

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202392937** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2024.02.14

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.04.20

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ КОМПОНЕНТА 3 СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА**

---

(31) 63/177,254

(32) 2021.04.20

(33) US

(86) PCT/US2022/025648

(87) WO 2022/226127 2022.10.27

(71) Заявитель:  
АСТРАЗЕНЕКА АЙЭЛЕНД  
ЛИМИТЕД (IE)

(72) Изобретатель:

Лазаро Мелисса, Макнайт Сьюзан  
Фаас, Дудек Хенрык Т., Пак Чжихэ,  
Браун Боб Дейл, Лаи Чэнцзюн, Ким  
СонКвон (US)

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

---

(57) В данном документе описаны олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi), содержащие смысловую и антисмысловую нити для нацеливания на mRNA компонента 3 (C3) системы комплемента. Олигонуклеотид для RNAi можно использовать для подавления экспрессии, уровней и/или активности C3 в клетке. Также в данном документе описаны способы применения олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) для профилактики или лечения заболевания, нарушения или состояния, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента.

**202392937**  
**A1**

**202392937**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579497EA/055

### КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ КОМПОНЕНТА 3 СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

#### ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка подана вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием 50694-093WO3\_Sequence\_Listing\_4\_18\_22\_ST25\_FINAL, созданного 20 апреля 2021 года, размер которого составляет 77827 байт. Информация о перечне последовательностей в электронном формате включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Система комплемента играет центральную роль в клиренсе иммунных комплексов и в иммунных ответах на возбудителей инфекций, чужеродные антигены, клетки, инфицированные вирусами, и опухолевые клетки. Система комплемента состоит из группы из более чем 50 белков, которые образуют часть врожденной иммунной системы. Система комплемента необходима для защиты организма от микробных инфекций и функционирует для поддержания гемостаза тканей. Система комплемента представляет собой строго регулируемый ферментный каскад, который может быть активирован посредством одного из трех путей: классического пути, при котором комплексы с антителами вызывают активацию, альтернативного пути, который конститутивно активирован на низком уровне посредством процесса, называемого "холостой активацией", и который может быть усилен бактериальными патогенами или поверхностями поврежденных тканей, или лектинового пути, который инициируется остатками маннозы, присутствующими у некоторых микроорганизмов, включая некоторые бактерии, грибы и вирусы. Неконтролируемая активация или недостаточная регуляция пути системы комплемента может привести к системному воспалению, клеточному повреждению и угрозе для тканей. Таким образом, путь системы комплемента вовлечен в патогенез ряда различных заболеваний. Подавление или модуляция активности пути системы комплемента признана в качестве перспективной терапевтической стратегии. Количество вариантов лечения, доступных для таких заболеваний, является ограниченным. Таким образом, разработка инновационных стратегий для лечения заболеваний, ассоциированных с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, представляет собой значительную неудовлетворенную потребность.

Независимо от того, какой путь системы комплемента инициирует процесс, активация системы комплемента сводится к компоненту 3 системы комплемента (C3) в каскаде. Белок C3 является ключевым в управлении несколькими критическими биологическими процессами, включающими активацию системы комплемента, опсонизацию и удаление патогенов, иммунных комплексов и поврежденных клеток и регуляцию гуморального иммунитета и Т-клеточных адаптивных иммунных ответов.

C3 представляет собой интегральный белок в системе комплемента, который способствует инициации каскада пути системы комплемента. Активация C3 посредством классического пути, альтернативного пути или лектинового пути приводит к расщеплению C3 с образованием продуктов расщепления C3a и C3b. C3a представляет собой мощный анафилатоксин и хемоаттрактант для нейтрофилов, эозинофилов и тучных клеток. C3b участвует в образовании C3-конвертазы в альтернативном пути и C5-конвертаз во всех трех путях системы комплемента, что, в свою очередь, запускает каскад системы комплемента с дополнительной активацией последующих терминальных компонентов системы комплемента. Расщепление C5 приводит к образованию C5a, также мощного хемотаксического драйвера и анафилатоксина, и C5b, который быстро собирается с белками C6, 7, 8 и 9 системы комплемента в порообразующий комплекс C5b-9 на поверхностях патогена или ткани. В результате C3 может представлять собой идеальную мишень для подавления или сайленсинга с целью селективного подавления пути системы комплемента в качестве способа лечения заболеваний, ассоциированных с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе описаны олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi, включая олигонуклеотиды со смысловой и антисмысловой нитью), которые нацеливаются на компонент системы комплемента (C3), который, как известно, играет роль в активации пути системы комплемента. Олигонуклеотиды для RNAi или их фармацевтически приемлемую соль (например, их натриевую соль) можно использовать для лечения пациентов с заболеваниями, ассоциированными с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента.

В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль для снижения экспрессии компонента 3 системы комплемента (C3), содержащий смысловую нить и антисмысловую нить, в котором смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплексную область. Антисмысловая нить содержит область комплементарности целевой последовательности mRNA C3 под SEQ ID NO: 13 или 14, и длина области комплементарности составляет по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина смысловой нити составляет от 15 до 50 нуклеотидов (например, длина составляет 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 и 50 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления длина смысловой нити составляет от 18 до 36 нуклеотидов (например, длина составляет 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 и 36 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой нити составляет от 15 до 30 нуклеотидов (например, длина составляет 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления длина антисмысловой нити составляет 22 нуклеотида, и антисмысловая нить и смысловая нить образуют дуплексную область длиной по меньшей мере 19 нуклеотидов, необязательно длиной по меньшей мере 20 нуклеотидов. В некоторых

вариантах осуществления длина смысловой нити составляет 36 нуклеотидов, и антисмысловая нить и смысловая нить образуют дуплексную область длиной по меньшей мере 19 нуклеотидов, необязательно длиной по меньшей мере 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина области комплементарности составляет по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, необязательно длина составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой нити содержит структуру стебель-петля, представленную как S1-L-S2, где S1 комплементарен S2, и где L образует петлю между S1 и S2 длиной 3-5 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой тройную петлю или четверную петлю. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой четверную петлю. В некоторых вариантах осуществления четверная петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления длина S1 и S2 составляет 1-10 нуклеотидов, при этом S1 и S2 необязательно характеризуются одинаковой длиной. В некоторых вариантах осуществления длина S1 и S2 составляет 1 нуклеотид, 2 нуклеотида, 3 нуклеотида, 4 нуклеотида, 5 нуклеотидов, 6 нуклеотидов, 7 нуклеотидов, 8 нуклеотидов, 9 нуклеотидов или 10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина S1 и S2 составляет 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления область стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 7 (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100% идентичностью с SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления область стебель-петля содержит SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления стебель-петля содержит нуклеиновую кислоту, содержащую до 1, 2 или 3 замен, вставок или делеций относительно SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит последовательность 3'-выступа длиной один или несколько нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 3'-выступающую последовательность из по меньшей мере 2 соединенных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления длина последовательности 3'-выступа составляет 2 нуклеотида, где необязательно последовательность 3'-выступа представляет собой GG.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить и антисмысловые нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из (a) SEQ ID NO: 1 и 3 соответственно и (b) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, и антисмысловая нить содержит

нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 38, как показано в соединении А. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 39, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 40, как показано в соединении В. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 41, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 42, как показано в соединении С. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 43, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 44, как показано в соединении D. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 45, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 46, как показано в соединении E. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 47, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 48, как показано в соединении F. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 49, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 50, как показано в соединении G. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 51, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 52, как показано в соединении H. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 53, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 54, как показано в соединении I.

В данном документе представлен олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль, содержащие смысловую нить и антисмысловую нить, в которых смысловая нить содержит последовательность нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4, и антисмысловая нить содержит последовательность нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью

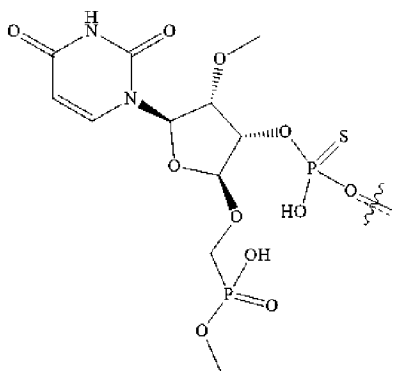
последовательности с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить характеризуется по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4, и антисмысловая нить характеризуется по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% или 99%) идентичностью последовательности с по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4, и антисмысловая нить содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6. В других вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить характеризуется по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 6.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит область стебель-петля, которая не комплементарна антисмысловой нити, и дуплексную область, которая в значительной степени комплементарна антисмысловой нити. В другом варианте осуществления длина дуплексной области составляет от 20 до 22 нуклеозидов.

В других вариантах осуществления область стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99%) идентичностью с SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления область стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98% и 99%) идентичностью SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления область стебель-петля содержит SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления 4'-углерод сахара 5'-нуклеотида антисмысловой нити содержит фосфатный аналог. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат уридин в первом положении 5'-конца антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления уридин содержит фосфатный аналог. В некоторых вариантах осуществления фосфатный аналог представляет собой 4'-*O*-монометилфосфонат. В некоторых вариантах осуществления уридин, содержащий фосфатный аналог, содержит следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один (например, по меньшей мере 2, 5, 10, 15, 20, 30 и 40) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит от 20 до 50 модифицированных нуклеотидов (например, 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 и 50 модифицированных олигонуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит от 20 до 40 (например, от 25 до 40, от 30 до 40, от 35 до 40, от 30 до 35, от 25 до 35, от 20 до 25, от 21 до 30 и от 31 до 40) модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды олигонуклеотида являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один (например, по меньшей мере 2, 5, 10, 15, 20, 30 и 40) модифицированный нуклеотид содержит 2'-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 2'-модификация представляет собой 2'-фтор или 2'-О-метил, где необязательно 2'-фтормодификация представляет собой 2'-фтордезоксирибонуклеозид, и/или 2'-О-метилмодификация представляет собой 2'-О-метилрибонуклеозид.

В одном варианте осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат от 40 до 50 (например, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50) 2'-О-метилмодификаций, при этом необязательно олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат от 40 до 50 (например, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50) 2'-О-метилрибонуклеозидов. В одном варианте осуществления по меньшей мере один (например, по меньшей мере 2, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 и по меньшей мере 30) из нуклеотидов 1-7, 11-27 и 31-36 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метил, например, 2'-О-метилрибонуклеозида. В одном варианте осуществления от 10 до 30 (например, от 12 до 28, от 12 до 24, от 12 до 20, от 12 до 16, от 16 до 30, от 20 до 30 и от 24 до 30) из нуклеотидов 1-7, 11-27 и 31-36 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, например, 2'-О-метилрибонуклеозида. В одном варианте осуществления все из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, например, 2'-О-метилрибонуклеозида. В некоторых вариантах

осуществления все из нуклеотидов 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-27 и 31-36 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 1, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 и 20-22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метила, например, 2'-О-метилрибонуклеозида.

В другом варианте осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат от 5 до 15 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15) 2'-фтормодификаций, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один (например, по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6 или 7) из нуклеотидов 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 17 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтора, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозида. В другом варианте осуществления от 2 до 4 нуклеотидов из 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 17 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтора, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозида. В другом варианте осуществления все из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтора, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат по меньшей мере одну (например, по меньшей мере 2, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 20 и по меньшей мере 30) модифицированную межнуклеотидную связь. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат фосфоротиоатную связь между нуклеотидами 1 и 2 смысловой нити и нуклеотидами 1 и 2, 2 и 3, 20 и 21 и 21 и 22 антисмысловой нити.

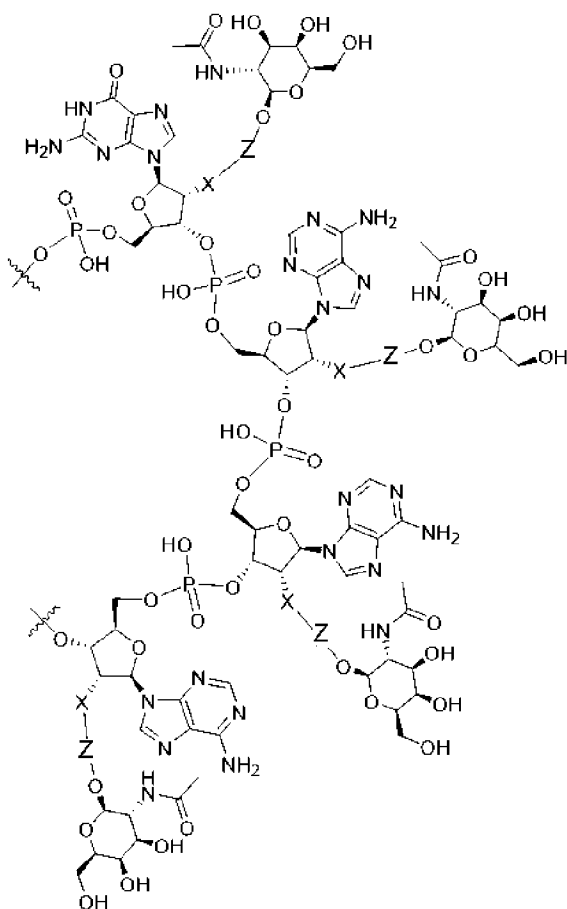
В одном варианте осуществления межнуклеотидная связь между смысловой нитью и антисмысловой нитью отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид олигонуклеотида конъюгирован с одним или несколькими нацеливающими лигандами. В некоторых вариантах осуществления каждый нацеливающий лиганд содержит углевод, аминокислоту, холестерин, полипептид или липид. В некоторых вариантах осуществления каждый нацеливающий лиганд содержит фрагмент из N-ацетилгалактозамина (GalNAc). В некоторых вариантах осуществления фрагмент GalNAc представляет собой моновалентный фрагмент GalNAc, бивалентный фрагмент GalNAc, тривалентный фрагмент GalNAc или тетравалентный фрагмент GalNAc. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержат от одного до пяти фрагментов из 2'-О-N-ацетилгалактозамина (GalNAc), конъюгированных со смысловой нитью. В некоторых вариантах осуществления до 4 нуклеотидов L структуры стебель-петля конъюгированы с моновалентным фрагментом GalNAc. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль



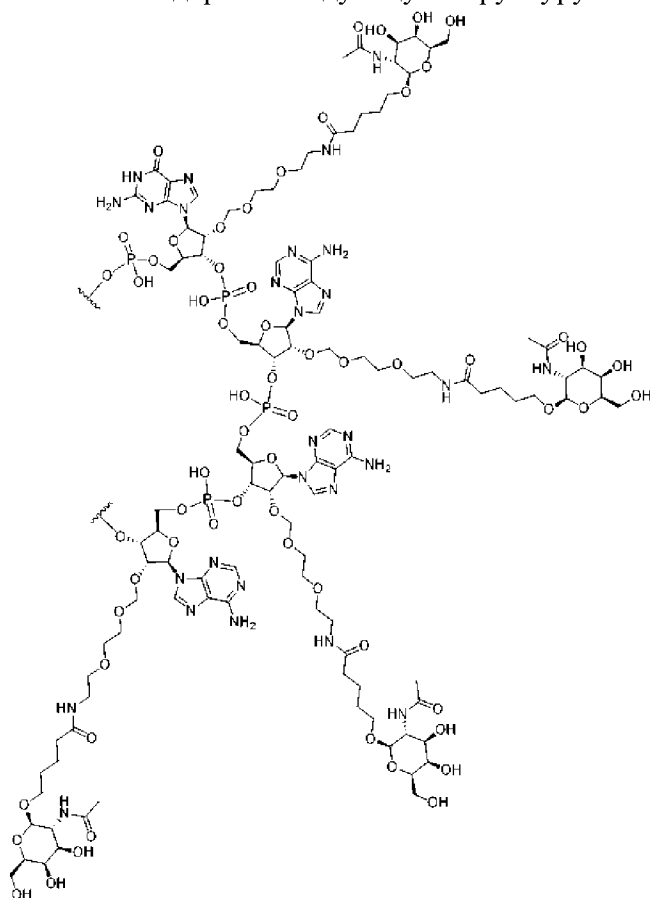
содержат от одного до пяти (например, 2, 3, 4 и 5) фрагментов GalNAc, конъюгированных со смысловой нитью. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один (например, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3) фрагмент GalNAc конъюгирован с областью петли смысловой нити (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления один или несколько нуклеотидов в положениях нуклеотидов 28-30 в смысловой нити конъюгированы с моновалентным фрагментом GalNAc. В некоторых вариантах осуществления каждый из нуклеотидов в положениях 28-30 в смысловой нити конъюгирован с моновалентным фрагментом GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 28-30 в смысловой нити содержат следующую структуру:



Z представляет собой связь, группу для обеспечения возможности реакции клик-химии или линкер длиной от 1 до 20 включительно последовательных ковалентно связанных атомов, выбранный из группы, состоящей из замещенного и незамещенного алкилена, замещенного и незамещенного алкенилена, замещенного и незамещенного алкинилена, замещенного и незамещенного гетероалкилена, замещенного и незамещенного гетероалкенилена, замещенного и незамещенного гетероалкинилена и их комбинаций, и X представляет собой O, S или N. В некоторых вариантах осуществления Z представляет собой ацетальный линкер. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой O. В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 28-30 в смысловой нити содержат следующую структуру:

В некоторых вариантах осуществления нуклеотиды в положениях 28-30 в смысловой нити содержат следующую структуру:



В одном варианте осуществления длина антисмысловой нити составляет от 13 до 27 (например, от 13 до 25, от 13 до 22, от 13 до 20, от 13 до 18, от 13 до 15, от 15 до 27, от 18 до 27, от 20 до 27, от 22 до 27 и от 25 до 27) нуклеотидов. В одном варианте осуществления длина антисмысловой нити составляет 22 нуклеотида.

