:acetona (9:1) e isolados por centrifugação e decantação do sobrenadante. A pastilha de oligonucleotídeos em bruto foi ressuspensa em tampão NaOAc a 20 mM e analisada por LC-MS e HPLC com permuta aniônica. As sequências de oligonucleotídeos em bruto foram dessalinizadas em placas com 96 poços profundos em uma coluna HiTrap Sephadex G25 de 5 mL (GE Healthcare). Em cada poço foram coletadas amostras de cerca de 1,5 mL correspondendo a um sequência individual. Estes oligonucleotídeos dessalinizados purificados foram analisados por LC-MS e cromatografia por permuta aniônica. Os duplexes foram preparados por emparelhamento de quantidades equimolares de sequências senso e antissenso em um robot Tecan. A concentração de duplexes foi ajustada até 10  $\mu$ M em tampão 1x PBS.

**d. I. Síntese de Oligonucleotídeos Conjugados com GalNAc para Análise *In Vivo***

[00651] Os oligonucleotídeos conjugados com ligante de GalNAc no seu terminal 3' foram sintetizados a escalas entre 0,2–500  $\mu$ mol usando um suporte sólido pré-carregado com um ligante em forma de Y

transportando um grupo hidróxi primário protegido por 4,4'-dimetoxitritila (DMT) para síntese de oligonucleotídeos e um ligante de GalNAc anexado através de uma ligação.

[00652] Para síntese de conjugados de GalNAc nas escalas entre 5–500  $\mu$ mol, o protocolo de síntese para RNA foi seguido com as seguintes adaptações: Para suportes de síntese à base de polistireno foi usado ácido dicloroacético a 5% em tolueno para clivagem de DMT durante a síntese. A clivagem do suporte e desproteção foram realizadas como descrito acima. Sequências ricas em fosforotioato (usualmente > 5 fosforotioatos) foram sintetizadas sem remoção do grupo 5'-DMT final ("DMT ligado") e, após clivagem e desproteção como descrito acima, purificadas por HPLC de fase reversa usando acetato de amônio a 50 mM em água (tampão A) e acetato de amônio a 50 mM em acetonitrila a 80% (tampão B). As frações foram analisadas quanto à pureza por HPLC analítica e/ou LC-MS. As frações contendo produto com pureza adequada foram agrupadas e concentradas em um evaporador rotativo. O grupo DMT foi removido usando ácido acético a 20%-25% em água até completação. As amostras foram dessalinizadas por cromatografia por exclusão de tamanhos e lyophilizadas até à secura. Quantidades molares iguais de fitas senso e antissenso foram emparelhadas em tampão 1x PBS para preparar os correspondentes duplexes de siRNA.

[00653] Para síntese em pequena escala de conjugados de GalNAc (0,2–1  $\mu$ mol), incluindo sequências com múltiplas ligações de fosforotioato, os protocolos descritos acima para síntese de RNA ou sequências completamente contendo 2'-F/2'-OMe na plataforma MerMade foram aplicados. A síntese foi realizada em colunas pré-empacotadas contendo suporte de vidro com poros controlado funcionalizado por GalNAc.

### **Exemplo 2. Rastreio in vitro**

#### ***Cultura e transfecções de células***

[00654] Células Hep3B (ATCC, Manassas, VA) foram cultivadas quase até à confluência a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% em Meio Essencial Mínimo de Eagle (ATCC) suplementado com FBS a 10%, estreptomicina, e glutamina (ATCC) antes de serem liberadas da placa por tripsinação. As células foram lavadas e ressuspensas a 0,25 x 10<sup>6</sup> células/mL. Durante as transfecções, as células foram plaqueadas em uma placa de 96 poços com cerca de 20.000 células por poço.

[00655] Hepatócitos primários de camundongo (PMH) foram recém-isolados de um camundongo fêmea C57BL/6 (Charles River Laboratories International, Inc. Willmington, MA) menos do que 1 hora antes das transfecções e cultivados em meio de hepatócitos primários. As células foram ressuspensas a 0,11 x 10<sup>6</sup> células/mL em meio InVitroGRO CP Rat (de plaqueação) (Celsis In Vitro Technologies, número de catálogo S01494). Durante as transfecções, as células foram plaqueadas em uma placa de colagênio de 96 poços BD BioCoat (BD, 356407) a 10.000 células por poço e incubadas a 37°C em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

[00656] Para Hep3B e PMH, a transfecção foi levada a cabo por adição de 14,8 µL de Opti-MEM mais 0,2 µL de Lipofectamina RNAiMax por poço (Invitrogen, Carlsbad CA. número do catálogo 13778-150) a 5 µL de cada duplex de siRNA a um poço individual em uma placa de 96 poços. A mistura foi depois incubada à temperatura ambiente durante 20 minutos. 80 µL de meio de crescimento completo sem antibiótico contendo o número apropriado de células foram depois adicionados à mistura de siRNA. As células foram incubadas durante 24 horas antes da purificação do RNA.

[00657] Experiências de dose única foram realizadas a concentrações finais de duplex de 1 nM e 0,01 nM para sequências modificadas por GalNAc. Foram realizadas experiências de resposta à dose à concentração final dos duplexes de 3, 1, 0,3, 0,1, 0,037, 0,0123,

0,00412 e 0,00137 para hepatócitos primários de camundongo e à concentração final dos duplexes de 3, 1, 0,3, 0,1, 0,037, 0,0123, 0,00412, 0,00137, 0,00046, 0,00015, 0,00005, e 0,000017 para células Hep3B.

***Isolamento de RNA total usando Estojo de Isolamento de mRNA DYNABEADS (Invitrogen, # da parte: 610-12)***

[00658] As células foram coletadas e lisadas em 150 µL de Tampão de Lise/Ligação, depois misturadas durante 5 minutos a 850 rpm usando um Termomisturador Eppendorf (a velocidade de mistura foi a mesma ao longo do processo). Dez microlitros de esférulas magnéticas e 80 µL de mistura de Tampão de Lise/Ligação foram adicionados a uma placa de fundo redondo e misturados durante 1 minuto. As esférulas magnéticas foram capturadas usando suporte magnético e o sobrenadante foi removido sem perturbar as esférulas. Após remoção do sobrenadante, as células lisadas foram adicionadas às esférulas restantes e misturadas durante 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, as esférulas magnéticas foram lavadas duas vezes com 150 L de Tampão de Lavagem A e misturadas durante 1 minuto. As esférulas foram capturadas novamente e o sobrenadante foi removido. As esférulas foram depois lavadas com 150 µL de Tampão de Lavagem B, capturadas e o sobrenadante foi removido. As esférulas foram de seguida lavadas com 150 µL de Tampão de Eluição, capturadas e o sobrenadante removido. Se permitiu que as esférulas secassem durante 2 minutos. Após secagem, 50 µL de Tampão de Eluição foram adicionados e misturados durante 5 minutos a 70°C. As esférulas foram capturadas em magneto durante 5 minutos. Quarenta e cinco µL de sobrenadante foram removidos e adicionados a outra placa de 96 poços.

***Síntese de cDNA usando Estojo de transcrição reversa de cDNA de elevada capacidade ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, # de Cat***

4368813)

[00659] Uma mistura mãe de 2  $\mu$ L de 10X Tampão, 0,8  $\mu$ L de 25X dNTPs, 2  $\mu$ L de Iniciadores aleatórios, 1  $\mu$ L de Transcriptase Reversa, 1  $\mu$ L de inibidor de RNase e 3,2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O por reação é preparada. Volumes iguais de mistura mãe foram misturados para um volume final de 12  $\mu$ L para amostras rastreadas *in vitro* ou 20  $\mu$ L para rastreadas *in vivo*. Foi gerado cDNA usando um termociclador C-1000 ou S-1000 Bio-Rad (Hercules, CA) através dos seguintes passos: 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 120 minutos, 85°C durante 5 segundos, e manutenção a 4°C.

#### ***PCR em tempo real***

[00660] Dois  $\mu$ L de cDNA foram adicionados a uma mistura mãe contendo 2  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu$ L de Sonda Taqman para GAPDH (número de catálogo 4326317E para células Hep3B, número de catálogo 352339E para hepatócitos primários de camundongo ou sonda customizada para hepatócitos primários de cinomólogo da Life Technologies), 0,5  $\mu$ L de sonda Taqman apropriada (número de catálogo Hs00156197\_m1 para células Hep3B ou mm00439275\_m1 para Hepatócitos Primários de Camundongos ou sonda customizada para hepatócitos primários de cinomólogo da Life Technologies) e 5  $\mu$ L de mistura mãe de sonda Lightcycler 480 (número de catálogo 04887301001 da Roche) por poço em placas de 384 poços (número de catálogo 04887301001 da Roche). Foi realizada PCR em tempo real em um sistema de PCR em Tempo Real LC480 da Roche (Roche) usando o ensaio de  $\Delta\Delta Ct(RQ)$ . Para rastreio *in vitro*, cada duplex foi testado em dois replicados biológicos a não ser que notado de outro modo e cada PCR em Tempo Real foi realizada em replicados técnicos em duplicado. Para rastreio *in vivo*, cada duplex foi testado em uma ou mais experiências (3 camundongos por grupo) e cada PCR em Tempo Real foi realizada em replicados técnicos em duplicado.

[00661] Para calcular a mudança relativa do número de vezes nos níveis de mRNA, os dados de tempo real foram analisados usando o método  $\Delta\Delta Ct$  e normalizados para ensaios realizados com células transfectadas com AD-1955 a 10 nM, ou células pseudotransfectadas. As IC50s foram calculadas usando um modelo de ajuste de 4 parâmetros usando XLFit e normalizadas para células transfectadas com AD-1955 ao longo da mesma gama de doses, ou para a sua própria dose mais baixa.

[00662] As sequências senso e antissenso de AD-1955 são:

SENSO: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID Nº: 39)

ANTISSENSO: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID Nº: 40).

[00663] A Tabela 9 mostra os resultados de rastreio de dose única em células Hep3B transfectadas com os RNAi indicados conjugados com CFB GalNAC. Os dados são expressos como percentagem de mensagem restante em relação a células não tratadas.

[00664] A Tabela 10 mostra os resultados de rastreio de dose única em hepatócitos primários de camundongo transfectados com os RNAi indicados conjugados com CFB GalNAC. Os dados são expressos como percentagem de mensagem restante em relação a células não tratadas.

[00665] A Tabela 11 mostra a resposta à dose em células Hep3B transfectadas com os RNAi indicados conjugados com CFB GalNAC. Os valores de IC<sub>50</sub> representam os valores de IC<sub>50</sub> em relação às células não tratadas.

[00666] A Tabela 12 mostra a resposta à dose em hepatócitos primários de camundongo transfectados com os RNAi indicados conjugados com CFB GalNAC. Os valores de IC<sub>50</sub> representam os valores de IC<sub>50</sub> em relação às células não tratadas.

[00667] A Tabela 13 mostra os resultados de rastreio de dose única em hepatócitos primários de camundongo transfectados com os RNAi

indicados conjugados com C9 GalNAC. Os dados são expressos como percentagem de mensagem restante em relação a células não tratadas.

[00668] A Tabela 14 mostra os resultados de rastreio de dose única em hepatócitos primários de camundongo transfectados com os RNAi indicados conjugados com C3 GalNAC. Os dados são expressos como percentagem de mensagem restante em relação a células não tratadas.

[00669] A Tabela 15 mostra os resultados de rastreio de dose única em células Hep3B transfectadas com os RNAi indicados conjugados com C3 GalNAC. Os dados são expressos como percentagem de mensagem restante em relação a células não tratadas.

[00670] A Tabela 16 mostra a resposta à dose em hepatócitos primários de camundongo transfectados com os RNAi indicados conjugados com C3 GalNAC. Os valores de IC<sub>50</sub> representam os valores de IC<sub>50</sub> em relação às células não tratadas.

[00671] A Tabela 17 mostra a resposta à dose em células Hep3B transfectadas com os RNAi indicados conjugados com C3 GalNAC. Os valores de IC<sub>50</sub> representam os valores de IC<sub>50</sub> em relação às células não tratadas.