В другом варианте осуществления длина смысловой нити составляет от 20 до 50 (например, от 22 до 50, от 25 до 50, от 30 до 50, от 35 до 50, от 40 до 50, от 45 до 50, от 20 до 45, от 20 до 40, от 20 до 35, от 20 до 30, от 20 до 25, от 20 до 22) нуклеотидов. В одном варианте осуществления длина смысловой нити составляет от 30 до 40 (например, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 и 40) нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления смысловая нить образует дуплекс с антисмысловой нитью. В некоторых вариантах осуществления дуплексная структура предусматривает дуплекс между всей или частью смысловой нити и всей или частью антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления длина области комплементарности составляет от 20 до 30 (например, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30) нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить и/или смысловая нить содержат 3'-выступ из по меньшей мере 2 (например, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4 или по меньшей мере 5) связанных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль представляют собой двухнитевую рибонуклеиновую кислоту (dsRNA). В некоторых

вариантах осуществления олигонуклеотидов для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль представляют собой однонитевую рибонуклеиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления РНК-олигонуклеотид включает фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая любой из олигонуклеотидов (например, любой из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей), описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен вектор, кодирующий по меньшей мере одну нить любого из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен вектор, кодирующий по меньшей мере одну нить любого из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, описанных в данном документе, содержащий последовательность ДНК под любым из SEQ ID NO: 33-36.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена клетка, содержащая вектор, описанный в данном документе, или любой из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрена клетка, содержащая вектор, описанный в данном документе, или любой из олигонуклеотидов (например, любой из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей), описанных в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, включающий приведение клетки субъекта в контакт с любым из олигонуклеотидов (например, олигонуклеотидов для RNAi), описанных в данном документе, фармацевтической композицией, описанной в данном документе, вектором, описанным в данном документе, или клеткой, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетку приводят в контакт в течение периода времени, достаточного для обеспечения деградации mRNA-транскрипта C3. В некоторых вариантах осуществления экспрессия C3 в клетке снижена. В некоторых вариантах осуществления транскрипция C3 в клетке снижена. В некоторых вариантах осуществления уровень и/или активность C3 в клетке снижены. В некоторых вариантах осуществления уровень и/или активность C3 снижены на от 10% до 100% (например, снижены на от 10% до 90%, от 10% до 80%, от 10% до 70%, от 10% до 60%, от 10% до 50%, от 10% до 40%, от 10% до 30%, от 10% до 20%, от 20% до 100%, от 30% до 100%, от 40% до 100%, от 50% до 100%, от 60% до 100%, от 70% до 100%, от 80% до 100% и от 90% до 100%) относительно уровня и/или активности C3 в клетке субъекта, которому не вводили любой из олигонуклеотидов для

RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления уровень и/или активность C3 снижены на от 50% до 99% (например, от 50% до 90%, от 50% до 80%, от 50% до 70%, от 50% до 60%, от 60% до 99%, от 70% до 99%, от 80% до 99% и от 90% до 99%) относительно уровня и/или активности C3 в клетке субъекта, которому не вводили любой из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен способ снижения экспрессии C3 в клетке, популяции клеток или у субъекта, при этом способ включает стадию i) приведения клетки или популяции клеток в контакт с любым из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, фармацевтической композицией или вектором, описанными в данном документе, или ii) введения субъекту любого из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, описанных в данном документе, фармацевтической композиции или вектора, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии C3 предусматривает снижение количества или уровня mRNA C3, количества или уровня белка C3, или и того и другого. В некоторых вариантах осуществления уровень mRNA C3, уровень белка C3 или и то и другое снижены на от 10% до 100% (например, снижены на от 10% до 90%, от 10% до 80%, от 10% до 70%, от 10% до 60%, от 10% до 50%, от 10% до 40%, от 10% до 30%, от 10% до 20%, от 20% до 100%, от 30% до 100%, от 40% до 100%, от 50% до 100%, от 60% до 100%, от 70% до 100%, от 80% до 100% и от 90% до 100%) относительно уровня mRNA C3, уровня белка C3 или и того и другого в клетке субъекта, которому не вводили любой из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления уровень mRNA C3, уровень белка C3 или и то и другое снижены на от 50% до 99% (например, от 50% до 90%, от 50% до 80%, от 50% до 70%, от 50% до 60%, от 60% до 99%, от 70% до 99%, от 80% до 99% и от 90% до 99%) относительно уровня mRNA C3, уровня белка C3 или и того и другого в клетке субъекта, которому не вводили любой из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления субъект идентифицирован как имеющий заболевание, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента или ассоциированное с ними (например, нарушение регуляции альтернативного пути системы комплемента, классического пути системы комплемента и/или лектинового пути. В некоторых вариантах осуществления заболевание, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента или

ассоциированное с ними, представляет собой пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), IgA-нефропатию, волчаночный нефрит, С3-гломерулопатию (С3G), дерматомиозит/аутоиммунный миозит, системный склероз, демиелинизирующую полинейропатию, пузырчатку, мембранозную нефропатию, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS), буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз (EBA), пемфигоид слизистой оболочки, ANCA- васкулит, уртикарный васкулит с гипокомплементемией, иммуннокомплексный васкулит мелких сосудов, кожный васкулит мелких сосудов, аутоиммунную некротизирующую миопатию, отторжение трансплантированного органа, такое как отторжение трансплантата почки, печени, сердца или легкого, включая антителоопосредованное отторжение (AMR), такое как хроническое AMR (сAMR), антифосфолипидный (aPL) синдром, опосредованный Ab, гломерулонефрит, астму, болезнь плотных отложений (DDD), возрастную макулярную дегенерацию (AMD), системную красную волчанку (SLE), ревматоидный артрит (RA), тяжелый рефрактерный RA, синдром Фелти, рассеянный склероз (MS), травматическое повреждение головного мозга (TBI), повреждение спинного мозга, ишемически-реперфузионное повреждение, преэклампсию, отсроченную функцию трансплантата при остром повреждении почек (DGF-AKI), острое повреждение почек, ассоциированное с сердечно-легочным шунтированием, гипоксически-ишемическую энцефалопатию, тромбоз, вызванный диализом, артериит Такаясу, рецидивирующий полихондрит, острую/профилактическую реакцию "трансплантат против хозяина", хроническую реакцию "трансплантат против хозяина", бета-талассемию, тромботическую микроангиопатию, ассоциированную с трансплантацией стволовых клеток, атрезию желчевыводящих путей, воспалительное заболевание печени, болезнь Бехчета, ишемический инсульт, внутримозговое кровоизлияние, склеродермию, склеродермический почечный криз, интерстициальную болезнь легких, ассоциированную со склеродермией (SSc-ILD), серповидноклеточное заболевание, аутосомно-доминантную поликистозную болезнь почек (ADPKD), периферическую нейропатию, вызванную химиотерапией (CIPN), диабетическую нейропатию, боковой амиотрофический склероз (ALS), диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, географическую атрофию, легочную артериальную гипертензию, рефрактерную тяжелую астму, хроническую обструктивную болезнь легких, идиопатический легочный фиброз (IPF), хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого, легочные патологии при кистозном фиброзе, гнойный гидраденит, неалкогольную жировую болезнь печени (NASH), анкилозирующий спондилит, тромботическую микроангиопатию, ассоциированную с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-TMA) (предупреждение), ишемическую болезнь сердца, атеросклероз, остеопороз (предупреждение), остеоартрит, друзы с высоким риском, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, интерстициальный цистит, активацию системы комплемента, вызванную диализом, гангренозную пиодермию, хроническую сердечную недостаточность, аутоиммунный миокардит, назальный полипоз, острый и хронический панкреатит, атеросклероз, эозинофильный эзофагит, эозинофильный

гранулематоз, гиперэозинофильный синдром, заживление раны и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП). В некоторых вариантах осуществления субъект идентифицирован как имеющий антителоопосредованное отторжение (AMR), такое как хроническое AMR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения антителоопосредованного отторжения (AMR), такого как хроническое AMR (сAMR), включающий приведение клетки субъекта в контакт с любым из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, фармацевтической композицией, вектором или клеткой, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любой из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемых солей, фармацевтическая композиция, вектор или клетка, описанные в данном документе, предназначены для применения в профилактике или лечении антителоопосредованного отторжения (AMR), такого как хроническое AMR (сAMR), у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль, фармацевтическая композиция, вектор или клетка составлены для введения один раз в сутки, один раз в неделю, один раз в месяц или один раз в год. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль, фармацевтическая композиция, вектор или клетка составлены для внутривенного, подкожного, внутримышечного, перорального, назального, подъязычного, интратекального и интрадермального введения. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль, фармацевтическая композиция, вектор или клетка составлены для подкожного введения.

В одном варианте осуществления олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль) или композиция на его основе составлены для введения один раз в сутки, один раз в неделю, один раз в месяц или один раз в год. В одном варианте осуществления олигонуклеотид составлен для подкожного, внутривенного, внутримышечного, перорального, назального, подъязычного, интратекального и интрадермального введения. В одном варианте осуществления олигонуклеотид составлен для подкожного введения. В одном варианте осуществления олигонуклеотид составлен для введения в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 150 мг/кг. (например, от 0,1 мг/кг до 125 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 75 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 25 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 15 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 5 мг/кг, от 5 мг/кг до 150 мг/кг, от 25 мг/кг до 150 мг/кг и от 50 мг/кг до 150 мг/кг). В одном варианте осуществления олигонуклеотид составлен для введения в дозе от приблизительно 0,5 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг (например, от 0,5 мг/кг до 13 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 5 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 1 мг/кг, от 1 мг/кг до 15 мг/кг, от 5 мг/кг до 15 мг/кг и от 10 мг/кг до 15 мг/кг).

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид составлен для введения в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен набор, содержащий олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемую соль), описанный в данном документе, фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, вектор, описанный в данном документе, или клетку, описанную в данном документе.

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль), описанный в данном документе, фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, вектор, описанный в данном документе, или клетка, описанная для применения в предупреждении или лечении заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента или ассоциированного с ними (например, активацией или нарушением регуляции альтернативного, классического и/или лектинового пути).

В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрены олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль), фармацевтическая композиция, композиция, вектор или клетка, описанные в данном документе, где олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемые соли, фармацевтическая композиция, композиция, вектор или клетка вводятся или составлены для введения подкожно.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1A** показана химическая структура антисмысловой нити соединения А.

На **фиг. 1B** показана химическая структура смысловой нити соединения А.

На **фиг. 1C-1 и фиг. 1C-2** показана химическая структура олигонуклеотида соединения А для RNAi.

На **фиг. 1D** показана последовательность нуклеиновой кислоты смысловой и антисмысловой нитей соединения А.

На **фиг. 1E** показано схематическое изображение двухнитевого олигонуклеотида соединения А.

На **фиг. 2A-1 и фиг. 2A-2** показана химическая структура смысловой и антисмысловой нитей соединения В.

На **фиг. 2B** показана последовательность нуклеиновой кислоты смысловой и антисмысловой нитей соединения В.

**Фиг. 3A** представляет собой график, на котором показаны результаты скрининга *in vitro*, выполненного на клетках HepG2, с измерением процента mRNA C3, оставшейся после обработки клеток различными олигонуклеотидами в количестве 1 нМ.

**Фиг. 3B** представляет собой график, на котором показаны результаты скрининга *in vitro*, выполненного на клетках HepG2, с измерением процента mRNA C3, оставшейся в результате обработки клеток различными олигонуклеотидами в количестве 0,1 нМ и 1 нМ.

**Фиг. 4A** представляет собой схематические изображения олигонуклеотида соединений А-I для RNAi.

**Фиг. 4B** представляет собой график, на котором показаны результаты скрининга *in*

*in vivo* соединений А, В и С у мышей CD-1, экспрессирующих cDNA человеческого С3 после гидродинамической инъекции. Измерение посредством RT-qPCR процента mRNA человеческого С3 в печени через четыре дня после введения однократной подкожной дозы 1 мг/кг соединения А, В и С по сравнению с контрольной группой, которой вводили фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

**Фиг. 4С** представляет собой график, на котором показаны результаты скрининга *in vivo* соединений А, D, E, F, G, H и I у мышей CD-1, экспрессирующих cDNA человеческого С3 после гидродинамической инъекции. Измерение посредством RT-qPCR процента mRNA человеческого С3 в печени через четыре дня после введения однократной подкожной дозы 0,5 мг/кг соединения А, D, E, F, G, H и I по сравнению с контрольной группой, которой вводили PBS.

**Фиг. 5** представляет собой график, на котором показано измерение процента mRNA С3 в печени яванских макаков перед введением дозы, через 28 дней и 56 дней после обработки посредством введения однократной дозы 4 мг/кг соединения А, соединения В или любого из соединений С-I по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля.

**Фиг. 6А** представляет собой график, на котором показано измерение процента mRNA С3 в печени яванских макаков после обработки с помощью 1 мг/кг или 2 мг/кг соединения А или соединения В в дни 0, 28, 56 и 84 по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля.

**Фиг. 6В** представляет собой график, на котором показано измерение процента С3 в сыворотке крови яванских макаков после обработки с помощью 1 мг/кг или 2 мг/кг соединения А или соединения В по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля.

**Фиг. 7** представляет собой график, на котором показана примерная ED<sub>50</sub> соединения А и соединения В, измеренная в виде количества mRNA С3 в печени яванских макаков через 28 дней после введения однократной дозы соединения А или соединения В при 2 мг/кг.

**Фиг. 8** представляет собой график, на котором показан процент активности системы комплемента (AP) в сыворотке крови яванских макаков после обработки с помощью 2 мг/кг соединения А или соединения В в дни 0, 28, 56 и 84, измеренный посредством функционального анализа на основе ELISA WIESLAB®. PBS вводили по той же многодозовой схеме, что и в контрольной группе.

**Фиг. 9** представляет собой график, на котором показан процент лизиса в сыворотке крови яванских макаков после обработки с помощью 1 мг/кг или 2 мг/кг соединения А в дни 0, 28, 56 и 84, измеренный посредством способа на основе гемолиза эритроцитов кролика. PBS вводили по той же многодозовой схеме, что и в контрольной группе.

**Фиг. 10А** представляет собой график, на котором показано измерение посредством RT-qPCR процента mRNA С3 в печени мышей CD-1 после введения однократной подкожной дозы 0,5 мг/кг, 1 мг/кг и 6 мг/кг соединения J по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля. Уровни печеночного нокдауна отслеживали в течение 70 дней и умерщвляли по 5 мышей в каждой временной точке для измерений.



**Фиг. 10В** представляет собой график, на котором показано измерение посредством ELISA-анализа процента циркулирующего белка С3 в сыворотке крови мышей CD-1 на протяжении 70-дневного периода после введения однократной подкожной дозы соединения J, составляющей 0,5 мг/кг, 1 мг/кг и 6 мг/кг, по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля.

**Фиг. 11** представляет собой график, на котором показано измерение посредством Stem loop-qPCR количества присутствующей siRNA в плазме крови, ткани печени, почки и селезенки мышей CD-1, которым вводили однократную подкожную дозу 6 мг/кг соединения J в течение периода времени, составляющего 672 часа. Умерщвляли по пять мышей в каждой временной точке для измерений.

**Фиг. 12А** представляет собой график, на котором показано измерение посредством RT-qPCR процента mRNA С3 в печени мышей CD-1 в течение периода времени, составляющего 70 дней, после введения 4 доз соединения J, составляющих 1 мг/кг или 6 мг/кг, в дни 0, 14, 28 и 42 по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля.

**Фиг. 12В** представляет собой график, на котором показано измерение посредством ELISA-анализа уровня белка С3 в сыворотке крови у мышей CD-1 в течение периода времени, составляющего 70 дней, после введения 4 доз соединения J, составляющих 1 мг/кг или 6 мг/кг, в дни 0, 14, 28 и 42. Уровни С3 рассчитывали в виде процента относительно уровней С3 в сыворотке крови, измеренных в контрольной группе, которой вводили PBS (n=5/временная точка).

**Фиг. 13А** представляет собой график, на котором показано измерение посредством Stem loop-qPCR концентрации соединения J в ткани печени мышей CD-1, которым вводили 4 дозы соединения J, составляющие 1 мг/кг, в дни 0, 14, 28 и 42.

**Фиг. 13В** представляет собой график, на котором показано измерение посредством Stem loop-qPCR концентрации соединения J в плазме крови мышей CD-1, которым вводили 4 дозы соединения J, составляющие 1 мг/кг, в дни 0, 14, 28 и 42.

**Фиг. 14** представляет собой группу изображений, на которых показана гибридизация *in situ* флуоресцентных меток с С3 и пропердином для мониторинга клубочкового отложения комплемента в почке мышей NZB/W F1, обработанных с помощью 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг соединения J один раз в месяц в течение 18 недель, возрастом от 21 до 37 недель при сравнении с не подвергавшимися воздействию мышами C57BL/6 и обработанными с помощью PBS NZB/W F1 соответствующего возраста в качестве контролей.

**Фиг. 15А** представляет собой график, на котором показан процент mRNA С3 в печени мышей NZB/W F1 после ежемесячного получения подкожных доз 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг соединения J в возрасте 21 неделя и окончания в возрасте 29 недель (n=10/временная точка).

**Фиг. 15В** представляет собой график, на котором показан процент белка С3 в сыворотке крови мышей NZB/W F1 после ежемесячного получения подкожных доз 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг соединения J в возрасте 21 неделя и окончания в возрасте 29

недель (n=10/временная точка).

**Фиг. 16А** представляет собой график, на котором показан уровень поглощения, измеренный при 450 нМ, с измерением циркулирующих иммунных комплексов посредством захвата IgG у мышей NZB/W F1 возрастом 29 недель, которым подкожно вводили дозу соединения J, составляющую 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг, начиная в возрасте 21 недели.

**Фиг. 16В** представляет собой график, на котором показан уровень поглощения, измеренный при 450 нМ, с измерением циркулирующих иммунных комплексов посредством захвата C1q у мышей NZB/W F1 возрастом 37 недель, которым ежемесячно вводили дозу 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг соединения J, начиная в возрасте 21 недели.

**Фиг. 17** представляет собой группу изображений, на которых показана гибридизация *in situ* флуоресцентных меток с C3 и пропердином для мониторинга отложения комплемента в клубочках мышей MRL/lpr, обработанных посредством введения подкожных доз 6 мг/кг соединения J один раз в две недели в возрасте от 8 до 16 недель, по сравнению с контрольной группой, которой вводили PBS.

**Фиг. 18** представляет собой группу изображений, на которых показана гибридизация *in situ* флуоресцентных меток с C3 и пропердином для мониторинга клубочкового отложения комплемента в почке мышей CFH<sup>-/-</sup>, обработанных с помощью 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг соединения J один раз в месяц в течение 4 месяцев в возрасте от 4 до 8 месяцев, по сравнению с контрольной группой, которой вводили PBS. Почки собирали и визуализировали в течение 4 недель после введения последней дозы.

**Фиг. 19** представляет собой график, на котором показано измерение посредством RT-qPCR процента mRNA C3 в печени мышей CFH<sup>-/-</sup>, обработанных с помощью 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг соединения J один раз в месяц в течение 4 месяцев в возрасте от 4 до 8 месяцев, по сравнению с мышами CFH<sup>-/-</sup>, которым вводили PBS, в качестве контрольной группы.

**Фиг. 20А** представляет собой график, на котором показан клинический показатель состояния задних лап в модели артрита, индуцированного антителом к коллагену, в которой артрит индуцировали в день 0 и вводили бустер LPS в день 3 и затем профилактически обрабатывали посредством введения 3 доз, составляющих 1 мг/кг, или дозы 6 мг/кг соединения J в день -7, 0 и 7. Животных CAIA, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контрольной группы.

**Фиг. 20В** представляет собой график, на котором показан клинический показатель состояния задних лап в модели артрита, индуцированного антителом к коллагену, в которой артрит индуцировали в день 0 и вводили бустер LPS в день 3 и затем терапевтически обрабатывали посредством введения однократной дозы 1 мг/кг или дозы 6 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных CAIA, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контрольной группы.

**Фиг. 21А** представляет собой группу изображений воспаления задних лап в день 11 в мышинной модели CAIA, в которой артрит индуцировали с помощью антитела к

коллагену, введенного в день 0, и бустера LPS в день 3, и затем профилактически обрабатывали посредством введения 3 доз с применением дозы 6 мг/кг соединения J в день -7, 0 и 7. Животных CAIA, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контрольной группы.

**Фиг. 21B** представляет собой группу изображений воспаления задних лап в день 13 в мышинной модели CAIA, в которой артрит индуцировали с помощью антитела к коллагену, введенного в день 0, и бустера LPS в день 3, и затем терапевтически обрабатывали посредством введения однократной дозы 6 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных CAIA, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контрольной группы.

**Фиг. 22A** представляет собой группу изображений окрашивания H&E, демонстрирующих снижение инфильтрации мононуклеарными клетками в задних лапах после профилактической обработки посредством введения 3 доз с применением дозы 6 мг/кг соединения J в день -7, 0 и 7. Животных CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей воспаления соответственно.

**Фиг. 22B** представляет собой группу изображений окрашивания H&E, демонстрирующих снижение инфильтрации мононуклеарными клетками в задних лапах после терапевтической обработки посредством введения однократной дозы 6 мг/кг соединения J в CAIA-индуцированной мышинной модели артрита через 5 дней после индуцирования заболевания. Животных CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей воспаления соответственно.

**Фиг. 23** представляет собой группу изображений окрашивания с помощью сафранина O, демонстрирующего предупреждение эрозии хряща и образования паннуса, и окрашивания H&E, демонстрирующего снижение инфильтрации мононуклеарными клетками в коленном суставе в CAIA-индуцированной мышинной модели артрита после профилактической обработки животных посредством введения 3 доз, составляющих 6 мг/кг соединения J, в день -7, 0 и 7. Животных CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

**Фиг. 24A** представляет собой группу изображений окрашивания H&E, демонстрирующего снижение инфильтрации мононуклеарными клетками в коленном суставе в CAIA-индуцированной мышинной модели артрита после терапевтической обработки животных посредством введения однократной дозы 6 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

**Фиг. 24B** представляет собой группу изображений окрашивания с помощью сафранина O, демонстрирующего предупреждение эрозии хряща и образования паннуса в

коленном суставе в CAIA-индуцированной мышинной модели артрита после терапевтической обработки животных посредством введения однократной дозы 6 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

**Фиг. 25** представляет собой группу изображений окрашивания лимфоцитов (CD45+) в задних лапах животных с CAIA-индуцированным артритом, демонстрирующего снижение инфильтрации иммунными клетками после терапевтической обработки посредством введения однократной дозы 6 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

**Фиг. 26** представляет собой группу изображений окрашивания нейтрофилов и макрофагов (CD11b+) в задних лапах животных с CAIA-индуцированным артритом, демонстрирующего снижение инфильтрации иммунными клетками после терапевтической обработки посредством введения однократной дозы 6 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

**Фиг. 27** представляет собой группу изображений окрашивания макрофагов (F4/80+) в задних лапах животных с CAIA-индуцированным артритом, демонстрирующего снижение инфильтрации иммунными клетками после терапевтической обработки посредством введения однократной дозы 6 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

**Фиг. 28** представляет собой группу изображений гибридизации *in situ* флуоресцентных меток с mRNA C3 (красный) для мониторинга локальной экспрессии системы комплемента и инфильтрации CD45+ клетками (зеленый - лимфоциты) в задней лапе CAIA-индуцированных животных после терапевтической обработки посредством введения однократной дозы 6 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания.

**Фиг. 29** представляет собой график, на котором показан средний клинический показатель из 2 экспериментов с применением мышей с MOG-индуцированным экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (EAE), у которых заболевание индуцировали в день 0 и которые получали 2 дозы коклюшного токсина в день 0 и 1, и затем терапевтически обрабатывали посредством введения 5 доз соединения J один раз в неделю, составляющих 6 мг/кг, начиная в день 7 после индуцирования заболевания. Животных с EAE, обработанных с помощью PBS, применяли в качестве положительного контроля заболевания, а C3-дефицитных (C3-/-) использовали в качестве отрицательного контроля

экспрессии С3.

**Фиг. 30** представляет собой группу иллюстративных изображений окрашивания спинного мозга с помощью Luxol fast blue у мышей с MOG-индуцированным ЕАЕ после введения 5 доз, составляющих 6 мг/кг соединения J, один раз в неделю по сравнению с мышами, не подвергавшимися воздействию, мышами с ЕАЕ, обработанными с помощью PBS (контроль заболевания), и С3-дефицитными мышами с MOG-индуцированным ЕАЕ.

**Фиг. 31А** представляет собой график, на котором показано количество mRNA С3 в печени мышей с MOG-индуцированным ЕАЕ после введения 5 доз соединения J, составляющих 6 мг/кг, один раз в неделю по сравнению с мышами, не подвергавшимися воздействию, мышами с ЕАЕ, обработанными с помощью PBS (положительный контроль), С3-дефицитными мышами, не подвергавшимися воздействию (С3-/-), и С3-дефицитными мышами с MOG-индуцированным ЕАЕ (отрицательный контроль).

**Фиг. 31В** представляет собой график, на котором показано количество С3 в сыворотке крови мышей с MOG-индуцированным ЕАЕ после введения 5 доз, составляющих 6 мг/кг соединения J, один раз в неделю по сравнению с мышами, не подвергавшимися воздействию, мышами с ЕАЕ, обработанными с помощью PBS (положительный контроль заболевания), С3-дефицитными мышами, не подвергавшимися воздействию (С3-/-), и С3-дефицитными мышами с MOG-индуцированным ЕАЕ (отрицательный контроль экспрессии С3).

**Фиг. 32А** представляет собой график, на котором показана средняя концентрация соединения А в зависимости от времени (в часах) в плазме крови яванских макаков после введения однократной дозы соединения А IV или SC при 3 мг/кг.

**Фиг. 32В** представляет собой график, на котором показана средняя концентрация соединения А в зависимости от времени (в часах) в печени яванских макаков после введения однократной дозы соединения А IV или SC при 3 мг/кг.

**Фиг. 33** представляет собой график, на котором показан средний процент ( $\pm$  SD) экспрессии mRNA С3 в печени яванских макаков после введения однократной дозы соединения А при 3 мг/кг посредством SC или IV инъекции по сравнению с физиологическим раствором (контроль).

**Фиг. 34** представляет собой график, на котором показан средний уровень экспрессии ( $\pm$  SD) белка С3 в сыворотке крови яванских макаков после введения однократной IV или SC дозы соединения А при 3 мг/кг по сравнению с физиологическим раствором (контроль).

**Фиг. 35** представляет собой график, на котором показана активность компонента С3 классического пути системы комплемента у яванских макаков после введения однократной IV или SC дозы соединения А при 3 мг/кг по сравнению с физиологическим раствором (контроль).

**Фиг. 36** представляет собой график, на котором показана активность компонента С3 лектинового пути системы комплемента у яванских макаков после введения однократной IV или SC дозы соединения А при 3 мг/кг по сравнению с физиологическим раствором (контроль).

**Фиг. 37** представляет собой график, на котором показана активность компонента C3 альтернативного пути системы комплемента у яванских макаков после введения однократной IV или SC дозы соединения А при 3 мг/кг по сравнению с физиологическим раствором (контроль).

#### Определения

При использовании в данном документе термины "приблизительно" и "примерно" относятся к количеству, которое составляет  $\pm 10\%$  от указанного значения и необязательно составляет  $\pm 5\%$  от указанного значения или более необязательно  $\pm 2\%$  от указанного значения.

При использовании в данном документе термины "осуществление введения" и "введение" относятся к любому способу предоставления фармацевтического препарата субъекту. Олигонуклеотиды, описанные в данном документе, можно вводить посредством любого способа, известного специалистам в данной области техники. Подходящие способы введения олигонуклеотида могут включать, например, пероральное введение, посредством инъекции (например, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, внутримышечно, интравитреально и подкожно), препараты для капельной инфузии и т. п. Способы введения олигонуклеотида могут включать подкожное введение. Олигонуклеотиды, полученные как описано в данном документе, можно вводить в различных формах, в зависимости от нарушения, подлежащего лечению, и возраста, состояния и веса тела субъекта, как известно из уровня техники. Препарат можно вводить профилактически, то есть вводить для снижения вероятности развития заболевания или состояния.

При использовании в данном документе термин "средство, которое обеспечивает снижение уровня и/или активности C3" относится к любому олигонуклеотиду (например, олигонуклеотиду для RNAi), раскрытому в данном документе, который можно использовать (например, вводить) для снижения уровня или экспрессии C3 в клетке или у субъекта, например, в клетках или сыворотке крови субъекта. Под "снижением уровня C3," "снижением экспрессии C3" и "снижением транскрипции C3" подразумевается уменьшение уровня, уменьшение экспрессии или уменьшение транскрипции mRNA C3 и/или белка C3 в клетке или у субъекта, например, путем введения олигонуклеотида для RNAi (такого, как описанные в данном документе) в клетку или субъекту. Уровень mRNA C3 и/или белка C3 можно измерить с применением любого способа, известного из уровня техники (например, путем измерения уровня mRNA C3 или уровня белка C3 в клетке или у субъекта). Снижение может представлять собой уменьшение уровня, экспрессии или транскрипции mRNA C3 и/или белка C3 на приблизительно 5% или больше (например, приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100%) в клетке или у субъекта по сравнению с уровнем до лечения или относительно уровня mRNA C3 или белка C3 у субъекта, которого не лечили (например, субъекта с заболеванием или нарушением, ассоциированным с активацией или нарушением регуляции системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции C3), или относительно контрольного субъекта (например, здорового субъекта (например, субъекта без

заболевания или нарушения, ассоциированного с активацией или нарушением регуляции системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции C3)). C3 может представлять собой любой C3 (такой как, например, C3 мыши, C3 крысы, C3 обезьяны или C3 человека), а также варианты или мутантные варианты C3. Таким образом, C3 может представлять собой C3 дикого типа, мутантный C3 или трансгенный C3 в контексте генетически сконструированных клетки, группы клеток или организма. "Снижение активности C3" также означает уменьшение уровня активности, связанной с C3 (например, путем снижения активации пути системы комплемента, ассоциированной с заболеванием, опосредованной активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента). Активность C3 может быть уменьшена на приблизительно 5% или больше (например, приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100%). Уровень активности C3 можно измерить с применением любого способа, известного из уровня техники. Снижение может представлять собой уменьшение уровня, экспрессии или транскрипции mRNA C3 и/или белка C3 на по меньшей мере приблизительно 5% или больше (например, приблизительно 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или приблизительно 100% или больше относительно клетки или субъекта, не обработанного олигонуклеотидом для RNAi, раскрытым в данном документе). Данное снижение уровня, экспрессии или транскрипции mRNA C3 и/или белка C3 может длиться в течение периода времени, составляющего по меньшей мере один день или больше (например, по меньшей мере 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 10 дней, 15 дней, 20 дней, 30 дней, 40 дней, 50 дней, 60 дней, 70 дней, 80 дней, 90 дней, 100 дней, 110 дней, 120 дней или больше). Снижение может представлять собой уменьшение количества белка C3 в крови субъекта, подвергнутого лечению (например, субъекта человека), на по меньшей мере 75-175 мг/дл (например, 75-100 мг/дл, 75-125 мг/л, 75-150 мг/дл, 150-175 мг/дл, 125-175 мг/дл и 100-175 мг/дл).

Термин "альтернативный нуклеозид" или "альтернативный нуклеотид" относится к нуклеозиду, содержащему альтернативный сахар или альтернативное нуклеиновое основание, такие как описанные в данном документе. Альтернативный нуклеозид может предусматривать нуклеозид, в котором фрагмент, представляющий собой нуклеиновое основание, модифицирован путем изменения пурина или пиримидина с получением модифицированного пурина или пиримидина, такого как замещенный пурин или замещенный пиримидин, такой как "альтернативное нуклеиновое основание", выбранное из изоцитозина, псевдоизоцитозина, 5-метилцитозина, 5-тиозолоцитозина, 5-пропинилцитозина, 5-пропинилуридина, 5-бромуридина, 5-тиазолоуридина, 2-тиоуридина, псевдоуридина, 1-метилпсевдоуридина, 5-метоксиуридина, 2'-тиотимина, инозина, диаминопурина, 6-аминопурина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и 2-хлор-6-аминопурина. Альтернативный нуклеозид также может предусматривать нуклеозид, где сахарный фрагмент модифицирован; например, 2'-О-метиладенозин, 2'-О-метилгуанозин, 2'-О-метилцитозин, 2'-О-метилуридин, 2-фтордезоксаденозин, 2-фтордезоксигуанозин, 2-фтордезоксцитидин и 2-фтордезоксидурин.

Иллюстративные нуклеиновые основания, содержащие альтернативный урацил, включают псевдоуридин ( $\psi$ ), пиридин-4-он-рибонуклеозид, 5-азауридин, 6-азауридин, 2-тио-5-азауридин, 2-тиоуридин ( $s^2U$ ), 4-тиоуридин ( $s^4U$ ), 4-тиопсевдоуридин, 2-тиопсевдоуридин, 5-гидроксиуридин ( $ho^5U$ ), 5-аминоаллилуридин, 5-галогенуридин (например, 5-йодуридин или 5-бромурин), 3-метилуридин ( $m^3U$ ), 5-метоксиуридин ( $mo^5U$ ), уридин-5-оксиуксусную кислоту ( $cmo^5U$ ), сложный метиловый эфир уридин-5-оксиуксусной кислоты ( $mcmo^5U$ ), 5-карбоксиметилуридин ( $cm^5U$ ), 1-карбоксиметилпсевдоуридин, 5-карбоксигидроксиметилуридин ( $chm^5U$ ), сложный метиловый эфир 5-карбоксигидроксиметилуридина ( $mchm^5U$ ), 5-метоксикарбонилметилуридин ( $mcm^5U$ ), 5-метоксикарбонилметил-2-тиоуридин ( $mcm^5s^2U$ ), 5-аминометил-2-тиоуридин ( $nm^5s^2U$ ), 5-метиламинометилуридин ( $mnm^5U$ ), 5-метиламинометил-2-тиоуридин ( $mnm^5s^2U$ ), 5-метиламинометил-2-селенуридин ( $mnm^5se^2U$ ), 5-карбамоилметилуридин ( $ncm^5U$ ), 5-карбоксиметиламинометилуридин ( $cmnm^5U$ ), 5-карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин ( $cmnm^5s^2U$ ), 5-пропинилуридин, 1-пропинилпсевдоуридин, 5-тауринометилуридин ( $tm^5U$ ), 1-тауринометилпсевдоуридин, 5-тауринометил-2-тиоуридин ( $tm^5s^2U$ ), 1-тауринометил-4-тиопсевдоуридин, 5-метилуридин ( $m^5U$ , т. е. содержащий нуклеиновое основание дезокситимин), 1-метилпсевдоуридин ( $m^1\psi$ ), 5-метил-2-тиоуридин ( $m^5s^2U$ ), 1-метил-4-тиопсевдоуридин ( $m^1s^4\psi$ ), 4-тио-1-метилпсевдоуридин, 3-метилпсевдоуридин ( $m^3\psi$ ), 2-тио-1-метилпсевдоуридин, 1-метил-1-дезапсевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-дезапсевдоуридин, дигидроуридин (D), дигидропсевдоуридин, 5,6-дигидроуридин, 5-метилдигидроуридин ( $m^5D$ ), 2-тиодигидроуридин, 2-тиодигидропсевдоуридин, 2-метоксиуридин, 2-метокси-4-тиоуридин, 4-метоксипсевдоуридин, 4-метокси-2-тиопсевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин, 3-(3-амино-3-карбоксиипропил)уридин ( $acp^3U$ ), 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксиипропил)псевдоуридин ( $acp^3\psi$ ), 5-(изопентениламинометил)уридин ( $inm^5U$ ), 5-(изопентениламинометил)-2-тиоуридин ( $inm^5s^2U$ ),  $\alpha$ -тиоуридин, 2'-О-метилуридин (Um), 5,2'-О-диметилуридин ( $m^5Um$ ), 2'-О-метилпсевдоуридин ( $\psi m$ ), 2-тио-2'-О-метилуридин ( $s^2Um$ ), 5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилуридин ( $mcm^5Um$ ), 5-карбамоилметил-2'-О-метилуридин ( $ncm^5Um$ ), 5-карбоксиметиламинометил-2'-О-метилуридин ( $cmnm^5Um$ ), 3,2'-О-диметилуридин ( $m^3Um$ ) и 5-(изопентениламинометил)-2'-О-метилуридин ( $inm^5Um$ ), 1-тиоуридин, дезокситимидин, 2'-F-арауридин, 2'-F-уридин, 2'-ОН-арауридин, 5-(2-карбометоксивинил)уридин и 5-[3-(1-Е-пропениламино)уридин.