[00672] Tabela 2: Abreviaturas de monômeros de nucleotídeos usadas na representação de sequências de ácidos nucleicos. Será entendido que estes monômeros, quando presentes em um oligonucleotídeo, estão mutuamente ligados por ligações 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviatura	Nucleotídeo(s)
A	Adenosina-3'-fosfato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
C	citidina-3'-fosfato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato

Abreviatura	Nucleotídeo(s)
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato
Gs	guanosina-3'-fosforotioato
T	5'-metiluridina-3'-fosfato
Tf	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosfato
Tfs	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3'-fosforotioato
U	Uridina-3'-fosfato
Uf	2'-fluorouridina-3'-fosfato
Ufs	2'-fluorouridina-3'-fosforotioato
Us	uridina-3'-fosforotioato
N	qualquer nucleotídeo (G, A, C, T ou U)
a	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato
as	2'-O-metiladenosina-3'-fosforotioato
c	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
cs	2'-O-metilcitidina-3'-fosforotioato
g	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato
gs	2'-O-metilguanosina-3'-fosforotioato
t	2'-O-metil-5-metiluridina-3'-fosfato
ts	2'-O-metil-5-metiluridina-3'-fosforotioato
u	2'-O-metiluridina-3'-fosfato
us	2'-O-metiluridina-3'-fosforotioato
s	ligação de fosforotioato
L96	N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoíl]-4-hidroxiprolinol Hyp-(GalNAc-alquil)3

**Tabela 3.** Sequências não modificadas do Fator B do Complemento (CFB)

Sequências de CFB Humanas						
ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>o</sup> s: 41-71, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_001710.5	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N <sup>o</sup> s: 72-102, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_001710.5
AD-60315.1	A-122021.1	AUUCUGAAUUUAUGACUAU	1987-2007	A-122022.1	AUAGUCAUAAAUCAGGAUUC	1985-2007
AD-60326.1	A-122009.1	CCUGAUCAAGCUCAAGAAUAA	2016-2036	A-122010.1	UUUUUCUUGAGCUUGAUACAGGGC	2014-2036
AD-60303.1	A-122017.1	GAAGCAGGAUUCCUGAAUUU	1978-1998	A-122018.1	AAAUUCAGGAAUCCUGCUUCUU	1976-1998
AD-60331.1	A-121995.1	AGCAACAUUGGUUCAAAAGUCA	1628-1648	A-121996.1	UGACUUUGAACACAUGUUGCUCA	1626-1648
AD-60344.1	A-122015.1	GCUGUGGUGUCUGAGUACUUU	1822-1842	A-122016.1	AAAGUACUCAGACACCACAGCCC	1820-1842
AD-60345.1	A-122031.1	AAGUGUCUAGUCAACUUAAUU	1153-1173	A-122032.1	AAUUAAGUUGACUAGACACUUUU	1151-1173
AD-60319.1	A-121991.1	AGCUGUGAGAGAGAUGCUCAA	2245-2265	A-121992.1	UUGAGCAUCUCUCACAGCUGC	2243-2265
AD-60308.1	A-122003.1	AGCCAAAAGUGUCUAGUCAA	1146-1166	A-122004.1	UUGACUAGACACUUUUUGGUCC	1144-1166
AD-60332.1	A-122011.1	UGUGAGUGAUGAGAUCUCUUU	648-668	A-122012.1	AAAGAGAUUCUACACUCACAUU	646-668
AD-60313.1	A-121989.1	AAUUGAGAAGGGCAAGUUA	1170-1190	A-121990.1	UAACUUGGCCACCUUCUCAUUAA	1168-1190
AD-60321.1	A-122023.1	CAACAUGUGUUCAAAGUCAAG	1630-1650	A-122024.1	CUUGACUUUGAACACAUGUUGCU	1628-1650
AD-60327.1	A-122025.1	UGUGAGAGAGAUGCUCAAUUA	2248-2268	A-122026.1	AUAUUGAGCAUCUCUCACAGC	2246-2268
AD-60302.1	A-122001.1	GUCUAGUCAACUUAAUUGAGA	1157-1177	A-122002.1	UCUCAUUUAAGUUGACUAGACAC	1155-1177
AD-60325.1	A-121993.1	UCCAAGAAAGACAUGAGCAA	1612-1632	A-121994.1	UUGCUCAUUGUCUUUCUUGGAAG	1610-1632
AD-60337.1	A-121997.1	UGUGUUCAAAGUCAAGGAUUA	1635-1655	A-121998.1	AUAUCCUUGACUUUGAACACAUG	1633-1655
AD-60333.1	A-122027.1	AUUGAUGAGAUCGGGACUUG	1486-1506	A-122028.1	CAAGUCCCGGAUCUCAUCAUGA	1484-1506
AD-60314.1	A-122005.1	CUGUGAGAGAGAUGCUCAAUA	2247-2267	A-122006.1	UAUUGAGCAUCUCUCACAGCU	2245-2267
AD-60320.1	A-122007.1	GAGCCAAAAGUGUCUAGUCA	1145-1165	A-122008.1	UGACUAGACACUUUUUGGUCCU	1143-1165
AD-60339.1	A-122029.1	UCCAAGAUGAGGAUUGGGUU	2549-2569	A-122030.1	AACCCAAUCCUCAUCUUGGAGU	2547-2569

Sequências de CFB Humanas						
ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N°s: 41-71, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_001710.5	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N°s: 72-102, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_001710.5
AD-60338.1	A-122013.1	CCCUUGAUAGUUACAAGAGA	2386-2406	A-122014.1	UCUCUUGUGAACUAUCAAGGGGC	2384-2406
AD-60307.1	A-121987.1	CAAAGUCAAGGAUAGGAAAA	1641-1661	A-121988.1	UUUUCCAUAUCCUUGACUUJGAA	1639-1661
AD-60309.1	A-122019.1	UAGUUCACAAGAGAACUGGU	2393-2413	A-122020.1	AACGACUUUCUUGUGAACUAUC	2391-2413
AD-60343.1	A-121999.1	GGCCCCUUGAUAGUUCACAAG	2383-2403	A-122000.1	CUUGUGAACUAUCAAGGGGCCGC	2381-2403
AD-60324.1	A-121977.1	UGGUGCUAGAUGGAUCAGACA	1100-1120	A-121978.1	UGUCUGAUCCAUCUAGCACCAGG	1098-1120
AD-60318.1	A-121975.1	GCUAGAUGGAUCAGACAGCAU	1104-1124	A-121976.1	AUGCUGUCUGAUCCAUCUAGCAC	1102-1124
AD-60300.1	A-121969.1	UACCUUGGUGCUAGAUGGAUCA	1096-1116	A-121970.1	UGAUCCAUCUAGCACCAGGUAGA	1094-1116
AD-60330.1	A-121979.1	GGUGCUAGAUGGAUCAGACAA	1101-1121 (G19A)	A-121980.1	UUGUCUGAUCCAUCUAGCACCAG	1099-1121 (G19A)
AD-60306.1	A-121971.1	UCUGAGUCUCUGUGGCAUGGU	1704-1724	A-121972.1	ACCAUGGCCACAGAGACUCAGAGA	1702-1724
AD-60336.1	A-121981.1	GUGCUAGAUGGAUCAGACAGA	1102-1122 (C19A)	A-121982.1	UCUGUCUGAUCCAUCUAGCACCA	1100-1122 (C19A)
AD-60301.1	A-121985.1	CUACCUGGUGCUAGAUGGAUA	1095-1115 (C19A)	A-121986.1	UAUCCAUCUAGCACCAGGUAGAU	1093-1115 (C19A)
AD-60342.1	A-121983.1	ACCUGGUGCUAGAUGGAUCAA	1097-1117 (G19A)	A-121984.1	UUGAUCCAUCUAGCACCAGGUAG	1095-1117 (G19A)

Sequências de CFB de Roedor						
ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N°s: 103-117, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_001142706.1	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N°s: 118-132, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_001142706.1
AD-60334.1	A-122043.1	GCAAGCCAAGAACUCAGUCAC	1888-1908	A-122044.1	GUGACUGAGAACUUGGUUGCCA	1886-1908
AD-60304.1	A-122033.1	GAUUGAGAAGGGUGGCGAGUUA	1291-1311	A-122034.1	UAACUCGCCACCUUCUCAAUCAA	1289-1311
AD-60310.1	A-122035.1	CACAAGAGAACGCCUUCAUU	2515-2535	A-122036.1	AAUGAAGCGGCCUUCUUGUGAA	2513-2535
AD-60328.1	A-122041.1	UUGUGAGAGAGAUGCUCACAA	2364-2384	A-122042.1	UUUGUAGCAUCUCUCUCACACU	2362-2384
AD-60322.1	A-122039.1	UCCUCAUGAAUGUUCCGGGA	193-213	A-122040.1	UCCCGGAACAUUCAUGAAGGAGG	191-213
AD-60316.1	A-122037.1	UCACAGAGAACGUCAACCAA	1407-1427	A-122038.1	UUUGGUUGAGCUUCUCUGUGACC	1405-1427
AD-60346.1	A-122047.1	CUAACCAAAUCAGUUAUGAA	1418-1438	A-122048.1	UUCAUACUGAUUUGGUUGAGCU	1416-1438
AD-60335.1	A-122059.1	CCCUGACAGAGACCAUCGAAG	1113-1133	A-122060.1	CUUCGAUGGUCUCUGUCAGGGAG	1111-1133
AD-60323.1	A-122055.1	GAGCAGAUUGCAGAAAAGGUU	261-281	A-122056.1	AACCUUUUAUGCAAUCUGCUCUG	259-281
AD-60340.1	A-122045.1	CUUCAUGAAUGUUCGGGAAG	195-215	A-122046.1	CUUCCCGGAACAUUCAUGAAGGGA	193-215
AD-60305.1	A-122049.1	CUUCAUCAAGUUGGUGUGAU	2529-2549	A-122050.1	AUCACACCAACUUGAAUGAAGCG	2527-2549
AD-60317.1	A-122053.1	GAUUGAAGAGGUCCUGUUCCA	2050-2070	A-122054.1	UGGAACAGGACCUCUUCAAUCUC	2048-2070
AD-60329.1	A-122057.1	AUUUCUUUCAUGCUAUGAU	782-802	A-122058.1	AUCAUAGCAUUGAAAAGAAUCU	780-802
AD-60341.1	A-122061.1	CCAGAGCAGAUUGCAGAAAAG	258-278	A-122062.1	CUUUUAUGCAAUCUGCUCUGGCA	256-278
AD-60311.1	A-122051.1	CACAGAGAACGUCAACCAA	1408-1428	A-122052.1	AUUUGGUUGAGCUUCUCUGUGAC	1406-1428