Иллюстративные нуклеиновые основания, содержащие альтернативный цитозин, включают 5-азацитидин, 6-азацитидин, псевдоизоцитидин, 3-метилцитидин ( $m^3C$ ), N4-ацетилцитидин ( $ac^4C$ ), 5-формилцитидин ( $f^5C$ ), N4-метилцитидин ( $m^4C$ ), 5-метилцитидин ( $m^5C$ ), 5-галогенцитидин (например, 5-йодцитидин), 5-гидроксиметилцитидин ( $hm^5C$ ), 1-метилпсевдоизоцитидин, пирролоцитидин, пирролопсевдоизоцитидин, 2-тиоцитидин ( $s^2C$ ), 2-тио-5-метилцитидин, 4-тиопсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метилпсевдоизоцитидин, 4-тио-1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, 1-метил-1-дезапсевдоизоцитидин, зебуларин, 5-азазебуларин, 5-метилзебуларин, 5-аза-2-тиозебуларин, 2-тиозебуларин, 2-



метоксицитидин, 2-метокси-5-метилцитидин, 4-метоксипсевдоизоцитидин, 4-метокси-1-метилпсевдоизоцитидин, лизидин ( $k_2C$ ),  $\alpha$ -тиоцитидин, 2'-О-метилцитидин ( $Cm$ ), 5,2'-О-диметилцитидин ( $m^5Cm$ ), N4-ацетил-2'-О-метилцитидин ( $ac^4Cm$ ), N4,2'-О-диметилцитидин ( $m^4Cm$ ), 5-формил-2'-О-метилцитидин ( $f^5Cm$ ), N4,N4,2'-О-триметилцитидин ( $m^4_2Cm$ ), 1-тиоцитидин, 2'-F-арацитидин, 2'-F-цитидин и 2'-ОН-арацитидин.

Иллюстративные нуклеиновые основания, содержащие альтернативный аденин, включают 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, 2-амино-6-галогенпурин (например, 2-амино-6-хлорпурин), 6-галогенпурин (например, 6-хлорпурин), 2-амино-6-метилпурин, 8-азидоаденозин, 7-дезааденин, 7-деаза-8-азааденин, 7-деаза-2-аминопурин, 7-деаза-8-аза-2-аминопурин, 7-деаза-2,6-диаминопурин, 7-деаза-8-аза-2,6-диаминопурин, 1-метиладенозин ( $m^1A$ ), 2-метиладенин ( $m^2A$ ), N6-метиладенозин ( $m^6A$ ), 2-метилтио-N6-метиладенозин ( $ms^2m^6A$ ), N6-изопентениладенозин ( $i^6A$ ), 2-метилтио-N6-изопентениладенозин ( $ms^2i^6A$ ), N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин ( $io^6A$ ), 2-метилтио-N6-(цис-гидроксиизопентенил)аденозин ( $ms^2io^6A$ ), N6-глицинилкарбамоиладенозин ( $g^6A$ ), N6-треонилкарбамоиладенозин ( $t^6A$ ), N6-метил-N6-треонилкарбамоиладенозин ( $m^6t^6A$ ), 2-метилтио-N6-треонилкарбамоиладенозин ( $ms^2g^6A$ ), N6,N6-диметиладенозин ( $m^6_2A$ ), N6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин ( $hn^6A$ ), 2-метилтио-N6-гидроксинорвалилкарбамоиладенозин ( $ms^2hn^6A$ ), N6-ацетиладенозин ( $ac^6A$ ), 7-метиладенин, 2-метилтиоаденин, 2-метоксиаденин,  $\alpha$ -тиоаденозин, 2'-О-метиладенозин ( $Am$ ), N6,2'-О-диметиладенозин ( $m^6Am$ ), N6,N6,2'-О-триметиладенозин ( $m^6_2Am$ ), 1,2'-О-диметиладенозин ( $m^1Am$ ), 2'-О-рибозиладенозин (фосфат) ( $Ar(p)$ ), 2-амино-N6-метилпурин, 1-тиоаденозин, 8-азидоаденозин, 2'-F-арааденозин, 2'-F-аденозин, 2'-ОН-арааденозин и N6-(19-аминопентаоксанадецил)аденозин.

Иллюстративные нуклеиновые основания, содержащие альтернативный гуанин, включают инозин (I), 1-метилюинозин ( $m^1I$ ), виозин ( $imG$ ), метилвиозин ( $mimG$ ), 4-деметилвиозин ( $imG-14$ ), изовиозин ( $imG2$ ), вибутозин ( $yW$ ), пероксивибутозин ( $o_2yW$ ), гидроксивибутозин ( $OhyW$ ), недомодифицированный гидроксивибутозин ( $OhyW^*$ ), 7-дезагуанозин, квеуозин (Q), эпоксиквеуозин ( $oQ$ ), галактозилквеуозин ( $galQ$ ), маннозилквеуозин ( $manQ$ ), 7-циано-7-дезагуанозин ( $preQ_0$ ), 7-аминометил-7-дезагуанозин ( $preQ_1$ ), археозин ( $G^+$ ), 7-деаза-8-азагуанозин, 6-тиогуанозин, 6-тио-7-дезагуанозин, 6-тио-7-деаза-8-азагуанозин, 7-метилгуанозин ( $m^7G$ ), 6-тио-7-метилгуанозин, 7-метилюинозин, 6-метоксигуанозин, 1-метилгуанозин ( $m^1G$ ), N2-метилгуанозин ( $m^2G$ ), N2,N2-диметилгуанозин ( $m^2_2G$ ), N2,7-диметилгуанозин ( $m^2_7G$ ), N2,N2,7-диметилгуанозин ( $m^2_2_7G$ ), 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксогуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N2-метил-6-тиогуанозин, N2,N2-диметил-6-тиогуанозин,  $\alpha$ -тиогуанозин, 2'-О-метилгуанозин ( $Gm$ ), N2-метил-2'-О-метилгуанозин ( $m^2Gm$ ), N2,N2-диметил-2'-О-метилгуанозин ( $m^2_2Gm$ ), 1-метил-2'-О-метилгуанозин ( $m^1Gm$ ), N2,7-диметил-2'-О-метилгуанозин ( $m^2_7Gm$ ), 2'-О-метилюинозин ( $Im$ ), 1,2'-О-диметилюинозин ( $m^1Im$ ), 2'-О-рибозилгуанозин (фосфат) ( $Gr(p)$ ), 1-тиогуанозин, O6-метилгуанозин, 2'-F-арагуанозин и 2'-F-гуанозин.

Фрагменты, представляющие собой нуклеиновые основания, могут быть обозначены с помощью буквенного кода для каждого соответствующего нуклеинового основания, например, А, Т, G, С или U, где каждая буква необязательно может предусматривать альтернативные нуклеиновые основания с эквивалентной функцией.

При использовании в данном документе термин "антисмысловой" относится к олигонуклеотиду, который достаточно комплементарен всему или части гена, первичного транскрипта или процессированной mRNA (например, последовательности C3 (например, SEQ ID NO: 12)), с тем чтобы препятствовать экспрессии эндогенного гена (например, C3).

Термины "антисмысловая нить" и "направляющая нить" относятся к нити олигонуклеотида для RNAi (например, dsRNA), которая содержит область, которая в значительной степени комплементарна целевой последовательности, например, mRNA C3 (например, SEQ ID NO: 12).

Подразумевается, что термин "по меньшей мере" перед числом или сериями чисел включает число, стоящее рядом с термином "по меньшей мере", и все последующие числа или целые числа, которые логически могут быть включены, что ясно из контекста. Например, число нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно представлять собой целое число. Например, "по меньшей мере 10 нуклеотидов молекулы нуклеиновой кислоты из 21 нуклеотида" означает, что диапазон из 10-21 нуклеотида, такой как, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 21 нуклеотид, обладает указанным свойством. Если "по меньшей мере" находится перед сериями чисел или диапазоном, известно, что "по меньшей мере" может модифицировать каждое из чисел в сериях или диапазоне.

При использовании в данном документе термин "ослабляет" означает снижает или эффективно препятствует. В качестве неограничивающего примера одно или несколько средств лечения, предусмотренных в данном документе, могут снижать или эффективно препятствовать возникновению или прогрессированию заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции C3) у субъекта. Данное ослабление может быть проиллюстрировано, например, уменьшением одного или нескольких аспектов (например, симптомов, характеристик ткани и клеточной, воспалительной или иммунологической активности и т. п.) заболевания, ассоциированного с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, такого как, например, одного или нескольких заболеваний, ассоциированных с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, раскрытых в данном документе.

Термин "сDNA" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая является ДНК-эквивалентом последовательности mRNA (т. е. содержащей уридин, замененный на тимидин). Как правило, термины сDNA и mRNA могут использоваться взаимозаменяемо в отношении конкретного гена (например, гена C3), поскольку специалисту в данной области техники будет понятно, что последовательность сDNA является такой же как последовательность mRNA, за исключением того, что уридины

считываются как тимидины.

При использовании в данном документе термины "С3" и "компонент 3 системы комплемента" относятся к белку или гену, кодирующему компонент 3 системы комплемента. Термин "С3" относится к природным вариантам белка С3 дикого типа, таким как белки, характеризующиеся по меньшей мере 85% идентичностью (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или большей идентичностью) с аминокислотной последовательностью С3 человека дикого типа, которая представлена под регистрационным № NCBI NP\_000055.2 или под SEQ ID NO: 11. Термин "С3" также относится к природным вариантам полинуклеотида С3 дикого типа, таким как полинуклеотиды, характеризующиеся по меньшей мере 85% идентичностью (например, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,9% или большей идентичностью) с последовательностью нуклеиновой кислоты С3 человека дикого типа, которая представлена под регистрационным № NCBI NM\_000064.4 или под SEQ ID NO: 12.

При использовании в данном документе "комбинированная терапия" или "введенный в комбинации с" означает, что два (или более) разных средства или средства лечения введены субъекту как часть определенной схемы лечения конкретного заболевания или состояния. Схема лечения определяет дозы и периодичность введения каждого средства таким образом, чтобы эффекты отдельных средств у субъекта перекрывались. В некоторых вариантах осуществления доставка двух или более средств является одновременной или параллельной, и средства могут быть составлены совместно. В некоторых вариантах осуществления два или более средств не составлены совместно и вводятся последовательным образом как часть предписанной схемы. В некоторых вариантах осуществления введение двух или более средств или средств лечения в комбинации является таким, что снижение симптома или другого параметра, связанного с нарушением, превышает таковое, которое наблюдалось бы при доставке одного средства или средства лечения по отдельности или в отсутствие другого. Эффект двух средств лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным (например, синергическим). Последовательное или по сути одновременное введение каждого терапевтического средства может быть осуществлено посредством любого подходящего пути, включая без ограничения пероральные пути, внутривенные пути, внутримышечные пути и непосредственное поглощение тканями слизистых оболочек. Терапевтические средства можно вводить одним и тем же путем или разными путями. Например, первое терапевтическое средство из комбинации можно вводить путем внутривенной инъекции, в то время как второе терапевтическое средство из комбинации можно вводить перорально.

При использовании в данном документе термин "активация или нарушение регуляции пути системы комплемента" относится к любой аберрации способности пути системы комплемента, включая классический путь, альтернативный путь и лектиновый путь, обеспечивать защиту хозяина против патогенов и удалять иммунные комплексы и

поврежденные клетки, а также иммунорегуляцию. Активация или нарушение регуляции пути системы комплемента может проходить в жидкой фазе и на клеточной поверхности и может привести к избыточной активации или недостаточной регуляции системы комплемента, обе из которых обуславливают повреждение тканей.

При использовании в данном документе термин "комплементарный", если он используется для описания первой нуклеотидной или нуклеозидной последовательности по отношению ко второй нуклеотидной или нуклеозидной последовательности, относится к способности олигонуклеотида, содержащего первую нуклеотидную или нуклеозидную последовательность, гибридизироваться и образовывать дуплексную структуру в определенных условиях с олигонуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную последовательность, как будет понятно специалисту в данной области техники. Такие условия могут представлять собой, например, жесткие условия, где жесткие условия могут предусматривать: 400 мМ NaCl, 40 мМ PIPES, pH 6,4, 1 мМ EDTA, 50°C или 70°C, в течение 12-16 часов с последующим промыванием (см., например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Можно применять другие условия, такие как физиологически релевантные условия, которые можно найти внутри организма. Специалист в данной области техники сможет определить совокупность условий, наиболее подходящих для теста на комплементарность двух последовательностей в соответствии с конечным применением гибридизованных нуклеотидов или нуклеозидов. "Комплементарные" последовательности при использовании в данном документе также могут включать или быть образованы полностью парами оснований, образованными не по правилу Уотсона-Крика, и/или парами оснований, образованными из неприродных и альтернативных нуклеотидов или нуклеозидов, при условии соблюдения указанных выше требований по отношению к их способности к гибридизации. Такие пары оснований, образованные не по правилу Уотсона-Крика, включают без ограничения неоднозначное спаривание G:U или спаривание хугстиновских оснований. Комплементарные последовательности в пределах олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) или между олигонуклеотидом и целевой последовательностью, как описано в данном документе, включают спаривание оснований олигонуклеотида, содержащего первую нуклеотидную или нуклеозидную последовательность, с олигонуклеотидом, содержащим вторую нуклеотидную или нуклеозидную последовательность, по всей длине одной или обеих нуклеотидных или нуклеозидных последовательностей. Такие последовательности могут называться "полностью комплементарными" по отношению друг к другу в данном документе. Если первая последовательность называется "в значительной степени комплементарной" по отношению ко второй последовательности, две последовательности могут быть полностью комплементарными или они могут образовывать одну или несколько, но в целом не более 5, 4, 3 или 2 ошибочно спаренных пар оснований после гибридизации с образованием дуплекса из не более чем 30 пар оснований, при этом сохраняя способность к гибридизации в условиях, наиболее релевантных их конечному применению, например, снижению экспрессии посредством пути RISC. "В значительной

степени комплементарный" также может относиться к олигонуклеотиду, который в значительной степени комплементарен непрерывной части mRNA, представляющей интерес (например, mRNA, кодирующей C3). Например, олигонуклеотид комплементарен по меньшей мере части mRNA C3, если последовательность в значительной степени комплементарна непрерывающейся части mRNA, кодирующей C3. Однако, если два олигонуклеотида сконструированы с образованием после гибридизации одного или нескольких однонитевых выступов, такие выступы не следует рассматривать как случаи неправильного спаривания в отношении определения комплементарности. Например, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), содержащий один олигонуклеотид длиной 22 связанных нуклеозида и другой олигонуклеотид длиной 20 нуклеозидов, может называться "полностью комплементарным" для целей, описанных в данном документе, несмотря на то, что они характеризуются разными значениями длины.

При использовании в данном документе "комплементарные олигонуклеотиды" представляют собой таковые, которые способны к спариванию оснований по стандартным правилам комплементарности Уотсона-Крика. Конкретно, пурины будут образовывать пары оснований с пиримидинами с образованием комбинации гуанина, спаренного с цитозином (G:C), и аденина, спаренного с тиминном (A:T), в случае ДНК, либо аденина, спаренного с урацилом (A:U), в случае РНК. Известно, что два олигонуклеотида способны к гибридизации друг с другом, даже если они не полностью комплементарны друг другу, при условии, что каждый содержит по меньшей мере одну область, которая в значительной степени комплементарна другой.

При использовании в данном документе фраза "приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом" включает приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом, таким как однонитевой олигонуклеотид или двухнитевой олигонуклеотид (например, однонитевая РНК или двухнитевая РНК, которая образует дуплекс), посредством способов, известных из уровня техники. Приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом включает приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом *in vitro* или приведение клетки в контакт с олигонуклеотидом *in vivo*. Приведение в контакт можно осуществлять непосредственно или опосредованно. Таким образом, например, олигонуклеотид можно привести в физический контакт с клеткой путем отдельного осуществления способа или в качестве альтернативы олигонуклеотид для RNAi можно поместить в ситуацию, которая будет позволять или обуславливать его последовательное приведение в контакт с клеткой. Приведение клетки в контакт *in vitro* можно осуществлять, например, путем инкубирования клетки с олигонуклеотидом. Приведение клетки в контакт *in vivo* можно осуществлять, например, посредством введения олигонуклеотида путем инъекции в ткань, где расположена клетка, или рядом с ней, или посредством введения олигонуклеотида для RNAi путем инъекции в другую область, например, кровотока или подкожное пространство, за счет чего средство впоследствии достигнет ткань, где расположена клетка, подлежащая приведению в контакт. Например, олигонуклеотид может содержать и/или быть связанным с лигандом, который направляет олигонуклеотид к сайту, представляющему интерес, или может быть

интегрирован в вектор (например, вирусный вектор), который доставляет олигонуклеотид в целевой сайт, представляющий интерес. Также возможны комбинации способов приведения в контакт *in vitro* и *in vivo*. Например, клетку также можно приводить в контакт с олигонуклеотидом *in vitro* и затем трансплантировать субъекту.

Термин "непрерывная область нуклеиновых оснований" относится к области олигонуклеотида (например, антисмысловой нити олигонуклеотида для RNAi), которая комплементарна целевой нуклеиновой кислоте. Термин может применяться взаимозаменяемо в данном документе с термином "непрерывная нуклеотидная последовательность" или "непрерывная последовательность нуклеиновых оснований." В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды олигонуклеотида присутствуют в непрерывной нуклеотидной или нуклеозидной области. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит непрерывную нуклеотидную область и может необязательно содержать дополнительный нуклеотид(нуклеотиды) или нуклеозид(нуклеозиды). Область нуклеотидного линкера может быть комплементарна или может быть не комплементарна целевой нуклеиновой кислоте. Межнуклеозидные связи, присутствующие между нуклеотидами непрерывной нуклеотидной области, могут включать фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. Дополнительно непрерывная нуклеотидная область может содержать один или несколько нуклеозидов, модифицированных по сахару.

При использовании в данном документе термин "дезоксирибонуклеотид" относится к нуклеотиду, содержащему водород вместо гидроксила в 2'-положении своего пентозного сахара по сравнению с рибонуклеотидом. Модифицированный дезоксирибонуклеотид представляет собой дезоксирибонуклеотид, содержащий одну или несколько модификаций или замен атомов, за исключением 2'-положения, включая модификации или замены сахара, фосфатной группы или основания или внутри них.

При использовании в данном документе термин "заболевание" относится к прекращению, приостановке или нарушению функций организма, систем или органов. Заболевания или нарушения, представляющие интерес, включают заболевания и нарушения, при которых субъект получит пользу в результате лечения олигонуклеотидом, описанным в данном документе (например, конструкцией на основе однострессовой или двухстрессовой РНК, которая образует дуплекс, описанный в данном документе), который нацеливается на С3, например, посредством способа лечения, описанного в данном документе. Неограничивающие примеры заболеваний или нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента или ассоциированных с ними, которые можно лечить с применением композиций и способов, описанных в данном документе, включают, например, кожные нарушения, неврологические нарушения, нефрологические нарушения, требующие неотложной помощи, ревматические нарушения, легочные нарушения, дерматологические нарушения, гематологические нарушения и офтальмологические нарушения, такие как, например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), IgA-

нефропатия, волчаночный нефрит, С3-гломерулопатия (С3G), дерматомиозит/аутоиммунный миозит, системный склероз, демиелинизирующая полинейропатия, пузырьчатка, мембранозная нефропатия, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS), буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз (EBA), пемфигоид слизистой оболочки, ANCA-васкулит, уртикарный васкулит с гипокомплементемией, иммуннокомплексный васкулит мелких сосудов, кожный васкулит мелких сосудов, аутоиммунная некротизирующая миопатия, отторжение трансплантированного органа, такое как отторжение трансплантата почки, печени, сердца или легкого, включая антителоопосредованное отторжение (AMR), такое как хроническое AMR (сAMR), антифосфолипидный (aPL) синдром, опосредованный Ab, гломерулонефрит, астма, болезнь плотных отложений (DDD), возрастная макулярная дегенерация (AMD), системная красная волчанка (SLE), ревматоидный артрит (RA), тяжелый рефрактерный RA, синдром Фелти, рассеянный склероз (MS), травматическое повреждение головного мозга (TBI), повреждение спинного мозга, ишемически-реперфузионное повреждение, преэклампсия, отсроченная функция трансплантата при остром повреждении почек (DGF-AKI), острое повреждение почек, ассоциированное с сердечно-легочным шунтированием, гипоксически-ишемическая энцефалопатия, тромбоз, вызванный диализом, артериит Такаясу, рецидивирующий полихондрит, острая/профилактическая реакция "трансплантат против хозяина", хроническая реакция "трансплантат против хозяина", бета-талассемия, тромботическая микроангиопатия, ассоциированная с трансплантацией стволовых клеток, атрезия желчевыводящих путей, воспалительное заболевание печени, болезнь Бехчета, ишемический инсульт, внутримозговое кровоизлияние, склеродермия, склеродермический почечный криз, интерстициальная болезнь легких, ассоциированная со склеродермией (SSc-ILD), серповидноклеточное заболевание, аутосомно-доминантная поликистозная болезнь почек (ADPKD), периферическая нейропатия, вызванная химиотерапией (CIPN), диабетическая нейропатия, боковой амиотрофический склероз (ALS), диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, географическая атрофия, легочная артериальная гипертензия, рефрактерная тяжелая астма, хроническая обструктивная болезнь легких, идиопатический легочный фиброз (IPF), хроническая дисфункция аллотрансплантата легкого, легочные патологии при кистозном фиброзе, гнойный гидраденит, неалкогольная жировая болезнь печени (NASH), анкилозирующий спондилит, тромботическая микроангиопатия, ассоциированная с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-TMA) (предупреждение), ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, остеопороз (предупреждение), остеоартрит, друзы с высоким риском, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, интерстициальный цистит, активация системы комплемента, вызванная диализом, гангренозная пиодермия, хроническая сердечная недостаточность, аутоиммунный миокардит, назальный полипоз, острый и хронический панкреатит, атеросклероз, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гранулематоз, гиперэозинофильный синдром, заживление раны и тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (TTP).

При использовании в данном документе термин "дуплекс" в отношении нуклеиновых кислот (например, олигонуклеотидов) относится к структуре, образованной посредством комплементарного спаривания оснований двух антипараллельных последовательностей нуклеотидов.

При использовании в данном документе термины "эффективное количество", "терапевтически эффективное количество" и "достаточное количество" средства (например, олигонуклеотида для RNAi, описанного в данном документе), которое обеспечивает снижение уровня и/или активности СЗ (например, в клетке или у субъекта), относится к количеству, достаточному, при введении субъекту, в том числе человеку, для обеспечения благоприятных или требуемых результатов, включая клинические результаты, и как таковое "эффективное количество" или его синоним зависят от контекста, в котором их используют. Например, в контексте лечения заболевания, ассоциированного с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, оно представляет собой количество средства, которое обеспечивает снижение уровня и/или активности СЗ, достаточное для достижения ответа на лечение по сравнению с ответом, полученным без введения средства, которое обеспечивает снижение уровня и/или активности СЗ. Количество данного средства, которое обеспечивает снижение уровня и/или активности СЗ, описанного в данном документе, которое будет соответствовать такому количеству, будет варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как данное средство, фармацевтический состав, путь введения, тип заболевания или нарушения, идентичность субъекта (например, возраст, пол и/или вес) или хозяина, подлежащего лечению, и т. п., но, тем не менее, может быть без затруднений определено специалистом в данной области техники. Также при использовании в данном документе "терапевтически эффективное количество" средства, которое обеспечивает снижение уровня и/или активности СЗ, по настоящему изобретению представляет собой количество, которое приводит к благоприятному или требуемому результату у субъекта по сравнению с контролем. Как определено в данном документе, терапевтически эффективное количество средства, которое обеспечивает снижение уровня и/или активности СЗ, по настоящему изобретению может быть легко определено обычным специалистом посредством обычных способов, известных из уровня техники. Схема введения доз может быть скорректирована для обеспечения оптимального терапевтического ответа.

При использовании в данном документе термин "вспомогательное вещество" относится к нетерапевтическому средству, которое может быть включено в композицию, например, для обеспечения требуемой консистенции или стабилизирующего эффекта или способствования им.

Каждый из "G," "C," "A," "T" и "U", как правило, соответствует нуклеотиду, который содержит гуанин, цитозин, аденин, тимидин и урацил в качестве основания соответственно, но может содержать альтернативные сахарные фрагменты в дополнение к рибозе и дезоксирибозе. Также считается, что термин "нуклеотид" может также относиться к альтернативному нуклеотиду, как дополнительно подробно описано ниже, или к



суррогатному заменяющему фрагменту. Специалисту в данной области техники будет хорошо известно, что гуанин, цитозин, аденин и урацил можно заменять на другие фрагменты без существенного изменения свойств спаривания оснований олигонуклеотида, содержащего нуклеотид, несущий такой заменяющий фрагмент. Например, без ограничения нуклеотид, содержащий инозин в качестве своего основания, может спариваться основаниями с нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, можно заменять в нуклеотидных последовательностях олигонуклеотида, описанного в настоящем раскрытии, на нуклеотид, содержащий, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида можно заменять на гуанин и урацил соответственно с образованием неоднозначного спаривания оснований G-U с целевой mRNA. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, являются подходящими для композиций и способов, описанных в настоящем раскрытии.

При использовании в данном документе термин "ингибитор" относится к любому средству, которое обеспечивает снижение уровня и/или активности белка (например, C3). Неограничивающие примеры ингибиторов включают олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi, например, dsRNA, siRNA или shRNA). При использовании в данном документе термин "снижение" используется взаимозаменяемо с терминами "сайленсинг," "отрицательная регуляция," "супрессия" и другими сходными терминами, и он включает любой уровень снижения на 5% или больше (например, 10%, 15%, 25%, 35%, 50%, 75% и 100%). Типичный уровень белка C3, выявляемый в сыворотке крови здоровых людей, составляет приблизительно 75-175 мг/дл (например, 75-100 мг/дл, 75-125 мг/л, 75-150 мг/дл, 150-175 мг/дл, 125-175 мг/дл и 100-175 мг/дл).

Под "уровнем" подразумевается уровень или активность белка или mRNA, кодирующей белок (например, C3), необязательно по сравнению с эталоном. Эталон может представлять собой любой применимый эталон, определенный в данном документе. Под "уменьшенным уровнем" или "повышенным уровнем" белка подразумевается уменьшение или повышение уровня белка соответственно по сравнению с эталоном (например, уменьшение или повышение на приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 100%, приблизительно 150%, приблизительно 200%, приблизительно 300%, приблизительно 400%, приблизительно 500% или больше, например, по сравнению с эталоном; уменьшение или повышение на более чем приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 50%, приблизительно 75%, приблизительно 100% или приблизительно 200%, например, по сравнению с эталоном; уменьшение или повышение в менее чем приблизительно 0,01 раза, приблизительно 0,02 раза, приблизительно 0,1 раза, приблизительно 0,3 раза, приблизительно 0,5 раза,

приблизительно 0,8 раза или меньше, например, по сравнению с эталоном, или уменьшение или повышение в более чем приблизительно 1,2 раза, приблизительно 1,4 раза, приблизительно 1,5 раза, приблизительно 1,8 раза, приблизительно 2,0 раза, приблизительно 3,0 раза, приблизительно 3,5 раза, приблизительно 4,5 раза, приблизительно 5,0 раза, приблизительно 10 раз, приблизительно 15 раз, приблизительно 20 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно 50 раз, приблизительно 100 раз, приблизительно 1000 раз или больше, например, по сравнению с эталоном). Уровень белка или mRNA может быть выражен в масс./об. (например, г/дл, мг/мл, мкг/мл, нг/мл) или в процентах относительно общего количества белка или mRNA в образце.

При использовании в данном документе термин "петля" относится к неспаренной области нуклеиновой кислоты (например, олигонуклеотида), которая фланкирована двумя антипараллельными областями нуклеиновой кислоты, которые в достаточной степени комплементарны друг другу, за счет чего в подходящих условиях гибридизации (например, в фосфатном буфере или в клетке) две антипараллельные области, которые фланкируют неспаренную область, гибридизуются с образованием дуплекса (называемого "стебель").

При использовании в данном документе термин "модифицированная межнуклеотидная связь" относится к межнуклеотидной связи, содержащей одну или несколько химических модификаций по сравнению с эталонной межнуклеотидной связью, предусматривающей фосфодиэфирную связь. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой связь, не встречающуюся в природе. Как правило, модифицированная межнуклеотидная связь придает одно или несколько требуемых свойств нуклеиновой кислоте, в которой присутствует модифицированная межнуклеотидная связь. Например, модифицированный нуклеотид может обеспечивать улучшение термической стабильности, устойчивости к деградации, устойчивости к нуклеазам, растворимости, биологической доступности, биологической активности, сниженную иммуногенность и т. п.

При использовании в данном документе термин "модифицированный нуклеотид" относится к нуклеотиду, содержащему одну или несколько химических модификаций по сравнению с соответствующим эталонным нуклеотидом, выбранным из аденинового рибонуклеотида, гуанинового рибонуклеотида, цитозинового рибонуклеотида, урацилового рибонуклеотида, аденинового дезоксирибонуклеотида, гуанинового дезоксирибонуклеотида, цитозинового дезоксирибонуклеотида и тимидинового дезоксирибонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид представляет собой нуклеотид, не встречающийся в природе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит одну или несколько химических модификаций в своем сахаре, нуклеиновом основании и/или фосфатной группе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид содержит один или несколько химических фрагментов, конъюгированных с соответствующим эталонным нуклеотидом. Как правило, модифицированный нуклеотид придает одно или

несколько требуемых свойств нуклеиновой кислоте, в которой присутствует модифицированный нуклеотид. Например, модифицированный нуклеотид может обеспечивать улучшение термической стабильности, устойчивости к деградации, устойчивости к нуклеазам, растворимости, биологической доступности, биологической активности, сниженную иммуногенность и т. п.

"Структура четверной петли с разрывом" представляет собой структуру олигонуклеотида для RNAi, характеризующуюся наличием отдельных смысловых (сопровождающих) и антисмысловых (направляющих) нитей, в которой смысловая нить содержит область комплементарности с антисмысловой нитью и в которой по меньшей мере одна из нитей, как правило, смысловая нить, содержит четверную петлю, сконфигурированную для стабилизации смежной стеблевой области, образованной в пределах по меньшей мере одной нити. Структура четверной петли с разрывом обеспечивает одинарный разрыв в нуклеотидах смысловых и антисмысловых нитей, за счет чего они больше не соединяются в данном участке путем ковалентной связи.

Термины "нуклеиновое основание" и "основание" включают фрагменты из пурина (например, аденина и гуанина) и пиримидина (например, урацила, тимина и цитозина), присутствующие в нуклеозидах и нуклеотидах, которые образуют водородные связи при гибридизации нуклеиновых кислот. В контексте настоящего изобретения термин нуклеиновое основание также охватывает альтернативные нуклеиновые основания, которые могут отличаться от встречающихся в природе нуклеиновых оснований, но являются функциональными во время гибридизации нуклеиновых кислот. В данном контексте "нуклеиновое основание" относится как к встречающимся в природе нуклеиновым основаниям, таким как аденин, гуанин, цитозин, тимидин, урацил, ксантин и гипоксантин, так и к альтернативным нуклеиновым основаниям. Такие варианты, например, описаны в Hirao et al. (*Accounts of Chemical Research*, vol. 45: page 2055, 2012) and Bergstrom (*Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl.* 37 1.4.1, 2009).

Термин "нуклеозид" относится к мономерному звену или олигонуклеотиду, содержащему нуклеиновое основание и сахарный фрагмент. Нуклеозид может включать нуклеозиды, которые встречаются в природе, а также альтернативные нуклеозиды, такие как описанные в данном документе. Нуклеиновое основание нуклеозида может представлять собой нуклеиновое основание, встречающееся в природе, или альтернативное нуклеиновое основание. Сходным образом, сахарный фрагмент нуклеозида может представлять собой сахар, встречающийся в природе, или альтернативный сахар.

При использовании в данном документе термин "нуклеотид" относится к мономерному звену олигонуклеотида, которое содержит нуклеозид и межнуклеозидную связь. Межнуклеозидная связь может включать или может не включать фосфатную связь. Сходным образом, "связанные нуклеозиды" могут быть связаны или могут быть не связаны фосфатными связями. Множество "альтернативных межнуклеозидных связей" известно из уровня техники, включая без ограничения фосфатные, фосфоротиоатные и борфосфатные связи. Альтернативные нуклеозиды включают бициклические нуклеозиды (BNA)

(например, "заблокированные" нуклеозиды (LNA) и нуклеозиды, конформационно затрудненные этилом (cEt)), пептидные нуклеозиды (PNA), фосфотриэфиры, фосфотионаты, фосфорамидаты и другие варианты фосфатного остова нативного нуклеозида, включая описанные в данном документе.

При использовании в данном документе термин "олигонуклеотид" относится к короткой нуклеиновой кислоте, например, длиной менее чем 100 нуклеотидов. Олигонуклеотид может быть одонитевым или двухнитевым. Олигонуклеотид может содержать или может не содержать дуплексные области. В качестве группы неограничивающих примеров олигонуклеотид может представлять собой без ограничения малую интерферирующую РНК (siRNA), микроРНК (miRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA), интерферирующую РНК, представляющую собой субстрат для эндонуклеазы dicer (dsiRNA), антисмысловой олигонуклеотид, короткую siRNA или одонитевую siRNA. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид для RNAi.

При использовании в данном документе термин "выступ" относится к концевому нуклеотиду(нуклеотидам), не участвующему в спаривании оснований, полученному в результате того, что одна нить или область выходит за пределы конца комплементарной нити, с которой одна нить или область образует дуплекс. В некоторых вариантах осуществления выступ содержит один или несколько неспаренных нуклеотидов, выходящих за пределы дуплексной области на 5'-конце или 3'-конце олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi). В определенных вариантах осуществления выступ представляет собой 3'- или 5'-выступ на антисмысловой нити или смысловой нити олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi).

При использовании в данном документе термин "пациент, нуждающийся в этом" или "субъект, нуждающийся в этом" относится к идентификации субъекта на основании необходимости лечения заболевания или нарушения, такого как заболевание, опосредованное нарушением регуляции системы комплемента (например, нарушением регуляции, связанным с СЗ, таким как нарушение регуляции одного или всех путей системы комплемента (например, альтернативного, классического и/или лектинового путей)). Субъект может быть идентифицирован, например, как характеризующийся необходимостью лечения заболевания или нарушения (например, заболевания или нарушения, ассоциированного с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, раскрытого в данном документе), например, на основании диагноза, ранее поставленного специалистом в данной области техники (например, врачом).