**Tabela 4.** Sequências modificadas do Fator B do complemento (CFB)

Sequências de CFB Humanas				
ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>os</sup> 133-163, respectivamente, por ordem de aparecimento)	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N <sup>os</sup> 164-194, respectivamente, por ordem de aparecimento)
AD-60315.1	A-122021.1	AfsusUfcCfuGfaAfUfUfuUfaUfgAfcUfaUfL96	A-122022.1	asUfsaGfuCfaUfaAfaauUfcAfgGfaAfususc
AD-60326.1	A-122009.1	CfscsUfgAfuCfaAfGfCfuCfaAfgAfaUfaAfL96	A-122010.1	usUfsaUfuCfuUfgAfgcuUfgAfuCfaGfgsgsc
AD-60303.1	A-122017.1	GfsasAfgCfaGfgAfAfUfuCfcUfgAfaUfuUfL96	A-122018.1	asAfsaUfuCfaGfgAfaauuCfcUfgCfuUfcusu
AD-60331.1	A-121995.1	AfsgsCfaAfcAfuGfUfGfuUfcAfaAfgUfcAfL96	A-121996.1	usGfsaCfuUfuGfaAfcacAfuGfuUfgCfuscsa
AD-60344.1	A-122015.1	GfscsUfgUfgGfuGfUfCfuGfaGfuAfcUfuUfL96	A-122016.1	asAfsaGfuAfcUfcAfgacAfcCfaCfaGfcscsc
AD-60345.1	A-122031.1	AfsasGfuGfuCfuAfGfUfcAfaCfuUfaAfuUfL96	A-122032.1	asAfsuUfaAfgUfuGfacuAfgAfcAfcUfususu
AD-60319.1	A-121991.1	AfsgsCfuGfuGfaGfAfGfaGfaUfgCfuCfaAfL96	A-121992.1	usUfsgAfgCfaUfcUfcucUfcAfcAfgCfusgsc
AD-60308.1	A-122003.1	AfsgsCfcAfaAfaAfGfUfgUfcUfaGfuCfaAfL96	A-122004.1	usUfsgAfcUfaGfaCfacuUfuUfuGfgCfuscs
AD-60332.1	A-122011.1	UfsgsUfgAfgUfgAfUfGfaGfaUfcUfcUfuUfL96	A-122012.1	asAfsaGfaGfaUfcUfcUfcuauCfaCfuCfaCfasusu
AD-60313.1	A-121989.1	AfsasUfuGfaGfaAfGfGfuGfgCfaAfgUfuAfL96	A-121990.1	usAfsaCfuUfgCfcAfccuUfcUfcAfaUfusasa
AD-60321.1	A-122023.1	CfsasAfcAfuGfuGfUfUfcAfaAfgUfcAfaGfL96	A-122024.1	csUfsuGfaCfuUfuGfaacAfcAfuGfuUfgscsu
AD-60327.1	A-122025.1	UfsgsUfgAfgAfgAfGfAfuGfcUfcAfaUfaUfL96	A-122026.1	asUfsaUfuGfaGfcAfucuCfuCfuCfaCfasgsc
AD-60302.1	A-122001.1	GfsusCfuAfgUfcAfAfCfuUfaAfuUfgAfgAfL96	A-122002.1	usCfsuCfaAfuUfaAfguuGfaCfuAfgAfcsasc
AD-60325.1	A-121993.1	UfscsCfaAfgAfaAfGfAfcAfaUfgAfgCfaAfL96	A-121994.1	usUfsgCfuCfaUfuGfucuUfuCfuUfgGfasasg
AD-60337.1	A-121997.1	UfsgsUfgUfuCfaAfAfGfuCfaAfgGfaUfaUfL96	A-121998.1	asUfsaUfcCfuUfgAfcuuUfgAfaCfaCfasusg
AD-60333.1	A-122027.1	AfsusUfgAfuGfaGfAfUfcCfgGfgAfcUfuGfL96	A-122028.1	csAfsaGfuCfcCfgGfaucUfcAfuCfaAfusgsa
AD-60314.1	A-122005.1	CfsusGfuGfaGfaGfAfGfaUfgCfuCfaAfuAfL96	A-122006.1	usAfsuUfgAfgCfaUfcucUfcUfcAfcAfgscsu
AD-60320.1	A-122007.1	GfsasGfcCfaAfaAfAfGfuGfuCfuAfgUfcAfL96	A-122008.1	usGfsaCfuAfgAfcAfcuuUfuUfgGfcUfcscsu
AD-60339.1	A-122029.1	UfscsCfaAfgAfuGfAfGfgAfuUfuGfgGfuUfL96	A-122030.1	asAfscCfcAfaAfuCfcucAfuCfuUfgGfasgsu
AD-60338.1	A-122013.1	CfscsCfuUfgAfuAfGfUfuCfaCfaAfgAfgAfL96	A-122014.1	usCfsuCfuUfgUfgAfacuAfuCfaAfgGfgsgsc

Sequências de CFB Humanas				
ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>os</sup> 133-163, respectivamente, por ordem de aparecimento)	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N <sup>os</sup> 164-194, respectivamente, por ordem de aparecimento)
AD-60307.1	A-121987.1	CfsasAfaGfuCfaAfGfGfaUfaUfgGfaAfaAfl96	A-121988.1	usUfsuUfcCfaUfaUfccuUfgAfcUfuUfgsasa
AD-60309.1	A-122019.1	UfsasGfuUfcAfcAfGfaGfaAfgUfcGfuUfl96	A-122020.1	asAfscGfaCfuUfcUfcuuGfuGfaAfcUfasusc
AD-60343.1	A-121999.1	GfsgsCfcCfcUfuGfAfUfaGfuUfcAfcAfaGfL96	A-122000.1	csUfsuGfuGfaAfcUfaucAfaGfgGfgCfcgsc
AD-60324.1	A-121977.1	UfsgsGfuGfcUfaGfAfUfgGfaUfcAfgAfcAfL96	A-121978.1	usGfsuCfuGfaUfcCfaucUfaGfcAfcCfasgsg
AD-60318.1	A-121975.1	GfscsUfaGfaUfgGfAfUfcAfgAfcAfgCfaUfl96	A-121976.1	asUfsgCfuGfuCfuGfaucCfaUfcUfaGfcasasc
AD-60300.1	A-121969.1	UfsasCfcUfgGfuGfCfUfaGfaUfgGfaUfcAfl96	A-121970.1	usGfsaUfcCfaUfcUfagcAfcCfaGfgUfasgsa
AD-60330.1	A-121979.1	GfsgsUfgCfuAfgAfUfGfgAfuCfaGfaCfaAfL96	A-121980.1	usUfsgUfcUfgAfuCfcauCfuAfgCfaCfcasag
AD-60306.1	A-121971.1	UfscsUfgAfgUfcUfcUfgUfgGfcAfuGfgUfl96	A-121972.1	asCfscAfuGfcCfaCfagaGfaCfuCfaGfasgsa
AD-60336.1	A-121981.1	GfsusGfcUfaGfaUfGfGfaUfcAfgAfcAfgAfL96	A-121982.1	usCfsuGfuCfuGfaUfccuUfcUfaGfcAfcsca
AD-60301.1	A-121985.1	CfsusAfcCfuGfgUfGfCfuAfgAfuGfgAfuAfL96	A-121986.1	usAfsuCfcAfuCfuAfgcaCfcAfgGfuAfgsasu
AD-60342.1	A-121983.1	AfscsCfuGfgUfgCfUfAfgAfuGfgAfuCfaAfL96	A-121984.1	usUfsgAfuCfcAfuCfuagCfaCfcAfgGfusasg

Sequências de CFB de Roedor				
ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N°s 195-209, respectivamente, por ordem de aparecimento)	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N°s 210-224, respectivamente, por ordem de aparecimento)
AD-60334.1	A-122043.1	GfscsAfaGfcCfaAfGfAfufCfuCfaGfuCfaCfL96	A-122044.1	gsUfsgAfcUfgAfgAfucuUfgGfcUfuGfcscsa
AD-60304.1	A-122033.1	GfsasUfuGfaGfaAfGfGfuGfgCfgAfgUfuAfL96	A-122034.1	usAfsaCfuCfgCfcAfccuUfcUfcAfaUfcscsa
AD-60310.1	A-122035.1	CfsasCfaAfgAfgAfAfGfcCfgCfuUfcAfufL96	A-122036.1	asAfsuGfaAfgCfgGfcuuCfuCfuUfgUfgsasa
AD-60328.1	A-122041.1	UfsusGfuGfaGfaGfAfGfaUfgCfuAfcAfaAfL96	A-122042.1	usUfsuGfuAfgCfaUfcucUfcUfcAfcAfascu
AD-60322.1	A-122039.1	UfscsCfuUfcAfufGfAfAfGfuUfcCfgGfgAfL96	A-122040.1	usCfscCfgGfaAfcAfuucAfuGfaAfgGfasgsg
AD-60316.1	A-122037.1	UfscsAfcAfgAfgAfAfGfcUfcAfaCfcAfaAfL96	A-122038.1	usUfsuGfgUfuGfaGfcuuCfuCfuGfuGfascsc
AD-60346.1	A-122047.1	CfsusCfaAfcCfaAfAfUfcAfgUfuAfufGfaAfL96	A-122048.1	usUfscAfuAfaCfuGfauuUfgGfuUfgAfgscsu
AD-60335.1	A-122059.1	CfscsCfuGfaCfaGfAfGfaCfcAfufCfgAfaGfL96	A-122060.1	csUfsuCfgAfuGfgUfcucUfgUfcAfgGfgsasg
AD-60323.1	A-122055.1	GfsasGfcAfgAfuUfGfCfaUfaAfaAfgGfuUfL96	A-122056.1	asAfscCfuUfuUfaUfgcaAfuCfuGfcUfcusug
AD-60340.1	A-122045.1	CfsusUfcAfufGfaAfUfGfuUfcCfgGfgAfaGfL96	A-122046.1	csUfsuCfcCfgGfaAfcauUfcAfuGfaAfgsgsa
AD-60305.1	A-122049.1	CfsusUfcAfufUfcAfGfuUfgGfuGfuGfaUfL96	A-122050.1	asUfscAfcAfcCfaAfccuGfaAfufGfaAfgscsg
AD-60317.1	A-122053.1	GfsasUfuGfaAfgAfGfGfuCfcUfgUfuCfcAfL96	A-122054.1	usGfsgAfaCfaGfgAfccuCfuUfcAfaUfcscusc
AD-60329.1	A-122057.1	AfsusUfuCfuUfuUfcAfufGfuCfuAfufGfaUfL96	A-122058.1	asUfscAfuAfgCfaUfugaAfaAfgAfaAfuscsu
AD-60341.1	A-122061.1	CfscsAfgAfgCfaGfAfufGfcAfuAfaAfaGfL96	A-122062.1	csUfsuUfuAfuGfcAfaucUfgCfuCfuGfgscsa
AD-60311.1	A-122051.1	CfsasCfaGfaGfaAfGfCfuCfaAfCfcAfaAfufL96	A-122052.1	asUfsuUfgGfuUfgAfgcuUfcUfcUfgUfgsasc

**Tabela 5.** Sequências não modificadas de C3

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>os</sup> 225-265, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_000064.2	ID do Antisenso	Sequência do Antisenso (SEQ ID N <sup>os</sup> 266-306, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_000064.2
AD-60149.1	A-121853.1	CGUGGUCAAGGUCUUCUCU	3309-3329	A-121854.1	AGAGAGAAGACCUUGACCACGU	3307-3329
AD-60151.1	A-121885.1	ACGUGGUCAAGGUCUUCUCU	3308-3324_C21A	A-121886.1	UAGAGAAGACCUUGACCACGU	3306-3324_C21A
AD-60152.1	A-121901.1	UUUGACCUCAUGGUGUUCGUG	1174-1194	A-121902.1	CACGAACACCAUGAGGUCAAAGG	1172-1194
AD-60153.1	A-121917.1	GGAGAAUUGCUCUCAUACAAA	4611-4631	A-121918.1	UUUUGUAUGAAGCAUUCUCCUC	4609-4631
AD-60154.1	A-121933.1	UGUUAAAUGGCUGAUCCUGGA	3375-3395	A-121934.1	UCCAGGAUCAGCCAUUUAACAGC	3373-3395
AD-60155.1	A-121855.1	GACAGACAAGACCAUCUACAC	465-485	A-121856.1	GUGUAGAUGGUCUUGUCUGUCUG	463-485
AD-60156.1	A-121871.1	CCAGACAGACAAGACCAUCUA	462-482	A-121872.1	UAGAUGGUCUUGUCUGUCUGGAU	460-482
AD-60157.1	A-121887.1	CCAGAUCCACUUUACCAAGAA	1125-1141_C21A	A-121888.1	UUCUUGGUGAAGUGGAUCUGGU	1123-1141_C21A
AD-60158.1	A-121903.1	UUGACCUCAUGGUGUUCGUGA	1175-1195	A-121904.1	UCACGAACACCAUGAGGUCAAAG	1173-1195
AD-60159.1	A-121919.1	CCCCUUCGAGGUACAGUAAU	2523-2543	A-121920.1	AUUACUGUGACCUCGAAGGGGUC	2521-2543
AD-60160.1	A-121935.1	AUGAACAAAACUGUGGGCUGUU	2878-2898	A-121936.1	AACAGCCACAGUUUUGUUCAUUC	2876-2898
AD-60161.1	A-121857.1	AGACAGACAAGACCAUCUACA	464-484	A-121858.1	UGUAGAUGGUCUUGUCUGUCUG	462-484
AD-60162.1	A-121873.1	CCAGAUCCACUUUACCAAGAC	1125-1145	A-121874.1	GUCUUGGUGAAGUGGAUCUGGU	1123-1145
AD-60163.1	A-121889.1	AGGGAUUCUGUGUGGCAGACCA	2505-2521_C21A	A-121890.1	UGGUCUGGCCACACAGAUCCCCUU	2503-2521_C21A
AD-60164.1	A-121905.1	GACAAGACCAUCUACACCCU	469-489	A-121906.1	AGGGGUGUAGAUGGUCUUGUCUG	467-489
AD-60165.1	A-121921.1	GCUGAGGAGAAUUGCUUCAUA	4606-4626	A-121922.1	UAUGAAGCAUUCUCCUCAGCAC	4604-4626
AD-60166.1	A-121859.1	ACGUGGUCAAGGUCUUCUCU	3308-3328	A-121860.1	GAGAGAAGACCUUGACCACGU	3306-3328
AD-60167.1	A-121875.1	GGAUCUGUGUGGCAGACCCU	2507-2527	A-121876.1	AGGGGUCUGGCCACACAGAUCCCCU	2505-2527
AD-60168.1	A-121891.1	ACAGACAAGACCAUCUACACA	466-482_C21A	A-121892.1	UGUGUAGAUGGUCUUGUCUGUCU	464-482_C21A
AD-60169.1	A-121907.1	AUCCAGACAGACAAGACCAUU	460-476_C21U	A-121908.1	AAUGGUCUUGUCUGUCUGGAUGA	458-476_C21U
AD-60170.1	A-121923.1	CUCCGUGUGGGUGGACGUAA	1713-1733	A-121924.1	UUGACGUCCACCCACACGGAGUC	1711-1733