"Процент (%) идентичности последовательностей" по отношению к эталонной олигонуклеотидной или полипептидной последовательности определяется как процент нуклеиновых кислот или аминокислот в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеиновым кислотам или аминокислотам в эталонной олигонуклеотидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимального процента

идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах возможностей специалиста в данной области техники, например, с применением общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2 или Megalign. Специалисты в данной области техники смогут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, в том числе любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, значения процента идентичности последовательностей могут быть получены с применением компьютерной программы BLAST для выравнивания последовательностей. В качестве иллюстрации процент идентичности последовательностей данной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, А, и данной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, В, с ней или относительно нее (что в качестве альтернативы можно перефразировать как данная последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность, А, которая характеризуется определенным процентом идентичности последовательности с данной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью, В, процентом идентичности при сравнении с ней или относительно нее) рассчитывают следующим образом:

$100 \times \frac{X}{Y}$  умножают на (отношение X/Y),

где X представляет собой количество нуклеотидов или аминокислот, определенных как идентичные совпадения с помощью программы для выравнивания последовательностей (например, BLAST) в данном программном выравнивании А и В, и где Y представляет собой общее количество нуклеиновых кислот в В. Будет понятно, что если длина последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности А не равна длине последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности В, то процент идентичности последовательностей А и В будет не равен проценту идентичности последовательностей В и А.

При использовании в данном документе "фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество" относится к любому ингредиенту, отличному от соединений, описанных в данном документе (например, среде-носителю, способной обеспечивать суспендирование или растворение активного соединения), и характеризующемуся свойствами по сути отсутствия токсичности и отсутствия воспалительного эффекта у пациента. Вспомогательные вещества могут включать, например, антиадгезивы, антиоксиданты, связующие, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, красители (колоранты), эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, ароматизаторы, отдушки, вещества, способствующие скольжению (усилители скольжения), смазочные средства, консерванты, чернила для печати, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители и типы воды для

гидратации. Иллюстративные вспомогательные вещества включают без ограничения бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), карбонат кальция, фосфат кальция (двухосновный), стеарат кальция, кроскармеллозу, сшитый поливинилпирролидон, лимонную кислоту, кросповидон, цистеин, этилцеллюлозу, желатин, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, лактозу, стеарат магния, мальтит, маннит, метионин, метилцеллюлозу, метилпарабен, микрокристаллическую целлюлозу, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон, повидон, прежелатинизированный крахмал, пропилпарабен, ретинилпальмитат, шеллак, диоксид кремния, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, цитрат натрия, крахмалгликолят натрия, сорбит, крахмал (кукурузный), стеариновую кислоту, сахарозу, тальк, диоксид титана, витамин А, витамин Е, витамин С и ксилит.

При использовании в данном документе термин "фармацевтически приемлемая соль" означает любую фармацевтически приемлемую соль соединения любого из соединений, описанных в данном документе. Например, фармацевтически приемлемые соли любого из соединений, описанных в данном документе, включают соли, которые находятся в пределах объема медицинского суждения, подходящие для применения при контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и которые соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли широко известны из уровня техники. Например, фармацевтически приемлемые соли описаны в Berge et al., J. Pharmaceutical Sciences 66:1-19, 1977 и в Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Eds. P.H. Stahl and C.G. Wermuth), Wiley-VCH, 2008. Соли можно получать *in situ* в ходе конечного выделения и очистки соединений, описанных в данном документе, или отдельно путем осуществления реакции группы свободного основания с подходящей органической кислотой. Соединения, описанные в данном документе, могут содержать ионизируемые группы, за счет чего их можно получать в виде фармацевтически приемлемых солей. Такие соли могут представлять собой соли присоединения кислоты, образованные из неорганических или органических кислот, или соли можно получать, в случае кислотных форм соединений, описанных в данном документе, из неорганических или органических оснований. Часто соединения получают или применяют в виде фармацевтически приемлемых солей, полученных в виде продуктов присоединения фармацевтически приемлемых кислот или оснований. Подходящие фармацевтически приемлемые кислоты, основания и способы получения подходящих солей широко известны из уровня техники. Соли можно получать из фармацевтически приемлемых нетоксичных кислот и оснований, включая неорганические и органические кислоты и основания. Иллюстративные соли присоединения кислоты включают такие соли как ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспарат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидройодид, 2-гидроксиэтансульфонат,

лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат и валерат. Иллюстративные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают катионы натрия, лития, калия, кальция и магния, а также нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая без ограничения аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин и этиламин.

При использовании в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, содержащей соединение (например, олигонуклеотид для RNAi), описанное в данном документе, составленной с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом и необязательно изготовленной или продаваемой при одобрении государственного регулирующего органа как часть терапевтической схемы для лечения заболевания у млекопитающего. Фармацевтические композиции могут быть составлены, например, для подкожного введения, для внутривенного введения (например, в виде стерильного раствора без эмбол в виде частиц и в системе растворителей, подходящей для внутривенного применения); для интратекальной инъекции; для интрацеребровентрикулярных инъекций; для интрапаренхиматозной инъекции; для перорального введения в стандартной лекарственной форме (например, таблетке, капсуле, каплете, желатиновой капсуле или сиропе); для местного введения (например, в виде крема, геля, лосьона или мази, или в любом другом фармацевтически приемлемом составе).

При использовании в данном документе термин "фосфатный аналог" относится к химическому фрагменту, который имитирует электростатические и/или стерические свойства фосфатной группы. В некоторых вариантах осуществления фосфатный аналог расположен на 5'-концевом нуклеотиде олигонуклеотида вместо 5'-фосфата, который зачастую чувствителен к ферментативному удалению. В некоторых вариантах осуществления 5'-фосфатный аналог содержит связь, устойчивую к фосфатазам. Примеры фосфатных аналогов включают 5'-фосфонаты, такие как 5'-метиленфосфонат (5'-MP) и 5'-(E)-винилфосфонат (5'-VP). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит фосфатный аналог при 4'-углеродном положении сахара (называемый "4'-фосфатный аналог") при 5'-концевом нуклеотиде. Примером 4'-фосфатного аналога является оксиметилфосфонат, в котором атом кислорода оксиметильной группы соединен с сахарным фрагментом (например, при его 4'-углероде) или его аналогом. См., например, US 2019/0177729, содержание каждой из которых, относящееся к фосфатным аналогам, включено в данный документ посредством ссылки. Другие модификации были разработаны для 5'-конца олигонуклеотидов (см., например, WO 2011/133871; патент США № 8927513 и Prakash *et al.* (2015), *Nucleic Acids Res.*, 43(6):2993-3011, содержание каждой из которых, относящееся к фосфатным аналогам, включено в данный документ посредством ссылки).

При использовании в данном документе термин "зонд" относится к любой молекуле, которая способна селективно связываться с конкретной последовательностью, например,

молекулой нуклеиновой кислоты, такой как mRNA. Зонды можно синтезировать с применением широко известных и общепринятых способов в области техники или получать из подходящих биологических препаратов. Зонды можно специфически конструировать таким образом, чтобы они были мечеными. Примеры молекул, которые можно применять в качестве зондов, включают без ограничения РНК, ДНК, белки, антитела и органические молекулы.

При использовании в данном документе термин "сниженная экспрессия" гена относится к уменьшению количества РНК-транскрипта или белка, кодируемых геном, и/или к уменьшению уровня активности гена в клетке или у субъекта по сравнению с подходящей эталонной клеткой или субъектом. Например, действие, заключающееся в обработке клетки олигонуклеотидом для RNAi (например, олигонуклеотидом, содержащим антисмысловую нить, которая комплементарна последовательности mRNA C3), может привести к уменьшению количества РНК-транскрипта, белка и/или активности (например, кодируемых геном C3) по сравнению с клеткой, которую не обрабатывали олигонуклеотидом для RNAi. Сходным образом, используемый в данном документе термин "снижение экспрессии" относится к действию, которое приводит к сниженной экспрессии гена (например, C3). Снижение экспрессии можно оценивать путем уменьшения концентрации C3 в сыворотке крови, как описано в данном документе (например, относительно, например, клетки, которую не приводили в контакт с олигонуклеотидом, описанным в данном документе). В качестве альтернативы снижение экспрессии можно оценить по уменьшению уровня транскрипции и/или трансляции mRNA C3 (например, снижению на по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55% или 60% или больше, такого как снижение в диапазоне 1-60% или больше, относительно, например, клетки, которую не приводили в контакт с олигонуклеотидом, описанным в данном документе).

Под "эталонном" подразумевается любой применимый эталон, используемый для сравнения уровней или активности белка или mRNA. Эталон может представлять собой любой образец, стандарт, стандартную кривую или уровень, которые используются в целях сравнения. Эталон может представлять собой нормальный эталонный образец или эталонный стандарт или уровень. "Эталонный образец" может представлять собой, например, контроль, например, предварительно определенное отрицательное контрольное значение, такое как "нормальный контрольный" или предыдущий образец, взятый от того же субъекта; образец от нормального здорового субъекта, такой как нормальная клетка или нормальная ткань; образец (например, клетка или ткань) от субъекта, не имеющего заболевания; образец от субъекта, у которого диагностировано заболевание, но его еще не лечили соединением, описанным в данном документе; образец от субъекта, которого лечили соединением, описанным в данном документе, или образец очищенного олигонуклеотида или белка (например, любого описанного в данном документе) в известной нормальной концентрации. Под "эталонным стандартом или уровнем" подразумевается значение или число, полученное с применением эталонного образца.



"Нормальное контрольное значение" представляет собой предварительно определенное значение, указывающее на состояние без заболевания, например, значение, ожидаемое у здорового контрольного субъекта. Как правило, нормальное контрольное значение выражается в виде диапазона ("от X до Y"), верхнего порогового значения ("не выше чем X") или нижнего порогового значения ("не ниже чем X"). Субъект, характеризующийся измеренным значением в пределах нормального контрольного значения для конкретного биомаркера, как правило, называется как находящийся "в пределах нормы" в отношении данного биомаркера. Нормальный эталонный стандарт или уровень могут представлять собой значение или число, полученные у нормального субъекта, не имеющего заболевания или нарушения (например, заболевания или нарушения, ассоциированного с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента); субъекта, которого лечили соединением, описанным в данном документе. В предпочтительных вариантах осуществления эталонный образец, стандарт или уровень сравнивают с образцом от субъекта по по меньшей мере одному из следующих критериев: возраст, вес, пол, стадия заболевания и общее состояние здоровья. Стандартную кривую уровней очищенного олигонуклеотида или белка, например, любого из описанных в данном документе, в пределах нормального эталонного диапазона можно также использовать в качестве эталона.

При использовании в данном документе термин "область комплементарности" относится к области в антисмысловой нити олигонуклеотида, которая в значительной степени комплементарна всему или части гена, первичного транскрипта, последовательности (например, целевой последовательности, например, нуклеотидной последовательности C3) или процессированной mRNA, с тем чтобы препятствовать экспрессии эндогенного гена (например, C3). Если область комплементарности не полностью комплементарна целевой последовательности, случаи неправильного спаривания могут иметь место во внутренних или концевых областях молекулы. В целом наиболее приемлемые неправильные спаривания находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов 5'- и/или 3'-конца олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi).

При использовании в данном документе термин "рибонуклеотид" относится к нуклеотиду, содержащему рибозу в качестве пентозного сахара, которая содержит гидроксильную группу в своем 2'-положении. Модифицированный рибонуклеотид представляет собой рибонуклеотид, содержащий одну или несколько модификаций или замен атомов, за исключением 2'-положения, включая модификации или замены рибозы, фосфатной группы или основания или внутри них.

При использовании в данном документе термин "олигонуклеотид для RNAi" относится к либо (a) двухнитевому олигонуклеотиду, содержащему смысловую нить (сопровождающую) и антисмысловую нить (направляющую), в котором антисмысловая нить или часть антисмысловой нити используется эндонуклеазой Argonaute 2 (Ago2) при расщеплении целевой mRNA, либо (b) однонитевому олигонуклеотиду, содержащему одинарную антисмысловую нить, где данная антисмысловая нить (или часть

антисмысловой нити) используется эндонуклеазой Ago2 при расщеплении целевой mRNA. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi содержит область петли, такую как стебель-петля, которая содержит нуклеозиды, как определено в данном документе. Олигонуклеотид для RNAi включает, например, dsRNA, siRNA и shRNA, которые опосредуют целевое расщепление РНК-транскрипта посредством пути РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). Олигонуклеотид для RNAi управляет специфической к последовательности деградацией mRNA в процессе, известном как РНК-интерференция (RNAi). Олигонуклеотид для RNAi обеспечивает снижение экспрессии C3 в клетке, например, клетке субъекта, такого как субъект-млекопитающее. В целом большинство нуклеозидов олигонуклеотида для RNAi являются рибонуклеозидами, но, как описано подробно в данном документе, каждая из обеих нитей также может содержать один или несколько нуклеозидов, отличных от рибонуклеозидов, например, дезоксирибонуклеозидов и/или альтернативных нуклеозидов. Олигонуклеотид для RNAi по сути находится в дуплексной форме. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной области(областей) олигонуклеотида для RNAi образуется между антипараллельными последовательностями нуклеотидов нитей нуклеиновой кислоты, не связанных ковалентно. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной области(областей) олигонуклеотида для RNAi образуется между антипараллельными последовательностями нуклеотидов нитей нуклеиновой кислоты, которые ковалентно связаны. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной области(областей) олигонуклеотида для RNAi образовано одной нитью нуклеиновой кислоты, которая свернута (например, в виде шпильки), с получением комплементарных антипараллельных последовательностей нуклеотидов, которые спариваются основаниями друг с другом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi содержит две ковалентно не связанные нити нуклеиновой кислоты, которые образуют полный дуплекс друг с другом. Однако в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi содержит две ковалентно не связанные нити нуклеиновой кислоты, которые образуют частичный дуплекс, например, содержат выступы на одном или обоих концах. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi содержит антипараллельную последовательность нуклеотидов, которые частично комплементарны, и, таким образом, может содержать один или несколько случаев неправильного спаривания, которые могут включать случаи внутреннего неправильного спаривания или случаи концевое неправильного спаривания.

При использовании в данном документе термины "смысловая нить" и "сопровождающая нить" относятся к нити олигонуклеотида для RNAi, которая содержит область, которая по сути комплементарна области антисмысловой нити. Область смысловой нити, которая комплементарна области антисмысловой нити, на по меньшей мере 85% (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и 100%) идентична части целевого гена (например, гена C3). Например, смысловая нить может содержать область, которая на по меньшей мере 85% идентична части SEQ ID

NO: 12, например, на протяжении по меньшей мере 10-36 нуклеотидов, например, на протяжении длины от 10 до 31 нуклеотида, от 10 до 26 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов или от 10 до 15 нуклеотидов.

Термины "siRNA" и "короткая интерферирующая РНК", также известная как "малая интерферирующая РНК", относятся к средству на основе РНК, необязательно средству для RNAi, длиной приблизительно 10-50 нуклеотидов, при этом нити необязательно содержат выступающие концы, содержащие, например, 1, 2 или 3 выступающих связанных нуклеозида, которое способно управлять РНК-интерференцией или опосредовать ее. Встречающиеся в природе siRNA получают из более длинных молекул dsRNA (например, длиной > 25 связанных нуклеозидов) посредством клеточного механизма RNAi (например, Dicer или ее гомолога).

При использовании в данном документе термин "нить" относится к одинарной непрерывной последовательности нуклеотидов, связанных вместе посредством межнуклеотидных связей (например, фосфодиэфирных связей, фосфоротиоатных связей). В некоторых вариантах осуществления нить содержит два свободных конца, например, 5'-конец и 3'-конец.

При использовании в данном документе термин "субъект" относится к любому организму, которому можно вводить композицию в соответствии с настоящим изобретением, например, в экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целях. Типичные субъекты включают любое животное (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, отличные от человека, и люди). Субъект может находиться в поисках или нуждаться в лечении, требовать лечения, получать лечение, получать лечение в будущем или представлять собой человека или животное, которые находятся под наблюдением квалифицированного профессионала в отношении конкретного заболевания или состояния.

"Сахар" или "сахарный фрагмент" включает встречающиеся в природе сахара, содержащие фуранозное кольцо. Сахар также предусматривает "альтернативный сахар", определенный как структура, которая способна замещать фуранозное кольца нуклеозида. В определенных вариантах осуществления альтернативные сахара представляют собой нефуранозные (или 4'-замещенные фуранозные) кольца или кольцевые системы или открытые системы. Такие структуры включают простые изменения относительно природного фуранозного кольца, такие как шестичленное кольцо, или могут быть более сложными, как в случае с некольцевой системой, используемой в пептидной нуклеиновой кислоте. Альтернативные сахара также могут включать сахарные суррогаты, где фуранозное кольцо было заменено на другую кольцевую систему, такую как, например, морфолиновая или гекситольная кольцевая система. Сахарные структурные единицы, применимые в получении олигонуклеотидов, содержащих мотивы, включают без ограничения,  $\beta$ -D-рибозу,  $\beta$ -D-2'-дезоксирибозу, замещенные сахара (такие как 2'-, 5'- и бисзамещенные сахара), 4'-S-сахара (такие как 4'-S-рибоза, 4'-S-2'-дезоксирибоза и 4'-S-2'-замещенная рибоза), бициклические альтернативные сахара (такие как бициклические

сахара, полученные из 2'-О-CH<sub>2</sub>-4'- или 2'-О-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-4'-мостиковой рибозы) и сахарные суррогаты (например, если рибозное кольцо было заменено на морфолиновую или гекситольную кольцевую систему). Тип гетероциклического основания и межнуклеозидной связи, используемых при каждом положении, варьируется и не является фактором в определении мотива. В большинстве нуклеозидов, содержащих альтернативную сахарную структурную единицу, гетероциклическое нуклеиновое основание, как правило, сохраняется для обеспечения гибридизации.