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>os</sup> 225-265, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_000064.2	ID do Antisenso	Sequência do Antisenso (SEQ ID N <sup>os</sup> 266-306, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_000064.2
AD-60171.1	A-121861.1	UCCAGACAGACAAGACCAUCU	461-481	A-121862.1	AGAUGGUCUUGUCUGUCUGGAUG	459-481
AD-60172.1	A-121877.1	AGGAUCUGUGUGGCAGACCC	2505-2525	A-121878.1	GGGUCUGGCCACACAGAUCCCUUU	2503-2525
AD-60173.1	A-121893.1	CAAGAAAGGGAUUCUGUGUGGA	2499-2515_C21A	A-121894.1	UCCACACAGAUCCCUUUUCUUGUC	2497-2515_C21A
AD-60174.1	A-121909.1	UGACCUCAUGGUGUUCCGUGAU	1176-1192_C21U	A-121910.1	AUCACGAACACCAUGAGGUAAA	1174-1192_C21U
AD-60175.1	A-121925.1	GCAGCUAAAAGACUUUGACUU	3789-3809	A-121926.1	AAGUCAAAGUCUUUUAGCUGCAG	3787-3809
AD-60176.1	A-121863.1	CAUCCAGACAGACAAGACCAU	459-479	A-121864.1	AUGGUCUUGUCUGUCUGGAUGAA	457-479
AD-60177.1	A-121879.1	ACAGACAAGACCAUCUACACC	466-486	A-121880.1	GGUGUAGAUGGUCUUGUCUGUCU	464-486
AD-60178.1	A-121895.1	AUCCAGACAGACAAGACCAUC	460-480	A-121896.1	GAUGGUCUUGUCUGUCUGGAUGA	458-480
AD-60179.1	A-121911.1	UUUGACCUCAUGGUGUUUCGUU	1174-1190_G21U	A-121912.1	AACGAACACCAUGAGGUCAAAGG	1172-1190_G21U
AD-60180.1	A-121927.1	GGAUGCCAAGAACACUAUGAU	4200-4220	A-121928.1	AUCAUAGUGUUCUUGGCAUCCUG	4198-4220
AD-60181.1	A-121865.1	AAGAAAGGGAUUCUGUGUGGC	2500-2520	A-121866.1	UGCCACACAGAUCCCUUUUCUUGU	2498-2520
AD-60182.1	A-121881.1	CAAGAAAGGGAUUCUGUGUGGC	2499-2519	A-121882.1	GCCACACAGAUCCCUUUUCUUGUC	2497-2519
AD-60183.1	A-121897.1	UACGUGGUCAAGGUCUUCUCU	3307-3327	A-121898.1	AGAGAAGACCUUGACCACGUAGG	3305-3327
AD-60184.1	A-121913.1	CAGUUUCGAGGUCAUAGUGGA	756-776	A-121914.1	UCCACUAUGACCUUCGAAACUGGG	754-776
AD-60185.1	A-121929.1	CGUGCCGGAAGGAAUCAGAAU	2859-2879	A-121930.1	AUUCUGAUUCCUUCCGGCACGAC	2857-2879
AD-60186.1	A-121867.1	GAAAGGGAUUCUGUGUGGCAGA	2502-2522	A-121868.1	UCUGCCACACAGAUCCCUUUUCUU	2500-2522
AD-60187.1	A-121883.1	GACAGACAAGACCAUCUACAA	465-481_C21A	A-121884.1	UUGUAGAUGGUCUUGUCUGUCUG	463-481_C21A
AD-60188.1	A-121899.1	UGACCUCAUGGUGUUCCGUGAC	1176-1196	A-121900.1	GUCACGAACACCAUGAGGUAAA	1174-1196
AD-60189.1	A-121915.1	UGUAUAUUUCGACCUCAAG	4138-4158	A-121916.1	CUUGAGGUUCGAAUUUAUACAGG	4136-4158
AD-60190.1	A-121931.1	AACUACAUGAACCUACAGAGA	3601-3621	A-121932.1	UCUCUGUAGGUUCAUGUAGUUGG	3599-3621

**Tabela 6.** Sequências modificadas de C3

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>o</sup> s 308-347, respectivamente, por ordem de aparecimento)	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N <sup>o</sup> s 348-388, respectivamente, por ordem de aparecimento)
AD-60149.1	A-121853.1	CfsgsUfgGfuCfaAfGfGfuCfuUfcUfcUfcUfl96	A-121854.1	asGfsaGfaGfaAfgAfccuUfgAfcCfaCfgsusa
AD-60151.1	A-121885.1	AfscsGfuGfgUfcAfAfGfgUfcUfuCfuCfuAfL96	A-121886.1	usAfsgAfgAfaGfaCfcuuGfaCfcAfcGfusasg
AD-60152.1	A-121901.1	UfsusUfgAfcCfuCfAfUfgGfuGfuUfcGfuGfl96	A-121902.1	csAfscGfaAfcAfcCfaugAfgGfuCfaAfsgsg
AD-60153.1	A-121917.1	GfsgsAfgAfaUfuGfCfUfuCfaUfaCfaAfaAfL96	A-121918.1	usUfsuUfgUfaUfgAfagcAfaUfuCfuCfcusc
AD-60154.1	A-121933.1	UfsgsUfuAfaAfuGfGfCfuGfaUfcCfuGfgAfL96	A-121934.1	usCfscAfgGfaUfcAfgccAfuUfuAfaCfasgsc
AD-60155.1	A-121855.1	GfsasCfaGfaCfaAfGfAfcCfaUfcUfaCfaCfL96	A-121856.1	gsUfsgUfaGfaUfgGfucuUfgUfcUfgUfcusug
AD-60156.1	A-121871.1	CfscsAfgAfcAfgAfCfAfaGfaCfcAfuCfuAfL96	A-121872.1	usAfsgAfuGfgUfcUfuguCfuGfuCfuGfgsasu
AD-60157.1	A-121887.1	CfscsAfgAfuCfcAfCfUfuCfaCfcAfaGfaAfL96	A-121888.1	usUfscUfuGfgUfgAfaguGfgAfuCfuGfgusa
AD-60158.1	A-121903.1	UfsusGfaCfcUfcAfUfGfgUfgUfuCfgUfgAfL96	A-121904.1	usCfsaCfgAfaCfaCfcuuGfaGfgUfcAfasasg
AD-60159.1	A-121919.1	CfscsCfcUfuCfgAfGfGfuCfaCfaGfuAfaUfl96	A-121920.1	asUfsuAfcUfgUfgAfccuCfgAfaGfgGfgsusc
AD-60160.1	A-121935.1	AfsusGfaAfcAfaAfAfCfuGfuGfgCfuGfuUfl96	A-121936.1	asAfscAfgCfcAfcAfguuUfuGfuUfcAfususc
AD-60161.1	A-121857.1	AfsgsAfcAfgAfcAfAfGfaCfcAfuCfuAfcAfL96	A-121858.1	usGfsuAfgAfuGfgUfcuuGfuCfuGfuCfusgsg
AD-60162.1	A-121873.1	CfscsAfgAfuCfcAfCfUfuCfaCfcAfaGfaCfL96	A-121874.1	gsUfscUfuGfgUfgAfaguGfgAfuCfuGfgusa
AD-60163.1	A-121889.1	AfsgsGfgAfuCfuGfUfGfuGfgCfaGfaCfcAfL96	A-121890.1	usGfsgUfcUfgCfcAfcacAfgAfuCfcCfususu
AD-60164.1	A-121905.1	GfsasCfaAfgAfcCfAfUfcUfaCfaCfcCfcUfl96	A-121906.1	asGfsgGfgUfgUfaGfaugGfuCfuUfgUfcusug
AD-60165.1	A-121921.1	GfscsUfgAfgGfaGfAfAfuUfgCfuUfcAfuAfL96	A-121922.1	usAfsuGfaAfgCfaAfuuCfcCfuCfaGfcasc
AD-60166.1	A-121859.1	AfscsGfuGfgUfcAfAfGfgUfcUfuCfuCfuCfL96	A-121860.1	gsAfsgAfgAfaGfaCfcuuGfaCfcAfcGfusasg
AD-60167.1	A-121875.1	GfsgsAfuCfuGfuGfUfGfgCfaGfaCfcCfcUfl96	A-121876.1	asGfsgGfgUfcUfgCfcacAfcAfgAfuCfcscsu
AD-60168.1	A-121891.1	AfscsAfgAfcAfaGfAfCfcAfuCfuAfcAfcAfL96	A-121892.1	usGfsuGfuAfgAfuGfucusuGfuCfuGfuscsu
AD-60169.1	A-121907.1	AfsusCfcAfgAfcAfGfAfcAfaGfaCfcAfuUfl96	A-121908.1	asAfsuGfgUfcUfuGfucusuGfuCfuGfgAfusgsa
AD-60170.1	A-121923.1	CfsusCfcGfuGfuGfGfGfuGfgAfcGfuCfaAfL96	A-121924.1	usUfsgAfcGfuCfcAfcccAfcAfcGfgAfgsusc