При использовании в данном документе термин "стебель-петля" относится к области олигонуклеотида, где две области содержат комплементарную нуклеотидную последовательность, когда одна считывается в направлении 5'-3', а другая считывается в направлении 3'-5', и нуклеотиды между двумя областями образуют неспаренную петлю. Область стебель-петля также может называться шпилькой или шпилечной петлей.

При использовании в данном документе термин "нить" относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь связанных нуклеозидов. "Нить, содержащая последовательность нуклеиновых оснований", относится к олигонуклеотиду, содержащему цепь связанных нуклеозидов, которая описывается последовательностью, обозначенной с применением стандартной номенклатуры нуклеиновых оснований.

При использовании в данном документе термин "синтетический" относится к нуклеиновой кислоте или другой молекуле, которая искусственно синтезирована (например, с применением прибора (например, твердофазного синтезатора нуклеиновых кислот)), или которая иным образом не получена из природного источника (например, клетки или организма), который обычно продуцирует молекулу.

При использовании в данном документе термин "нацеливать" или "нацеливание" относится к олигонуклеотиду, способному к специфическому связыванию с геном *C3* или mRNA *C3*, кодирующими продукт гена *C3*. Например, он относится к олигонуклеотиду, способному подавлять указанный ген или указанную mRNA (например, путем снижения уровня белка, кодируемого геном или mRNA) посредством способов, известных специалистам в данной области техники (например, в области антисмысловой и РНК-интерференции).

При использовании в данном документе термин "нацеливающий лиганд" относится к молекуле (например, углеводу, аминсахару, холестерину, полипептиду или липиду), которая селективно связывается с когнатной молекулой (например, рецептором) из ткани или клетки, представляющей интерес, и которая способна к конъюгации с другим веществом для целей нацеливания другого вещества на ткань или клетку, представляющую интерес. Например, в некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд может быть конъюгирован с олигонуклеотидом или с вектором (например, вирусным вектором), содержащим олигонуклеотид, для целей нацеливания олигонуклеотида на конкретную ткань или клетку, представляющую интерес. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд селективно связывается с рецептором клеточной поверхности. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд при

конъюгации с олигонуклеотидом или вектором облегчает доставку олигонуклеотида в конкретную клетку посредством селективного связывания с рецептором, экспрессируемым на поверхности клетки, и эндосомную интернализацию клеткой комплекса, содержащего олигонуклеотид, нацеливающий лиганд и рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд конъюгирован с олигонуклеотидом посредством линкера, который расщепляется после или в ходе клеточной интернализации, в результате чего олигонуклеотид высвобождается от нацеливающего лиганда в клетке.

При использовании в данном документе термин "четверная петля" относится к петле, которая повышает стабильность расположенного рядом дуплекса, образованного путем гибридизации фланкирующих последовательностей нуклеотидов. Повышение стабильности можно выявить как повышение температуры плавления ( $T_m$ ) расположенного рядом стеблевого дуплекса, которая выше, чем  $T_m$  расположенного рядом стеблевого дуплекса, ожидаемая, в среднем, для совокупности петель сопоставимой длины, состоящих из произвольным образом выбранных последовательностей нуклеотидов. Например, четверная петля может придавать температуру плавления, составляющую по меньшей мере  $50^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере  $55^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере  $56^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере  $58^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере  $60^{\circ}\text{C}$ , по меньшей мере  $65^{\circ}\text{C}$  или по меньшей мере  $75^{\circ}\text{C}$ , в 10 мМ  $\text{NaHPO}_4$ , шпильке, содержащей дуплекс длиной по меньшей мере 2 пары оснований. В некоторых вариантах осуществления четверная петля способна стабилизировать пару оснований в расположенном рядом стеблевым дуплексе путем стэкинг-взаимодействий. Кроме того, взаимодействия среди нуклеотидов в четверной петле включают спаривание оснований не по правилу Уотсона-Крика, стэкинг-взаимодействия, образование водородных связей и контактные взаимодействия (Cheong *et al.*, Nature 1990 Aug. 16; 346(6285):680-2; Heus and Pardi, Science 1991 Jul. 12; 253(5016):191-4). В некоторых вариантах осуществления четверная петля содержит от 3 до 6 нуклеотидов или состоит из них и представляет собой, как правило, от 4 до 5 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления четверная петля содержит три, четыре, пять или шесть нуклеотидов, которые могут быть модифицированы или могут быть не модифицированы (например, которые могут быть конъюгированы или могут быть не конъюгированы с нацеливающим фрагментом), или состоит из них. В одном варианте осуществления четверная петля состоит из четырех нуклеотидов. В четверной петле может использоваться любой нуклеотид, и для таких нуклеотидов могут применяться стандартные символы согласно IUPAC-IUB, как описано в Cornish-Bowden (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3021-3030. Например, буква "N" может применяться для обозначения того, что в данном положении может быть любое основание, буква "R" может применяться для демонстрации того, что в данном положении может быть А (аденин) или G (гуанин), и "B" может применяться для демонстрации того, что в данном положении может быть C (цитозин), G (гуанин) или T (тимин). Примеры четверных петель включают семейство UNCG четверных петель (например, UUCG), семейство GNRA четверных петель (например, GAAA) и четверную петлю CUUG. (Woese *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1990 November; 87(21):8467-71; Antao *et al.*, Nucleic Acids Res. 1991 Nov. 11;

19(21):5901-5). Примеры четверных петель ДНК включают семейство d(GNNA) четверных петель (например, d(GTTA), семейство d(GNRA)) четверных петель, семейство d(GNAB) четверных петель, семейство d(CNNG) четверных петель и семейство d(TNCG) четверных петель (например, d(TTCG)). См., например, Nakano *et al.* Biochemistry, 41 (48), 14281-14292, 2002. SHINJI *et al.* Nippon Kagakukai Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; pg. 731 (2000), которые включены в данный документ посредством ссылки с целью их надлежащего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления четверная петля содержится в пределах структуры четверной петли с разрывом.

"Терапевтически-эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" относится к количеству (вводимому в однократной или в многократных дозах) композиции на основе олигонуклеотида по настоящему изобретению (например, олигонуклеотида для RNAi, такого как dsRNA), которое вызывает требуемый местный или системный эффект, например, лечение одного или нескольких симптомов заболевания, возникшего в результате активации или нарушения регуляции пути системы комплемента). Олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi), используемые в способах по настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве с обеспечением разумного соотношения польза/риск, применимого для такого лечения.

При использовании в данном документе термин "лечить" относится к действию предоставления ухода субъекту, нуждающемуся в этом, например, посредством введения терапевтического средства (например, олигонуклеотида, описанного в данном документе) субъекту в целях улучшения здоровья и/или благополучия субъекта по отношению к существующему состоянию (например, заболеванию, нарушению) или предупреждения или снижения вероятности возникновения состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение включает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака, симптома или фактора, обуславливающего состояние (например, заболевание, нарушение), испытываемое субъектом. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту или олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), описанные в данном документе, используют для контроля клеточных и клинических проявлений нарушения пути системы комплемента, такого как, например, одного или нескольких заболеваний, ассоциированных с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, раскрытых в данном документе.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В данном документе описаны олигонуклеотиды, например, олигонуклеотиды для RNAi, включая олигонуклеотиды со смысловой и антисмысловой нитью, и их фармацевтически приемлемые соли, которые нацеливаются на компонент системы комплемента (C3), который, как известно, играет роль в активации пути системы комплемента. Олигонуклеотиды можно вводить для снижения уровня и/или активности C3 в клетке (например, в гепатоцитах). Например, олигонуклеотиды можно вводить *in vivo*, и они могут подвергаться интернализации клеткой (например, гепатоцитом; например, путем связывания с сиалогликопротеиновым рецептором (ASGPR)). После клеточной

интернализации олигонуклеотиды могут связываться РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) и нацеливаться на mRNA C3, таким образом инициируя деградацию mRNA C3 и блокирование ее трансляции.

Заболевания, опосредованные нарушением регуляции системы комплемента, часто являются результатом избыточной активности системы комплемента. В данном документе описаны способы лечения заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента или ассоциированных с ними, посредством введения олигонуклеотидов, описанных в данном документе, которые обеспечивают снижение уровня экспрессии C3. Примеры нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента или ассоциированных с ними, которые можно лечить с применением олигонуклеотидов и композиций, описанных в данном документе, включают, например, кожные нарушения, неврологические нарушения, нефрологические нарушения, требующие неотложной помощи, ревматические нарушения, легочные нарушения, дерматологические нарушения, гематологические нарушения и офтальмологические нарушения, такие как, например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), IgA-нефропатия, волчаночный нефрит, C3-гломерулопатия (C3G), дерматомиозит/аутоиммунный миозит, системный склероз, демиелинизирующая полинейропатия, пузырчатка, мембранозная нефропатия, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS), буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз (EBA), пемфигоид слизистой оболочки, ANCA-васкулит, уртикарный васкулит с гипокомплементемией, иммуннокомплексный васкулит мелких сосудов, кожный васкулит мелких сосудов, аутоиммунная некротизирующая миопатия, отторжение трансплантированного органа, такое как отторжение трансплантата почки, печени, сердца или легкого, включая антителоопосредованное отторжение (AMR), такое как хроническое AMR (сAMR), антифосфолипидный (aPL) синдром, опосредованный Ab, гломерулонефрит, астма, болезнь плотных отложений (DDD), возрастная макулярная дегенерация (AMD), системная красная волчанка (SLE), ревматоидный артрит (RA), тяжелый рефрактерный RA, синдром Фелти, рассеянный склероз (MS), травматическое повреждение головного мозга (TBI), повреждение спинного мозга, ишемически-реперфузионное повреждение, преэклампсия, отсроченная функция трансплантата при остром повреждении почек (DGF-AKI), острое повреждение почек, ассоциированное с сердечно-легочным шунтированием, гипоксически-ишемическая энцефалопатия, тромбоз, вызванный диализом, артериит Такаясу, рецидивирующий полихондрит, острая/профилактическая реакция "трансплантат против хозяина", хроническая реакция "трансплантат против хозяина", бета-талассемия, тромботическая микроангиопатия, ассоциированная с трансплантацией стволовых клеток, атрезия желчевыводящих путей, воспалительное заболевание печени, болезнь Бехчета, ишемический инсульт, внутримозговое кровоизлияние, склеродермия, склеродермический почечный криз, интерстициальная болезнь легких, ассоциированная со склеродермией (SSc-ILD), серповидноклеточное заболевание, аутосомно-доминантная поликистозная

болезнь почек (ADPKD), периферическая нейропатия, вызванная химиотерапией (CIPN), диабетическая нейропатия, боковой амиотрофический склероз (ALS), диабетическая нефропатия, диабетическая ретинопатия, географическая атрофия, легочная артериальная гипертензия, рефрактерная тяжелая астма, хроническая обструктивная болезнь легких, идиопатический легочный фиброз (IPF), хроническая дисфункция аллотрансплантата легкого, легочные патологии при кистозном фиброзе, гнойный гидраденит, неалкогольная жировая болезнь печени (NASH), анкилозирующий спондилит, тромботическая микроангиопатия, ассоциированная с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-TMA) (предупреждение), ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, остеопороз (предупреждение), остеоартрит, друзы с высоким риском, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, интерстициальный цистит, активация системы комплемента, вызванная диализом, гангренозная пиодермия, хроническая сердечная недостаточность, аутоиммунный миокардит, назальный полипоз, острый и хронический панкреатит, атеросклероз, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гранулематоз, гиперэозинофильный синдром, заживление раны и тромботическая тромбоцитопеническая пурпура (ТТР).

Композиции и способы, описанные в данном документе, предусматривают олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), который содержит смысловую нить и антисмысловую нить, которые характеризуются значительной идентичностью последовательности с областью гена *C3*.

Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) можно использовать для регуляции активности пути системы комплемента, например, путем снижения уровня и/или активности *C3* в клетке (например, гепатоците), такой как клетка субъекта (например, человека), нуждающегося в этом. Общая конструкция нацеливается на *C3* пути системы комплемента и оставляет активацию (защиту) других путей альтернативного, классического и лектинового путей интактной. Соответственно, в настоящем изобретении описаны композиции и способы для лечения заболеваний или нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, например, заболеваний или нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции *C3*).

Целевая последовательность компонента 3 системы комплемента

В данном документе предусмотрены ингибиторы экспрессии *C3* на основе олигонуклеотида, которые можно использовать для достижения терапевтической пользы. Посредством исследования mRNA *C3* (см., например, пример 3) и тестирования *in vitro* и *in vivo* было обнаружено, что последовательности mRNA *C3* применимы в качестве последовательностей для нацеливания, поскольку они восприимчивы к подавлению на основе олигонуклеотида. Например, целевая последовательность *C3* может содержать последовательность, изложенную под любым из SEQ ID No: 13 или 14, которые соответствуют нуклеотидам 4121-4141 и 780-798 соответственно из *C3* системы комплемента *Homo sapiens* с эталонной последовательностью NM\_0.000064.4 (SEQ ID NO: 12), или может состоять из нее. Эти последовательности *C3* могут представлять собой



целевые последовательности для соединения А и соединения В соответственно и их варианты, описанные в данном документе, которые характеризуются до 85% идентичностью последовательности с ними. Соединения А и В (и их варианты, описанные в данном документе) также способны эффективно нацеливаться на C3 системы комплемента *Rhesus macaque* и *Cynomolgus macaques* с эталонными последовательностями XM\_015122636.2 и XM\_005587719.2 соответственно. Кроме того, целевая последовательность C3 может содержать последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 31, которая соответствует нуклеотидам 2903-2922 C3 системы комплемента *Mus musculus* с эталонной последовательностью NM\_009778.3 (SEQ ID NO: 32), или может состоять из нее, которая может представлять собой мишень соединения J (например, олигонуклеотида для RNAi, содержащего смысловую последовательность под SEQ ID NO: 15 и антисмысловую последовательность под SEQ ID NO: 16). Соединение J также может нацеливаться на C3 системы комплемента *Rattus norvegicus* с эталонной последовательностью NM\_016994.2. На такие области mRNA C3 можно нацеливаться с применением олигонуклеотидов для RNAi, таких как средства на основе dsRNA, описанные в данном документе, в целях подавления экспрессии mRNA C3 и последующей экспрессии белка C3.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые нити средств на основе олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi), предусмотренных в данном документе, могут быть сконструированы с наличием областей комплементарности mRNA C3 (например, в пределах целевой последовательности mRNA C3) в целях нацеливания на mRNA в клетках и подавления ее экспрессии. Длина и содержание оснований области комплементарности обычно являются подходящими для способствования отжигу олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) или его нити на mRNA C3 в целях подавления ее транскрипции. Длина области комплементарности может составлять по меньшей мере 11, например, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19 или по меньшей мере 20 нуклеотидов. Например, олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, может содержать область комплементарности mRNA C3, длина которой находится в диапазоне от 12 до 30 (например, от 12 до 30, от 12 до 22, от 15 до 25, от 17 до 21, от 18 до 27, от 19 до 27 или от 15 до 30) нуклеотидов. Соответственно, олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, может содержать область комплементарности C3, длина которой составляет 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых случаях олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, может содержать область комплементарности mRNA C3, длина которой составляет 19 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида (например, антисмысловая нить олигонуклеотида для RNAi) может быть комплементарна непрерывной последовательности нуклеотидов в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12, длина которой составляет 20 нуклеотидов.

В определенных случаях олигонуклеотид для RNAi по настоящему изобретению может содержать область комплементарности (например, в антисмысловой нити олигонуклеотида для RNAi), которая по меньшей мере частично комплементарна последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12. Например, олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержать область комплементарности (например, в антисмысловой нити олигонуклеотида для RNAi), которая полностью комплементарна последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12. Область комплементарности олигонуклеотида (например, в антисмысловой нити олигонуклеотида для RNAi) может быть комплементарна непрерывной последовательности нуклеотидов последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12, длина которой находится в диапазоне от 12 до 20 нуклеотидов (например, от 12 до 20, от 12 до 18, от 12 до 16, от 12 до 14, от 14 до 20, от 14 до 18, от 14 до 16, от 16 до 20, от 16 до 18 или от 18 до 20). В некоторых вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида (например, в антисмысловой нити олигонуклеотида для RNAi) может быть комплементарна непрерывной последовательности нуклеотидов в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12, длина которой составляет 19 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида (например, антисмысловая нить олигонуклеотида для RNAi) может быть комплементарна непрерывной последовательности нуклеотидов в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12, длина которой составляет 20 нуклеотидов.

Область комплементарности олигонуклеотида, которая комплементарна смежным нуклеотидам последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12, может охватывать часть полной длины антисмысловой нити. Например, область комплементарности олигонуклеотида, которая комплементарна смежным нуклеотидам последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12, может охватывать по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% и по меньшей мере 99%) полной длины антисмысловой нити. В определенных вариантах осуществления область комплементарности олигонуклеотида, которая комплементарна смежным нуклеотидам, представленным под SEQ ID NO: 12, может охватывать полную длину антисмысловой нити.