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>o</sup> s 308-347, respectivamente, por ordem de aparecimento)	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N <sup>o</sup> s 348-388, respectivamente, por ordem de aparecimento)
AD-60171.1	A-121861.1	UfscsCfaGfaCfaGfAfCfaAfgAfcCfaUfcUfL96	A-121862.1	asGfsaUfgGfuCfuUfgucUfgUfcUfgGfasusg
AD-60172.1	A-121877.1	AfsgsGfgAfuCfuGfUfgfuGfgCfaGfaCfcCfL96	A-121878.1	gsGfsgUfcUfgCfcAfCACAfAfuCfcCfususu
AD-60173.1	A-121893.1	CfsasAfgAfaAfgGfGfAfCfuGfuGfuGfgAfL96	A-121894.1	usCfscAfcAfcAfgAfuccCfuUfuCfuUfgsusc
AD-60174.1	A-121909.1	UfsgsAfcCfuCfaUfGfGfuGfuUfcGfuGfaUfL96	A-121910.1	asUfscAfcGfaAfcAfccaUfgAfgGfuCfasasa
AD-60175.1	A-121925.1	GfscsAfgCfuAfaAfGfaCfuUfuGfaCfuUfL96	A-121926.1	asAfsgUfcAfaAfgUfcuuUfuAfgCfuGfcsasg
AD-60176.1	A-121863.1	CfsasUfcCfaGfaCfAfGfaCfaAfgAfcCfaUfL96	A-121864.1	asUfsgGfuCfuUfgUfcugUfcUfgGfaUfgsasa
AD-60177.1	A-121879.1	AfscsAfgAfcAfaGfAfCfcAfuCfuAfcAfcCfL96	A-121880.1	gsGfsuGfuAfgAfuGfgucUfuGfuCfuGfuscsu
AD-60178.1	A-121895.1	AfsusCfcAfgAfcAfGfAfCfaGfaCfcAfuCfL96	A-121896.1	gsAfsuGfgUfcUfuGfucuGfuCfuGfgAfusgsa
AD-60179.1	A-121911.1	UfsusUfgAfcCfuCfAfUfgGfuGfuUfcGfuUfL96	A-121912.1	asAfscGfaAfcAfcCfaugAfgGfuCfaAfasgsg
AD-60180.1	A-121927.1	GfsgsAfuGfcCfaAfGfAfaCfaCfuAfuGfaUfL96	A-121928.1	asUfscAfuAfgUfgUfcuuUfgGfcAfuCfcusug
AD-60181.1	A-121865.1	AfsasGfaAfaGfgGfAfUfcUfgUfgUfgGfcAfL96	A-121866.1	usGfscCfaCfaCfaGfaucCfcUfuUfcUfusgsu
AD-60182.1	A-121881.1	CfsasAfgAfaAfgGfGfAfCfuGfuGfuGfgCfL96	A-121882.1	gsCfscAfcAfcAfgAfuccCfuUfuCfuUfgsusc
AD-60183.1	A-121897.1	UfsasCfgUfgGfuCfAfAfgGfuCfuUfcUfcUfL96	A-121898.1	asGfsaGfaAfgAfcCfuugAfcCfaCfgUfasgsg
AD-60184.1	A-121913.1	CfsasGfuUfuCfgAfGfGfuCfaUfaGfuGfgAfL96	A-121914.1	usCfscAfcUfaUfgAfccuCfgAfaAfcUfgsgsg
AD-60185.1	A-121929.1	CfsgsUfgCfcGfgAfAfGfgAfaUfcAfgAfaUfL96	A-121930.1	asUfsuCfuGfaUfuCfcuuCfcGfgCfaCfgsasc
AD-60186.1	A-121867.1	GfsasAfaGfgGfaUfCfUfgUfgUfgGfcAfgAfL96	A-121868.1	usCfsuGfcCfaCfaCfagaUfcCfcUfuUfcususu
AD-60187.1	A-121883.1	GfsasCfaGfaCfaAfGfAfCfaUfcUfaCfaAfl96	A-121884.1	usUfsgUfaGfaUfgGfucuUfgUfcUfgUfcusug
AD-60188.1	A-121899.1	UfsgsAfcCfuCfaUfGfGfuGfuUfcGfuGfaCfL96	A-121900.1	gsUfscAfcGfaAfcAfccaUfgAfgGfuCfasasa
AD-60189.1	A-121915.1	UfsgsUfaAfaAfaUfUfcGfaCfcUfcAfaGfL96	A-121916.1	csUfsuGfaGfgUfcGfaauUfuAfuUfaCfasgsg
AD-60190.1	A-121931.1	AfsasCfuAfcAfuGfAfAfCfuAfcAfgAfgAfL96	A-121932.1	usCfsuCfuGfuAfgGfuucAfuGfuAfgUfusgsug

**Tabela 7:** Sequências não modificadas de C9

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>os</sup> 389-411, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_00173 7.3	ID do Antisenso	Sequência do Antisenso (SEQ ID N <sup>os</sup> 412-434, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_001737.3
AD-59663.1	A-121046.1	UUUUGACAAUGAGUUUCUACAA	606-626	A-121047.1	UUGUAGAACUCAUUGUCAAAAGG	604-626
AD-59664.1	A-121062.1	AUCAAUGAAUUUAGUGUAAGA	1597-1617	A-121063.1	UCUUACACUAAAUUCAUUGAUAU	1595-1617
AD-59665.1	A-121078.1	AGACAAAUGUUUCGUUCAAGA	268-288	A-121079.1	UCUUGAACGAAACAUUUGUCUGA	266-288
AD-59668.1	A-121048.1	CUUUUGACAAUGAGUUUCUACA	605-625	A-121049.1	UGUAGAACUCAUUGUCAAAAGGU	603-625
AD-59669.1	A-121064.1	AACUUGGAAAGAGCCAUUGAAX	1570-1590	A-121065.1	UUCAAUGGCUCUUUCCAAGUUUU	1568-1590
AD-59670.1	A-121080.1	UACCUGAGAACUGCAUUAACAX	2589-2609	A-121081.1	UGUUAAUCAGCUUCUCAGGUAGG	2587-2609
AD-59673.1	A-121050.1	ACCUUUUGACAAUGAGUUUCUA	603-623	A-121051.1	UAGAACUCAUUGUCAAAAGGUGU	601-623
AD-59674.1	A-121066.1	GACUGCGAAAUGACUUUCAA	391-411	A-121067.1	UUGAAAGUCAUUUCCGCAGUCAU	389-411
AD-59675.1	A-121082.1	GCCCAUUCAAAUUUUGAGGGAA	1682-1702	A-121083.1	UUCCCUCAAAUUUGAAUGGGCAG	1680-1702
AD-59678.1	A-121052.1	UUUUGGUAAGCUUCCAUGA	1175-1195	A-121053.1	UCAUGGAAGCUUUUAUCCAAAACA	1173-1195
AD-59679.1	A-121068.1	AACCAAAGGCGAGAAAAUUU	708-728	A-121069.1	AAAAUUUUUCUGCCUUUUGGUUUC	706-728
AD-59680.1	A-121084.1	CUUUGCCAACUACCUAUGAAA	1067-1087	A-121085.1	UUUCAUAGGUAGUUGGCAAAGCU	1065-1087
AD-59683.1	A-121054.1	CACCUUUUGACAAUGAGUUCU	602-622	A-121055.1	AGAACUCAUUGUCAAAAGGUGUG	600-622
AD-59684.1	A-121070.1	GAGAAGACAUCAAAUUUUAU	781-801	A-121071.1	AUUAUUUUUGAUGUCUUCU	779-801
AD-59685.1	A-121086.1	GACAAUGAGUUCUACAAUGGA	610-630	A-121087.1	UCCAUGGUAGAACUCAUUGUCAA	608-630
AD-59688.1	A-121056.1	UUUGGUAAGCUUCCAUGAA	1176-1196	A-121057.1	UUCAUGGAAGCUUUUAUCCAAAAC	1174-1196
AD-59689.1	A-121072.1	AUCUAUGAAACCAAAGGCGAG	700-720	A-121073.1	CUCGCCUUUUGGUUUCAUAGAUCA	698-720
AD-59690.1	A-121088.1	AUAUCAAUGAAUUUAGUGUAA	1595-1615	A-121089.1	UUACACUAAAUCAUUGAUAUAG	1593-1615
AD-59692.1	A-121058.1	CACACCUUUUGACAAUGAGUU	600-620	A-121059.1	AACUCAUUGUCAAAAGGUGUGCU	598-620
AD-59693.1	A-121074.1	UAGGGUCUGAGACCUUUUGAA	2648-2668	A-121075.1	UUCAAAAGGUCUCAGACCCUAAG	2646-2668

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>os</sup> 389-411, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_00173 7.3	ID do Antisenso	Sequência do Antisenso (SEQ ID N <sup>os</sup> 412-434, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Posição em NM_001737.3
AD-59694.1	A-121090.1	CAAAACUUGGAAAGAGCCAUU	1567-1587	A-121091.1	AAUGGCUCUUUCCAAGUUUUUU	1565-1587
AD-59696.1	A-121060.1	GCACACCUUUUGACAAUGAGUx	599-619	A-121061.1	ACUCAUUGUCAAAAGGUGUGCUU	597-619
AD-59697.1	A-121076.1	UGAAACCAAAGGCGAGAAAAA	705-725	A-121077.1	UUUUUCUCGCCUUUGGUUCAUA	703-725

**Tabela 8.** Sequências modificadas de C9

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (SEQ ID N°s 435-457, respectivamente, por ordem de aparecimento)	ID do Antisenso	Sequência Antissenso (SEQ ID N°s 458-480, respectivamente, por ordem de aparecimento)
AD-59663.1	A-121046.1	UfsusUfuGfaCfaAfUfGfaGfuUfcUfaCfaAfl96	A-121047.1	usUfsgUfaGfaAfcUfcuauUfgUfcAfaAfsgsg
AD-59664.1	A-121062.1	AfsusCfaAfuGfaAfUfUfuAfgUfgUfaAfgAfl96	A-121063.1	usCfsuUfaCfaCfuAfaauUfcAfuUfgAfusasu
AD-59665.1	A-121078.1	AfsgsAfcAfaAfuGfUfUfuCfgUfuCfaAfgAfl96	A-121079.1	usCfsuUfgAfaCfgAfaacAfuUfuGfuCfusgsa
AD-59668.1	A-121048.1	CfsusUfuUfgAfcAfAfuUfgAfgUfuCfuAfcAfl96	A-121049.1	usGfsuAfgAfaCfuCfaauuGfuCfaAfaAfsgsgu
AD-59669.1	A-121064.1	AfsasCfuUfgGfaAfAfGfaGfcCfaUfuGfaAfl96	A-121065.1	usUfscAfaUfgGfcUfcuuUfcCfaAfgUfususu
AD-59670.1	A-121080.1	UfsasCfcUfgAfgAfAfGfcUfgAfuUfaAfcAfl96	A-121081.1	usGfsuUfaAfuCfaGfcuuCfuCfaGfgUfsgsg
AD-59673.1	A-121050.1	AfscsCfuUfuUfgAfCfAfaUfgAfgUfuCfuAfl96	A-121051.1	usAfsgAfaCfuCfaUfuguCfaAfaAfgGfusgsu
AD-59674.1	A-121066.1	GfsasCfuGfcGfgAfAfAfuGfaCfuUfuCfaAfl96	A-121067.1	usUfsgAfaAfgUfcAfuuuCfcGfcAfgUfcasau
AD-59675.1	A-121082.1	GfscsCfcAfuUfcAfAfAfuUfuGfaGfgGfaAfl96	A-121083.1	usUfscCfcUfcAfaAfuuuGfaAfuGfgGfcsasg
AD-59678.1	A-121052.1	UfsusUfuGfgAfuAfAfAfgCfuUfcCfaUfgAfl96	A-121053.1	usCfsaUfgGfaAfgCfuuuAfuCfcAfaAfscsa
AD-59679.1	A-121068.1	AfsasCfcAfaAfgGfCfGfaGfaAfaAfuUfuUfl96	A-121069.1	asAfsaUfuUfuUfcUfcgcCfuUfuGfgUfususc
AD-59680.1	A-121084.1	CfsusUfuGfcCfaAfCfUfaCfcUfaUfgAfaAfl96	A-121085.1	usUfsuCfaUfaGfgUfaguUfgGfcAfaAfscsu
AD-59683.1	A-121054.1	CfsasCfcUfuUfuGfAfCfaAfuGfaGfuUfcUfl96	A-121055.1	asGfsaAfcUfcAfuUfgucAfaAfaGfgUfgsusg
AD-59684.1	A-121070.1	GfsasGfaAfgAfcAfUfcAfaAfuUfuAfaUfl96	A-121071.1	asUfsuAfaAfaUfuUfgauGfuCfuUfcUfcasusu
AD-59685.1	A-121086.1	GfsasCfaAfuGfaGfUfUfcUfaCfaAfuGfgAfl96	A-121087.1	usCfscAfuUfgUfaGfaacUfcAfuUfgUfcasasa
AD-59688.1	A-121056.1	UfsusUfgGfaUfaAfAfGfcUfuCfcAfuGfaAfl96	A-121057.1	usUfscAfuGfgAfaGfcuuUfaUfcCfaAfasc
AD-59689.1	A-121072.1	AfsusCfuAfuGfaAfAfCfcAfaAfgGfcGfaGfl96	A-121073.1	csUfscGfcCfuUfuGfguuUfcAfuAfgAfuscsa
AD-59690.1	A-121088.1	AfsusAfuCfaAfuGfAfAfuUfuAfgUfgUfaAfl96	A-121089.1	usUfsaCfaCfuAfaAfuucAfuUfgAfuAfusasg
AD-59692.1	A-121058.1	CfsasCfaCfcUfuUfuGfAfcAfuGfaGfuUfl96	A-121059.1	asAfscUfcAfuUfgUfcuuAfaGfgUfgUfgscsu
AD-59693.1	A-121074.1	UfsasGfgGfuCfuGfAfGfaCfcUfuUfuGfaAfl96	A-121075.1	usUfscAfaAfaGfgUfcucAfgAfcCfcUfasasg
AD-59694.1	A-121090.1	CfsasAfaAfcUfuGfGfAfaAfgAfgCfcAfuUfl96	A-121091.1	asAfsuGfgCfuCfuUfuccAfaGfuUfuUfgsusu
AD-59696.1	A-121060.1	GfscsAfcAfcCfuUfuUfgAfcAfaUfgAfgUfl96	A-121061.1	asCfsuCfaUfuGfuCfaaaAfgGfuGfuGfcsusu
AD-59697.1	A-121076.1	UfsgsAfaAfcCfaAfAfGfgCfgAfgAfaAfl96	A-121077.1	usUfsuUfuCfuCfgCfcuuUfgGfuUfuCfasusa

**Tabela 9.** Rastreio de dose única de CFB em Células Hep3B

	10 nM	0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60315.1	22,82	17,15	20,03	9,73
AD-60326.1	9,33	17,49	0,29	4,75
AD-60303.1	8,45	28,08	4,67	10,75
AD-60331.1	14,47	29,99	4,36	4,99
AD-60344.1	17,61	30,59	6,96	1,70
AD-60345.1	8,98	33,88	0,65	7,11
AD-60319.1	14,36	33,98	1,17	12,16
AD-60308.1	12,64	34,07	0,19	11,41
AD-60332.1	20,19	35,92	3,53	3,23
AD-60313.1	23,94	38,26	19,92	13,16
AD-60321.1	13,32	46,50	4,83	1,00
AD-60327.1	18,44	50,40	6,45	5,21
AD-60302.1	13,82	53,31	4,21	12,46
AD-60325.1	11,73	54,59	0,27	15,34
AD-60337.1	16,17	56,04	3,64	33,50
AD-60333.1	17,72	65,14	2,22	8,79
AD-60314.1	27,79	67,44	2,02	9,10
AD-60320.1	18,12	85,78	5,39	33,24
AD-60339.1	20,86	88,73	9,59	10,47
AD-60338.1	18,14	91,03	4,11	10,07
AD-60307.1	21,76	91,13	3,49	43,21
AD-60309.1	20,64	95,13	0,34	53,77
AD-60343.1	61,82	112,57	5,56	17,11
AD-60324.1	24,20	81,08	3,41	18,95
AD-60318.1	43,11	99,07	13,83	17,69
AD-60300.1	35,21	111,33	5,35	12,86
AD-60330.1	58,80	111,85	8,86	32,76
AD-60306.1	85,87	113,97	12,01	33,11
AD-60336.1	35,90	119,80	3,75	4,92
AD-60301.1	28,95	121,90	7,73	23,23
AD-60342.1	49,16	123,56	17,53	14,88
AD-60334.1	26,12	55,28	22,52	7,86
AD-60304.1	20,62	74,38	4,43	16,50
AD-60310.1	18,93	77,08	0,87	35,20
AD-60328.1	63,55	86,20	1,91	4,07
AD-60322.1	81,67	86,30	21,22	25,58
AD-60316.1	105,01	93,22	8,55	14,39
AD-60346.1	109,11	99,09	2,07	25,51
AD-60335.1	42,63	101,00	5,91	54,15
AD-60323.1	81,31	103,20	4,03	3,86

	10 nM	0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60340.1	50,41	109,25	20,73	1,67
AD-60305.1	30,06	114,59	5,00	17,97
AD-60317.1	102,87	126,87	1,95	30,25
AD-60329.1	106,30	131,90	0,20	53,49
AD-60341.1	112,98	137,99	3,94	31,92
AD-60311.1	162,39	140,07	10,04	63,65

**Tabela 10.** Rastreio de dose única de CFB em Hepatócitos Primários de Camundongo

	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60302.1	112,73	109,72	15,29	1,75
AD-60303.1	119,44	102,70	0,15	23,82
AD-60307.1	67,92	99,67	2,91	6,47
AD-60308.1	116,89	111,68	12,15	4,51
AD-60309.1	100,72	112,85	10,72	4,84
AD-60313.1	50,21	102,05	10,08	4,13
AD-60314.1	74,12	113,15	4,99	12,59
AD-60315.1	101,22	104,79	6,07	29,27
AD-60319.1	18,56	81,28	4,22	6,27
AD-60320.1	103,08	123,28	8,71	18,51
AD-60321.1	45,03	104,98	3,91	25,35
AD-60325.1	121,99	127,67	4,63	24,72
AD-60326.1	55,24	102,10	4,66	13,35
AD-60327.1	79,42	108,21	4,77	21,99
AD-60331.1	4,51	52,03	0,35	8,06
AD-60332.1	115,05	120,93	6,06	4,00
AD-60333.1	102,19	113,88	0,38	31,81
AD-60337.1	3,93	31,08	1,12	0,49
AD-60338.1	120,85	115,74	9,02	8,93
AD-60339.1	16,97	75,02	0,27	10,17
AD-60343.1	126,10	131,79	24,11	14,66
AD-60344.1	8,06	35,14	0,31	11,86
AD-60345.1	132,64	133,75	7,96	27,82
AD-60300.1	27,05	81,40	8,63	8,86
AD-60301.1	10,24	72,49	0,46	5,41
AD-60306.1	97,07	114,32	4,87	18,27
AD-60318.1	37,73	98,00	3,09	7,56
AD-60324.1	42,83	99,93	1,21	12,09
AD-60330.1	70,05	116,47	1,46	15,23
AD-60336.1	31,97	95,19	13,63	1,75
AD-60342.1	38,22	108,31	4,90	6,76

	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60304.1	7,88	18,03	3,57	18,03
AD-60305.1	13,09	64,61	2,19	11,26
AD-60310.1	1,36	21,17	0,24	1,27
AD-60311.1	2,11	28,70	0,22	4,79
AD-60316.1	2,23	28,29	1,11	4,66
AD-60317.1	60,25	84,11	5,23	5,66
AD-60322.1	70,53	115,47	1,47	11,72
AD-60323.1	108,71	117,31	17,38	7,90
AD-60328.1	4,04	38,52	0,21	10,03
AD-60329.1	6,73	36,47	0,21	8,72
AD-60334.1	49,74	99,41	2,74	8,64
AD-60335.1	34,99	99,57	3,64	1,59
AD-60340.1	99,13	106,94	5,71	9,81
AD-60341.1	92,74	112,17	0,34	8,10
AD-60346.1	5,65	53,30	0,52	5,28

**Tabela 11.** Rastreio de resposta à dose de CFB em Células Hep3B

ID do Dúplex	Hep3B IC50(nM)
AD-60303.1	0,119
AD-60326.1	0,062
AD-60319.1	0,351
AD-60331.1	0,225
AD-60337.1	0,418
AD-60344.1	0,347
AD-60304.1	>10
AD-60324.1	7,039

**Tabela 12.** Rastreio de resposta à dose de CFB em Hepatócitos Primários de Camundongo

ID do Dúplex	PrimáriosCamundongo IC50(nM)
AD-60303.1	Não alcançado
AD-60326.1	4,063
AD-60319.1	0,162
AD-60331.1	0,031
AD-60337.1	0,014
AD-60344.1	0,003
AD-60304.1	0,028
AD-60324.1	0,854

**Tabela 13.** Rastreio de dose única de C9 em Hepatócitos Primários de Camundongo

ID do Dúplex	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-59663.1	5,92	27,33	2,13	16,40
AD-59664.1	83,71	76,56	42,80	21,75
AD-59665.1	91,76	85,56	20,62	26,31
AD-59668.1	30,66	49,06	4,23	13,47
AD-59669.1	95,36	64,74	18,69	19,30
AD-59670.1	96,91	103,65	26,38	7,23
AD-59673.1	22,34	31,20	7,34	20,44
AD-59674.1	12,16	45,36	5,13	14,79
AD-59675.1	93,18	109,59	3,77	8,45
AD-59678.1	47,33	47,23	14,22	6,86
AD-59679.1	98,53	30,06	12,88	32,30
AD-59680.1	33,75	86,68	1,20	28,07
AD-59683.1	25,81	44,31	9,78	23,12
AD-59684.1	58,89	96,75	16,45	21,05
AD-59685.1	68,90	115,36	8,17	6,36
AD-59688.1	32,69	41,63	6,49	21,72
AD-59689.1	86,86	102,46	24,47	0,38
AD-59690.1	101,98	131,95	4,87	0,16
AD-59692.1	33,98	36,81	9,73	3,38
AD-59693.1	84,70	75,60	35,91	16,09

ID do Dúplex	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-59694.1	108,88	132,73	2,53	45,43
AD-59696.1	32,87	45,82	9,72	15,79
AD-59697.1	110,00	120,20	1,21	3,98
AD-1955	109,44	92,04	24,08	32,14
AD-1955	105,93	104,33	4,54	6,01
AD-1955	87,62	93,01	6,11	3,30
AD-1955	90,95	117,91	3,90	29,31
AD-1955	91,04	93,49	6,80	8,35
AD-1955	106,63	107,78	1,44	9,89
AD-1955	95,33	82,10	9,45	2,92
AD-1955	123,15	121,27	44,13	11,42

**Tabela 14.** Rastreio de dose única de C3 em Hepatócitos Primários de Camundongo

ID do Dúplex	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60149.1	0,08	33,89	0,04	44,73
AD-60151.1	0,11	81,49	0,14	7,88
AD-60152.1	1,72	92,02	0,89	9,34
AD-60153.1	93,57	97,06	17,16	4,16
AD-60154.1	97,73	122,73	0,66	28,17
AD-60155.1	12,94	91,38	17,39	9,28
AD-60156.1	8,02	41,58	9,16	56,27
AD-60157.1	23,61	98,22	33,22	8,77
AD-60158.1	0,75	77,42	0,76	8,61
AD-60159.1	100,47	93,53	11,61	7,44
AD-60160.1	89,34	92,97	18,42	9,21
AD-60161.1	2,33	82,37	0,32	21,06
AD-60162.1	60,59	46,83	1,37	65,96
AD-60163.1	104,09	53,32	5,42	75,38
AD-60164.1	61,13	40,41	5,57	57,13
AD-60165.1	61,93	86,61	4,44	11,53
AD-60166.1	2,27	96,48	0,70	17,52
AD-60167.1	87,51	84,41	3,70	9,19
AD-60168.1	35,16	98,47	0,28	20,95
AD-60169.1	0,42	51,78	0,13	18,79

ID do Dúplex	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60170.1	125,00	99,12	1,46	12,72
AD-60171.1	0,44	59,53	0,01	1,82
AD-60172.1	89,05	102,11	4,20	10,62
AD-60173.1	81,29	95,39	16,08	3,86
AD-60174.1	0,06	25,26	0,02	31,64
AD-60175.1	0,89	80,59	0,23	6,61
AD-60176.1	0,88	52,71	0,02	6,12
AD-60177.1	63,14	85,00	16,41	9,25
AD-60178.1	42,97	64,33	4,75	14,00
AD-60179.1	0,12	54,36	0,01	6,05
AD-60180.1	94,57	98,11	13,68	5,65
AD-60181.1	69,28	85,66	6,99	31,48
AD-60182.1	84,22	79,05	2,63	8,99
AD-60183.1	0,08	44,17	0,05	7,27
AD-60184.1	80,50	81,13	9,59	14,73
AD-60185.1	92,21	99,75	12,00	2,32
AD-60186.1	60,60	93,85	18,81	29,73
AD-60187.1	2,33	71,77	0,20	1,49
AD-60188.1	0,33	78,13	0,37	14,56
AD-60189.1	57,75	91,38	43,16	14,16
AD-60190.1	29,40	94,84	41,57	7,55
AD-1955	103,85	90,86	8,96	3,45
AD-1955	71,27	115,36	36,17	13,40
AD-1955	99,16	95,85	5,16	8,09
AD-1955	112,29	104,37	3,65	12,88
AD-1955	108,44	97,01	1,40	0,36
AD-1955	118,26	109,90	2,10	12,76
AD-1955	98,09	98,72	11,81	1,81

**Tabela 15.** Rastreio de dose única de C3 em células Hep3B

ID do Dúplex	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60149.1	7,49	55,90	7,75	4,41
AD-60151.1	24,05	101,65	14,22	8,27
AD-60152.1	16,58	112,51	10,66	19,82

ID do Dúplex	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60153.1	20,13	22,40	22,87	3,76
AD-60154.1	24,21	112,90	8,93	25,58
AD-60155.1	20,48	68,97	2,10	1,73
AD-60156.1	18,22	66,39	0,80	1,67
AD-60157.1	29,07	125,72	5,80	8,08
AD-60158.1	81,03	105,18	14,03	14,20
AD-60159.1	27,58	92,91	4,77	2,22
AD-60160.1	11,49	60,48	4,68	11,60
AD-60161.1	27,49	80,57	10,88	16,13
AD-60162.1	49,58	89,22	3,76	6,06
AD-60163.1	91,18	99,19	5,14	21,40
AD-60164.1	33,93	85,93	4,07	1,00
AD-60165.1	5,54	13,05	0,43	2,69
AD-60166.1	35,21	81,66	21,31	14,48
AD-60167.1	106,64	115,02	8,09	39,17
AD-60168.1	26,91	92,99	2,50	5,86
AD-60169.1	10,66	49,63	6,66	17,36
AD-60170.1	52,73	104,43	2,71	22,03
AD-60171.1	23,77	60,35	7,94	7,27
AD-60172.1	143,57	99,22	8,09	11,58
AD-60173.1	100,25	108,80	12,25	44,49
AD-60174.1	16,68	92,68	0,45	45,25
AD-60175.1	24,94	42,14	4,74	7,68
AD-60176.1	17,30	66,19	8,83	13,81
AD-60177.1	50,71	116,18	20,19	1,49
AD-60178.1	22,65	90,84	5,82	15,23
AD-60179.1	15,21	85,30	3,55	23,07
AD-60180.1	45,91	93,35	16,19	28,54
AD-60181.1	63,50	109,82	10,07	14,56
AD-60182.1	110,82	121,62	1,09	6,78
AD-60183.1	13,82	69,24	8,64	3,35
AD-60184.1	26,47	97,94	9,64	9,88
AD-60185.1	41,42	103,45	7,77	2,47
AD-60186.1	72,24	88,39	6,37	51,31
AD-60187.1	9,49	51,15	3,28	11,65
AD-60188.1	55,44	95,66	7,05	30,36

ID do Dúplex	Média 10 nM	Média 0,1 nM	DP de 10 nM	DP de 0,1 nM
AD-60189.1	52,59	89,41	4,25	20,79
AD-60190.1	16,67	95,38	1,22	11,83

**Tabela 16.** Rastreio de resposta à dose de C3 em hepatócitos primários de camundongo

ID do Dúplex	PMH IC50(nM)
AD-60149.1	0,03
AD-60152.1	1,03
AD-60156.1	0,19
AD-60165.1	1,96
AD-60169.1	0,04
AD-60171.1	0,04
AD-60174.1	0,01
AD-60175.1	0,54
AD-60176.1	0,05
AD-60179.1	0,03
AD-60183.1	0,03
AD-60187.1	0,24

**Tabela 17.** Rastreio de resposta à dose de C3 em células Hep3B

ID do Dúplex	Hep3B IC50(nM)
AD-60149.1	0,88
AD-60152.1	2,87
AD-60156.1	2,06
AD-60165.1	0,08
AD-60169.1	0,41
AD-60171.1	5,51
AD-60174.1	2,60
AD-60175.1	0,48
AD-60176.1	2,29

AD-60179.1	1,70
AD-60183.1	0,94
AD-60187.1	1,65

### **Exemplo 3. Rastreio in vivo**

[00673] Um subconjunto de três RNAi conjugados com CFB e GalNAc foi selecionado para avaliação adicional *in vivo*, AD-60304, AD-60331 e AD-60344. As sequências de nucleótidos das fitas senso e antissenso destes agentes de RNAi são fornecidas na Tabela 18. Como indicado na Tabela 19, a sequência de nucleotídeos de AD-60304 é uma correspondência perfeita com as sequências de nucleotídeos de camundongo e rato. A sequência de nucleotídeos de AD-60331 e a sequência de nucleotídeos de AD-60344 têm não correspondências de nucleotídeos ("MM"; ver negrito, nucleotídeos sublinhados) para o gene de camundongo, mas têm atividade em hepatócitos de camundongo.

[00674] Camundongos C57BL/6 (N = 3 por grupo) foram injetados subcutaneamente quer com 1 mg/kg ou 10 mg/kg de dúplexes conjugados com GalNAc ou um volume igual de 1x Solução Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco (DPBS) (Life Technologies, # da Cat 14040133). Noventa e seis horas mais tarde, os camundongos foram eutanasiados e os fígados foram dissecados e congelados instantaneamente em nitrogênio líquido. Os fígados foram triturados em um Geno/Triturador 2000 (SPEX SamplePrep, Metuchen, NJ). Aproximadamente 10 mg de fígado pulverizado por amostra foram usadas para isolamento de RNA. As amostras foram primeiramente homogeneizadas em um TissueLyserII (Qiagen Inc, Valencia, CA) e depois o RNA foi extraído usando um Estojo de Tecido Universal RNeasy 96 (Qiagen Inc, # da Cat 74881) seguindo o protocolo do fabricante usando tecnologia vácuo/spin. A concentração de RNA foi medida por um NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) e foi ajustada para 100 ng/µL. O cDNA foi preparado e RT-PCR foram

realizado como descrito acima.

[00675] A Figura 2 demonstra a eficácia do RNAi de CFB para inibir o mRNA de CFB a uma dose de 1 mg/kg ou 10 mg/kg. Na dose de 10 mg/kg, foi observada uma média de cerca de 80% de silenciamento para todos os três RNAi testados. Na dose de 1 mg/kg, foi observada uma média de cerca de 30% de silenciamento para AD-60331 e AD-60344.

[00676] A capacidade de AD-60331 para suprimir a expressão *in vivo* do mRNA de CFB também foi avaliada utilizando uma dose única de 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg e 10 mg/kg. Os camundongos C57BL/6 foram injetados subcutaneamente com as doses anteriores e setenta horas mais tarde, camundongos foram eutanasiados. Isolamento de RNA dos fígados dos animais, preparação de cDNA e RT-PCR foram realizados como descrito acima. A Figura 3 demonstra que o AD-60331 reduz o mRNA de CFB de uma maneira responsiva à dose, com uma ED<sub>50</sub> de cerca de 2,5 mg/kg. É esperado que quando introduzido em seres humanos, estes RNAi vão ser ainda mais eficazes dado o desenho das sequências.

**Tabela 18.**

Dúplex	Sequência Senso (SEQ ID N <sup>os</sup> 481-483, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Sequência Antissenso (SEQ ID N <sup>os</sup> 484-486, respectivamente, por ordem de aparecimento)	espécies
AD-60304.1	GfsasUfuGfaGfaAfGfGfuGfgCfgAfgUfuAfl96	usAfsaCfuCfgCfcAfccuUfcUfcAfaUfc sasa	MR
AD-60331.1	AfsgsCfaAfcAfuGfUfGfuUfcAfaAfgUfc Afl96	usGfsaCfuUfuGfaAfcacAfuGfuUfgCf uscsa	HC
AD-60344.1	GfscsUfgUfgGfuGfUfCfuGfaGfuAfcUfu Ufl96	asAfsaGfuAfcUfcAfgacAfcCfaCfaGfc scsc	HC

**Tabela 19.**

Dúplex	Antissenso MM para camundongo (negrito, sublinhado) (SEQ ID N <sup>o</sup> s 487-489, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Antissenso MM para rato (negrito, sublinhado) (SEQ ID N <sup>o</sup> s 490-492, respectivamente, por ordem de aparecimento)	Primários Camundongo IC50(nM)	Hep3b IC50(nM)
AD-60304.1	UAACUCGCCACCUUC UCAAUCAA	UAACUCGCCACCUUCUCAAUCAA	0,028	2,876
AD-60331.1	UGACUUU <u>G</u> AACACAU <u>G</u> UUGCUC	UGAC <u>U</u> UGAACACACAU <u>G</u> UUGCUC	0,031	0,225
AD-60344.1	<u>A</u> AAGUACUCAGACAC CAC <u>A</u> GCCC	<u>A</u> AAGUACUC <u>A</u> GACACCAC <u>A</u> GCCC	0,017	0,347

## REIVINDICAÇÕES

1. Ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão do fator B do complemento (CFB) em uma célula, caracterizado pelo fato de que

o referido dsRNA compreende uma fita senso e uma fita antissenso formando uma região de fita dupla,

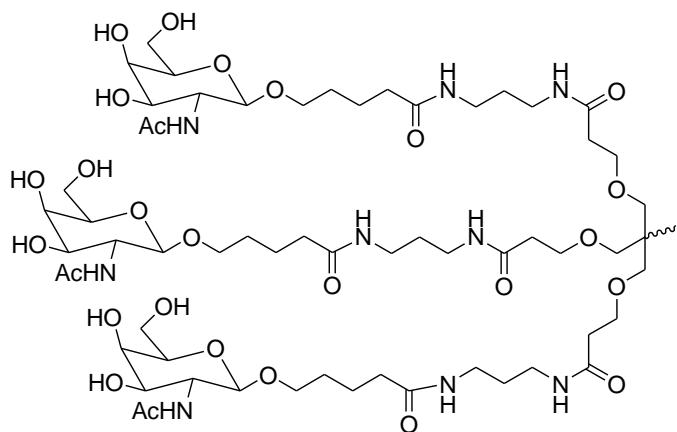
a fita senso e a fita antissenso apresentam, cada uma independentemente, 19-23 nucleotídeos de comprimento,

a referida fita senso compreende pelo menos 19 nucleotídeos contíguos da sequência nucleotídica 5'-AUUCCUGAAUUUAUGACUAU-3' (SEQ ID NO: 41) e a referida fita antissenso compreende pelo menos 21 nucleotídeos contíguos que diferem em não mais que 1 nucleotídeo da sequência nucleotídica 5'-AUAGUCUAAAAUUCAGGAAUUC-3' (SEQ ID NO:72),

todos os nucleotídeos da fita senso e todos os nucleotídeos da fita antissenso compreendem, independentemente, uma modificação de nucleotídeos selecionada do grupo que consiste em modificações de nucleotídeos 2'-O-metil, 2'-flúor e 2'-desoxi,

o referido dsRNA compreende ainda pelo menos uma ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato, e

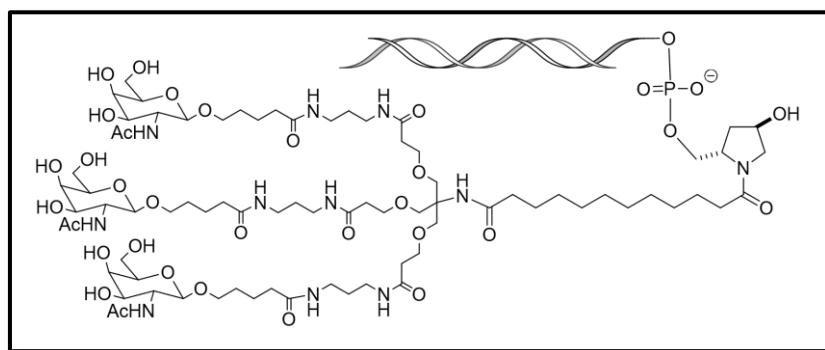
a extremidade 3' da fita senso é conjugada a um ligante que é



2. dsRNA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado

pelo fato de que a fita senso compreende duas ligações internucleotídicas de fosforotioato no terminal 5' e a fita antissenso compreende duas ligações internucleotídicas de fosforotioato no terminal 5' e duas ligações internucleotídicas de fosforotioato no terminal 3'.

3. dsRNA, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o dsRNA é conjugado ao ligante conforme mostrado no seguinte esquema



4. dsRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a região de fita dupla apresenta 19-21 pares de nucleotídeos de comprimento.

5. dsRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a região de fita dupla apresenta 21-23 pares de nucleotídeos de comprimento.

6. dsRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que cada fita apresenta, independentemente, 21-23 nucleotídeos de comprimento.

7. Composição farmacêutica para inibição da expressão de um gene do fator B do complemento, caracterizada pelo fato de que compreende o dsRNA, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o dsRNA está presente em uma solução não tamponada.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a referida solução não tamponada é solução salina ou água.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o referido dsRNA está presente em uma solução tampão.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a referida solução tampão compreende acetato, citrato, prolamina, carbonato, ou fosfato ou qualquer combinação dos mesmos.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a referida solução tampão é solução salina tamponada com fosfato (PBS).

13. Método *in vitro* de inibição da expressão do fator B do complemento (CFB) em uma célula, o método sendo caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) contato da célula com o dsRNA, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou com a composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 12; e

(b) manutenção da célula produzida na etapa (a) durante um tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de mRNA de um gene CFB, inibindo deste modo a expressão do gene CFB na célula.

14. Uso do dsRNA, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou da composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 12, caracterizado pelo fato que é para a fabricação de um medicamento para o tratamento de um indivíduo com uma doença associada a um componente do complemento, selecionada do grupo que consiste em hemoglobinúria

paroxística noturna (PNH), asma, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, psoríase, dermatomiosite penfigoide bolhosa, síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS), síndrome urêmica hemolítica relacionada a *E. coli* de toxina Shiga, miastenia gravis, neuromielite ótica, doença do depósito denso, degeneração macular relacionada com a idade, doença da aglutinina fria, vasculite associada a anticorpos citoplasmáticos antineutrófilo, rejeição de transplante humorar e vascular, disfunção de enxerto, infarto do miocárdio, um recipiente sensibilizado de um transplante, e sepse.

15. Uso de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a doença associada ao componente do complemento é hemoglobinúria paroxística noturna (PNH) ou síndrome urêmica hemolítica atípica (aHUS).

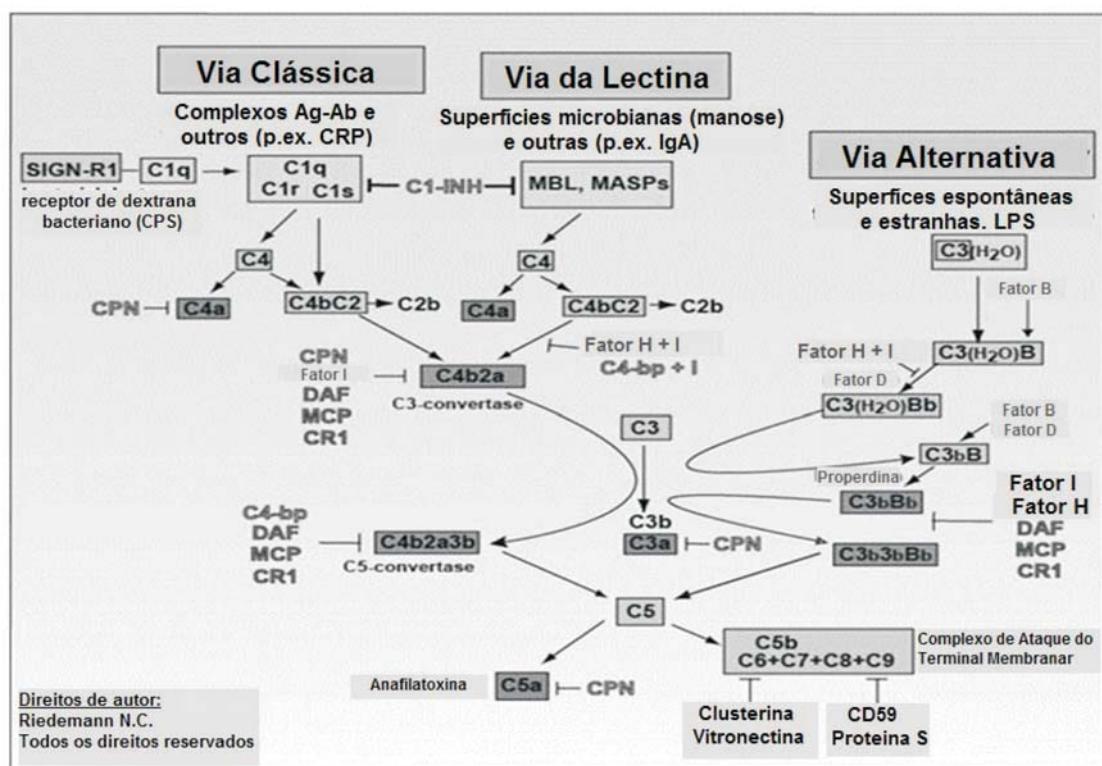


Figura 1

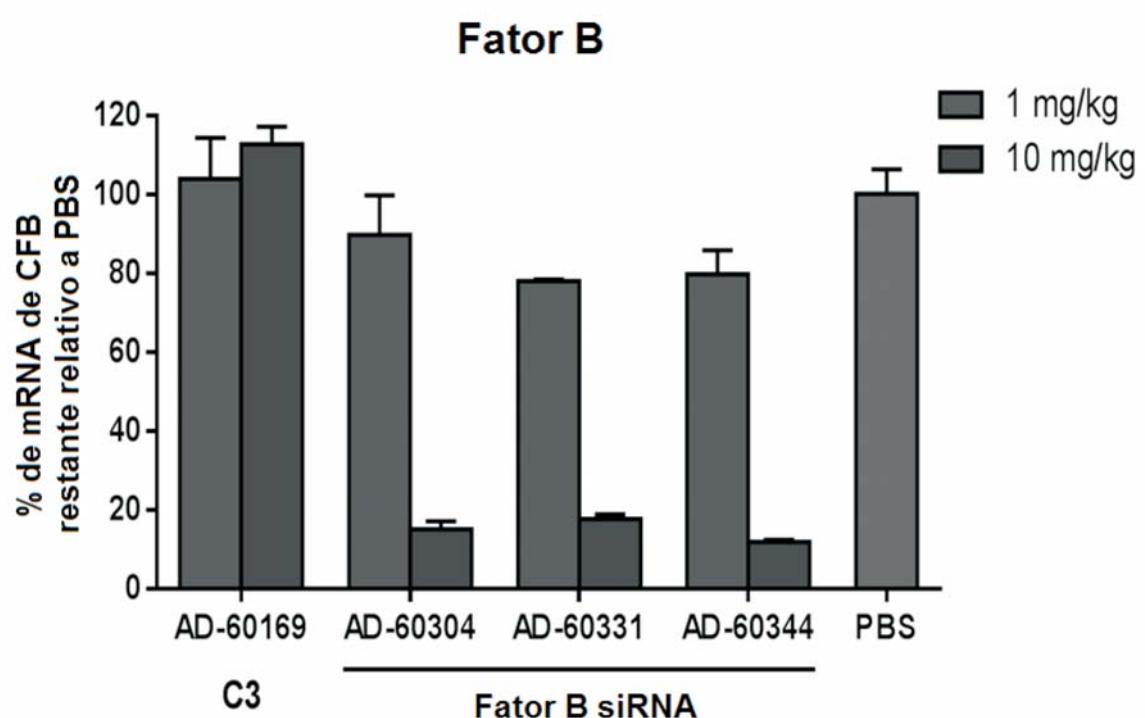


Figura 2

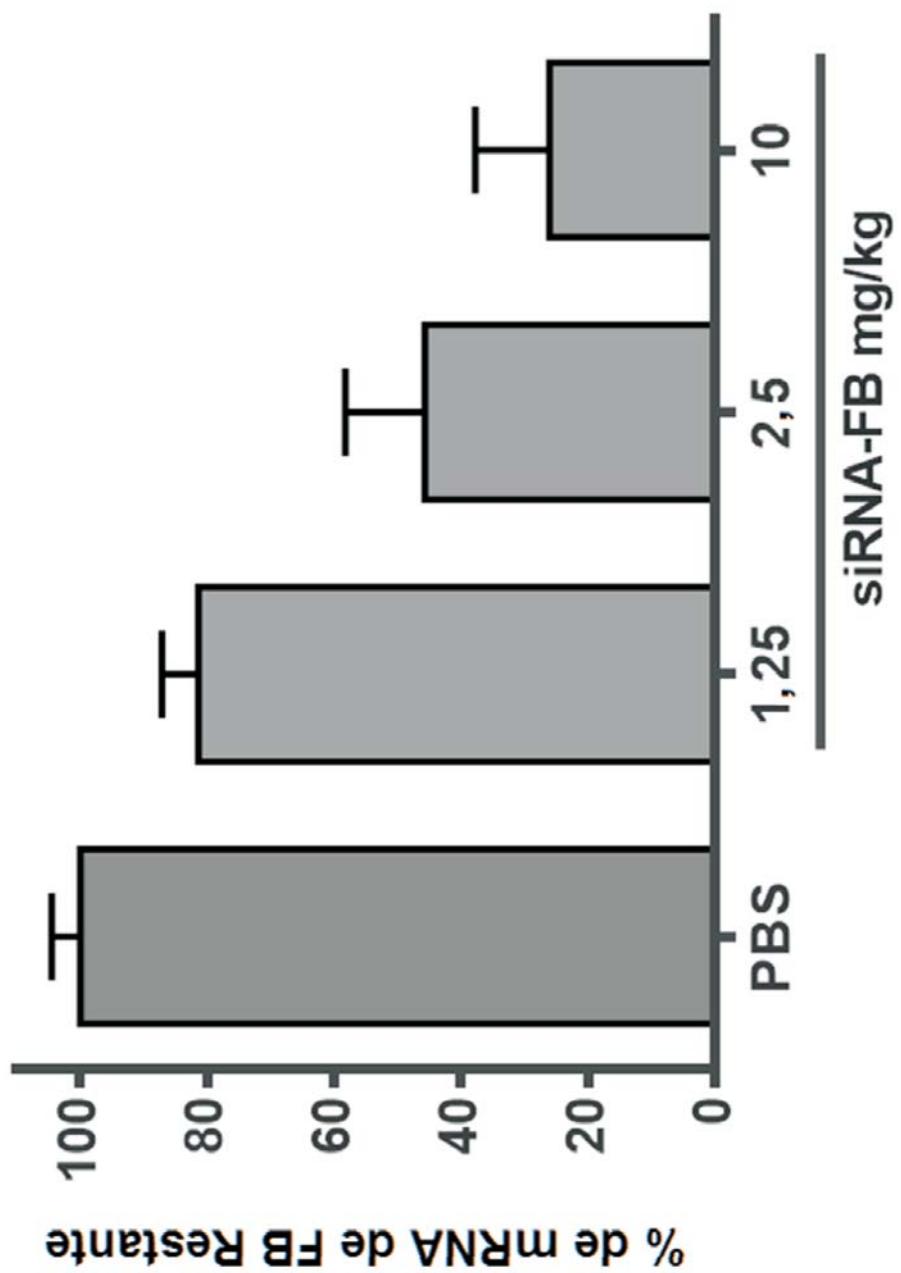


Figura 3