Область комплементарности с mRNA C3 может содержать один или несколько случаев неправильного спаривания при сравнении с соответствующей последовательностью mRNA C3. Например, область комплементарности в олигонуклеотиде (например, олигонуклеотиде длиной от 20 до 50 нуклеотидов, таком как олигонуклеотид длиной 20-25 нуклеотидов (например, длиной 22 нуклеотида), может содержать до 1, до 2, до 3, до 4 или до 5 случаев неправильного спаривания при условии, что она сохраняет способность образовывать комплементарные пары оснований с mRNA C3 в подходящих условиях гибридизации. В качестве альтернативы область комплементарности в олигонуклеотиде может содержать не более чем 1, не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4 или не более чем 5 случаев неправильного спаривания при

условии, что она сохраняет способность образовывать комплементарные пары оснований с mRNA C3 в подходящих условиях гибридизации. Если в области комплементарности имеет место более одного случая неправильного спаривания, случаи неправильного спаривания могут располагаться последовательно (например, 2, 3, 4 или 5 в ряду) или распределяться по области комплементарности, при условии что олигонуклеотид сохраняет способность образовывать комплементарные пары оснований с mRNA C3 в подходящих условиях гибридизации. Например, олигонуклеотид для RNAi может содержать смысловой олигонуклеотид с последовательностью под SEQ ID NO: 4 и его варианты с до 1, 2, 3, 4 или 5 случаев неправильного спаривания относительно соответствующей последовательности C3 под SEQ ID NO: 12, или соответствующую антисмысловую последовательность под SEQ ID NO: 6 и ее варианты с до 1, 2, 3, 4 или 5 случаев неправильного спаривания относительно последовательности под SEQ ID NO: 4.

#### Типы олигонуклеотидов

Существует ряд структур олигонуклеотидов, которые применимы для нацеливания на C3 в способах по настоящему изобретению, включая RNAi, антисмысловую miRNA, shRNA и другие. Любую из структур, описанных в данном документе или где-либо еще, можно использовать в качестве каркаса для включения или нацеливания последовательности, описанной в данном документе (например, интересующей последовательности C3, такой как последовательности под SEQ ID NO: 13 или 14).

Композиции, описанные в данном документе, которые представляют собой олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi), кодируют ингибирующие конструкции (например, векторы на основе нуклеиновой кислоты, кодирующие их), которые нацеливаются на mRNA C3 (например, SEQ ID NO: 12). Олигонуклеотиды, предназначенные для снижения экспрессии C3, могут вовлекать пути РНК-интерференции (RNAi) до или после вовлечения эндонуклеазы *dicer*. Например, олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi) были разработаны со значениями длины 19-25 нуклеотидов и с по меньшей мере одной из смысловой или антисмысловой нитей, содержащей 3'-выступ между 1 и 5 нуклеотидами (см., например, патент США № 8372968, который включен в данный документ посредством ссылки). Были также разработаны более длинные олигонуклеотиды, которые процессируются эндонуклеазой *dicer* с получением активных продуктов для RNAi (см., например, патент США № 8883996, который включен в данный документ посредством ссылки). Кроме того, были получены удлиненные олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi), где один или оба из 5'- или 3'-концов одной или обеих из антисмысловой и смысловой нитей удлинены за пределы дуплексной нацеливающей области, за счет чего смысловая нить или антисмысловая нить содержит термодинамически-стабилизирующую структуру в виде четверной петли (см., например, патенты США №№ 8513207 и 8927705, а также WO2010033225, которые включены в данный документ посредством ссылки с целью раскрытия этих олигонуклеотидов). Такие структуры могут содержать однонитевые удлинения на одном или обоих из 5'- и 3'-концов молекулы, а также удлинения для RNAi.

Дополнительно или в качестве альтернативы олигонуклеотиды, предусмотренные в данном документе, могут быть сконструированы для вовлечения в путь РНК-интерференции после вовлечения эндонуклеазы *dicer*, что означает после расщепления эндонуклеазой *dicer*. Такие олигонуклеотиды могут содержать выступ, который содержит 1, 2 или 3 нуклеотида на 3'-конце смысловой нити. Такие олигонуклеотиды, такие как siRNA, могут содержать направляющую нить из 22 нуклеотидов, которая является антисмысловой по отношению к целевой РНК (например, SEQ ID NO: 13 и 14), и комплементарную сопровождающую нить, при этом обе нити отжигаются с образованием дуплекса из 20 п. о. и выступов в 2 нуклеотида на любом или обоих 3'-концах. Также доступны конструкции из более длинных олигонуклеотидов, в том числе олигонуклеотиды, содержащие направляющую нить из 23 нуклеотидов и сопровождающую нить из 21 нуклеотида, где находится тупой конец на 3'-конце сопровождающей нити и 5'-конце направляющей нити, и двухнуклеотидный 3'-выступ направляющей нити в левой части 5'-конца молекулы сопровождающей нити и 3'-конца направляющей нити. В таких молекулах находится дуплексная область из 21 пары оснований (см. патенты США №№ 9012138, 9012621 и 9193753, которые включены в данный документ посредством ссылки с целью их раскрытия касательно более длинных олигонуклеотидов).

Олигонуклеотиды, раскрытые в данном документе, могут содержать смысловую и антисмысловую нити, длина обеих из которых находится в диапазоне от 17 до 26 (например, от 17 до 26, от 20 до 25 или 21-23) нуклеотидов. Например, олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержать смысловую и антисмысловую нити, длина обеих из которых находится в диапазоне 19-22 нуклеотида. Смысловая и антисмысловая нити также могут иметь одинаковую длину. В качестве альтернативы олигонуклеотид может содержать смысловую и антисмысловую нити таким образом, что имеется 3'-выступ в смысловой нити или антисмысловой нити или в обеих из смысловой и антисмысловой нитей. Например, длина 3'-выступа в смысловой, антисмысловой или в обеих из смысловой и антисмысловой нитей может составлять 1 или 2 нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит антисмысловую нить из 22 нуклеотидов и смысловую нить из 20 нуклеотидов, где имеется тупой конец в "правой" части молекулы (т. е. на 3'-конце сопровождающей нити и 5'-конце направляющей нити) и двухнуклеотидный 3'-выступ на направляющей нити в "левой" части молекулы (т. е. на 5'-конце сопровождающей нити и 3'-конце направляющей нити). В таких молекулах может присутствовать, например, дуплексная область из 20 пар оснований.

Другие конструкции на основе олигонуклеотидов для применения с композициями и способами, раскрытыми в данном документе, включают, например, 16-мерные siRNA (см., например, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Blackburn (ed.), Royal Society of Chemistry, 2006), shRNA (например, содержащие стебли из 19 п. о. или короче; см., например, Moore et al. *Methods Mol. Biol.* 2010; 629:141-158), siRNA с тупыми концами (например, длиной 19 п. о.; см.: например, Kravack and Baker, *RNA* Vol. 12, p163-176 (2006)), асимметричные siRNA (aiRNA; см., например, Sun et al., *Nat. Biotechnol.* 26, 1379-

1382 (2008)), асимметричные siRNA с более коротким дуплексом (см., например, Chang et al., *Mol Ther.* 2009 Apr; 17(4): 725-32), вилочные siRNA (см., например, Hohjoh, *FEBS Letters*, Vol 557, issues 1-3; Jan 2004, p 193-198), однонитевые siRNA (Elsner; *Nature Biotechnology* 30, 1063 (2012)), гантелеобразные кольцевые siRNA (см., например, Abe et al. *J Am Chem Soc* 129: 15108-15109 (2007)) и малые внутренне сегментированные интерферирующие РНК (siRNA; см., например, Bramsen et al., *Nucleic Acids Res.* 2007 Sep; 35(17): 5886-5897). Каждый из вышеуказанных источников включен посредством ссылки во всей своей полноте для соответствующего раскрытия. Дополнительные неограничивающие примеры олигонуклеотидных структур, которые можно использовать в некоторых вариантах осуществления для снижения или подавления экспрессии СЗ, представляют собой микроРНК (miRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA) и короткую siRNA (см., Hamilton et al., *Embo J.*, 2002, 21(17): 4671-4679; см. также заявку на патент США № 2009/0099115).

#### Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi) для нацеливания на экспрессию СЗ посредством пути RNAi обычно содержат смысловую нить и антисмысловую нить, которые образуют дуплекс друг с другом. Олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi) могут представлять собой однонитевые или двухнитевые рибонуклеиновые кислоты (dsRNA). Кроме того, смысловая и антисмысловая нити могут быть ковалентно связаны; например, олигонуклеотид может содержать разрыв между смысловой и антисмысловой нитями. Олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi) могут находиться в форме фармацевтически приемлемой соли. Например, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) может находиться в форме натриевой соли.

Вышеуказанные олигонуклеотидные последовательности (например, олигонуклеотид для RNAi) представлены в виде последовательностей РНК, которые можно синтезировать внутри клетки; однако эти последовательности также могут быть представлены в виде соответствующей ДНК (например, cDNA), которую можно вводить в вектор по настоящему изобретению. Специалисту в данной области техники будет понятно, что последовательность cDNA эквивалентна последовательности mRNA, за исключением замены уридинов на тимидины, и может использоваться для той же цели в данном документе, т. е. для получения антисмыслового олигонуклеотида для подавления экспрессии mRNA СЗ. В случае ДНК полинуклеотид, содержащий антисмысловую нуклеиновую кислоту, представляет собой последовательность ДНК. Последовательность ДНК может соответствовать антисмысловой нити соединения А или соединения В и может содержать полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 34 или SEQ ID NO: 35 соответственно или может характеризоваться по меньшей мере 85% или большей идентичностью последовательности с ней. Последовательность ДНК может соответствовать смысловой нити соединения А или соединения В и может содержать полинуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 35 соответственно или может характеризоваться по меньшей мере 85% или большей

идентичностью последовательности с ней. В случае векторов на основе РНК трансгенная кассета содержит РНК-эквивалент антисмысловых последовательностей ДНК, описанных в данном документе.

В определенных вариантах осуществления смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Например, смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 4, как в случае соединения В. В других вариантах осуществления смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. Например, смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1, как в случае соединения А.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить может содержать последовательность олигонуклеотидов, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6. В других вариантах осуществления антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. Например, антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6, как в случае соединения В, и/или антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3, как в случае соединения А.

Кроме того, смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6. Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) может содержать смысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и антисмысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 6, как показано для соединения В на фиг. 2В.

Дополнительно, смысловая нить может содержать олигонуклеотидную

последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. Кроме того, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) может содержать смысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и антисмысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3, как показано для соединения А на фиг. 1D и 1E. Олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, может содержать смысловую нить, содержащую последовательность, представленную под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 4 и 5, и антисмысловую нить, содержащую комплементарную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 3 и 6.

Кроме того, смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 37, и антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 38, как показано ниже.

*Смысловая нить (SEQ ID NO: 37):*

5' mA-S-mU-mC-mA-mA-mC-mU-fC-fA-fC-fC-mU-mG-mU-mA-mA-mU-mA-mA-mA-mG-mC-mA-mG-mC-mC-mG-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-[ademA-GalNAc]-mG-mG-mC-mU-mG-mC 3',

гибридизированная с

*антисмысловой нитью (SEQ ID NO: 38):*

5' [MeФосфонат-4O-mU]-S-fU-S-fU-fA-fU-mU-fA-mC-mA-fG-mG-mU-mG-fA-mG-mU-mU-mG-mA-mU-S-mG-S-mG 3',

в которой mX представляет собой 2'-O-метилрибонуклеотид, fX представляет собой 2'-фтордезоксирибонуклеотид, [ademA-GalNAc] представляет собой 2'-O-GalNAc-модифицированный аденозин, [MeФосфонат-4O-mU] представляет собой 4'-O-монометилфосфонат-2'-O-метилуридин, "-" обозначает фосфодиэфирную связь, и "-S-" обозначает фосфоротиоатную связь, как показано на фиг. 1E. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить может представлять собой фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую соль) SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить может представлять собой фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую соль) SEQ ID NO: 37.

Кроме того, смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, и антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по







олигонуклеотид для RNAi) может содержать смысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 27, и антисмысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 28, как показано для соединения H. Смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 29, и антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 30. Например, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) может содержать смысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 29, и антисмысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 30, как показано для соединения I. Смысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 15, и антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 85% (например, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% и по меньшей мере 99%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 16. Например, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) может содержать смысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 15, и антисмысловую нить, которая содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 16, как показано для соединения J. См. таблицу 1 для примеров пар смысловой нити и антисмысловой нити.

**Таблица 1. Олигонуклеотиды для RNAi, нацеливающиеся на mRNA C3**

Конструкция	Смысловая нить	SEQ ID NO:	Антисмысловая нить	SEQ ID NO:	Нуклеотид целевой последовательности (mRNA C3)
1	AUCAACUCAC CUGUAAUAAA GCAGCCGAAA GGCUGC	1	UUUAUUACAGGUGA GUUGAUGG	3	4122-4141 из SEQ ID NO: 12
2	AUCAACUCAC	2			

	CUGUAAUAAA				
3	AGAAAUUCUA CUACAUCUAA GCAGCCGAAA GGCUGC	4	UUAGAUGUAGUAGA AUUUCUGG	6	780-798 из SEQ ID NO: 12
4	AGAAAUUCUA CUACAUCUAA	5	UUAGAUGUAGUAGA AUUUCUGG	6	
5	AGGAAUGAGA AUCAACAAAA AGCAGCCGAA AGGCUGC	15	UUUGUUGAUUCUC AUUCCUG	16	2903-2922 из SEQ ID NO: 32

Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) содержит дуплексную область между смысловой нитью и антисмысловой нитью. Длина дуплекса, образованного между смысловой и антисмысловой нитями, может составлять от 10 до 30 нуклеотидов (например, длина составляет 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 нуклеотидов). Соответственно, длина дуплекса, образованного между смысловой и антисмысловой нитями, может составлять от 15 до 25 нуклеотидов (например, длина составляет 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления длина дуплексной области может составлять 20 нуклеотидов.

Область в смысловой нити, которая образует дуплекс с антисмысловой нитью, может содержать нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% идентична (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) олигонуклеотидным последовательностям под любым из SEQ ID NO: 2 и 5. Например, область в смысловой нити, которая образует дуплекс с антисмысловой нитью, может содержать олигонуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 2 и 5.

Кроме того, дуплекс, образованный между смысловой и антисмысловой нитями, может не охватывать полную длину смысловой нити и/или антисмысловой нити.

Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) может содержать смысловую нить, которая не длиннее, чем 22 нуклеотида (например, длиной 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов), такую как смысловую нить из 36 нуклеотидов, и антисмысловую нить, длина которой составляет 18-36 нуклеотидов, такую как антисмысловая нить из 22 нуклеотидов. Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) имеет такую длину, чтобы при воздействии фермента *dicer* результатом было включение антисмысловой нити в зрелый RISC.

Олигонуклеотиды, предусмотренные в данном документе, могут иметь один 5'-конец, который термодинамически менее стабилен по сравнению с другим 5'-концом. Олигонуклеотиды, предусмотренные в данном документе, могут представлять собой

асимметричный олигонуклеотид, который содержит тупой конец на 3'-конце смысловой нити и выступ на 3'-конце антисмысловой нити. Длина 3'-выступа в антисмысловой нити может составлять 1-8 нуклеотидов (например, длина составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 нуклеотидов). Например, длина 3'-выступа в антисмысловой нити может составлять два нуклеотида. Как правило, олигонуклеотид для RNAi имеет двухнуклеотидный выступ на 3'-конце антисмысловой, направляющей, нити; однако возможны другие выступы. В других вариантах осуществления длина 3'-выступа может составлять от 1 до 6 нуклеотидов, необязательно от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4, от 2 до 3, от 3 до 6, от 3 до 5, от 3 до 4, от 4 до 6, от 4 до 5, от 5 до 6 нуклеотидов или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых случаях олигонуклеотиды могут иметь выступ на 5'-конце. Выступ может представлять собой 5'-выступ, включая выступ длиной от 1 до 6 нуклеотидов, необязательно от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4, от 2 до 3, от 3 до 6, от 3 до 5, от 3 до 4, от 4 до 6, от 4 до 5, от 5 до 6 нуклеотидов или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов.

Два концевых нуклеотида на 3'-конце антисмысловой нити могут быть модифицированы. В определенных вариантах осуществления. Два концевых нуклеотида на 3'-конце антисмысловой нити могут быть комплементарны целевой mRNA C3. В качестве альтернативы два концевых нуклеотида на 3'-конце антисмысловой нити могут быть не комплементарны целевой mRNA C3. В некоторых вариантах осуществления два концевых нуклеотида на 3'-конце антисмысловой нити могут представлять собой GG. Как правило, один или оба из двух концевых нуклеотидов GG на каждом 3'-конце олигонуклеотида не комплементарны мишени.

Может быть один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5) случаев неправильного спаривания при комплементарном спаривании между смысловой и антисмысловой нитями. Если имеется более одного случая неправильного спаривания между смысловой и антисмысловой нитями, они могут быть расположены последовательно (например, 2, 3 или более в ряду) или распределены по области комплементарности. Например, 3'-конец смысловой нити может содержать один или несколько случаев неправильного спаривания. Соответственно, два случая неправильного спаривания могут быть ведены в 3'-конец смысловой нити. Случаи неправильного спаривания оснований или дестабилизация сегментов на 3'-конце смысловой нити олигонуклеотида могут улучшать эффективность синтетических дуплексов при RNAi, вероятно посредством облегчения процессинга с помощью эндонуклеазы *dicer*.

Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления на последовательности, представленные в перечне последовательностей, можно ссылаться при описании структуры олигонуклеотида или другой нуклеиновой кислоты. В таких вариантах осуществления настоящий олигонуклеотид или другая нуклеиновая кислота могут содержать один или несколько альтернативных нуклеотидов (например, РНК-эквивалент нуклеотида ДНК или ДНК-эквивалент нуклеотида РНК), и/или один или несколько модифицированных нуклеотидов, и/или одну или несколько модифицированных

межнуклеотидных связей, и/или одну или несколько других модификаций по сравнению с указанной последовательностью с сохранением по существу тех же или сходных комплементарных свойств, что и указанная последовательность.

#### Антисмысловые нити

Антисмысловая нить олигонуклеотида может называться направляющей нитью. Например, если антисмысловая нить может взаимодействовать с РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) и связываться с белком Argonaute или взаимодействовать с одним или несколькими сходными факторами или связываться с ними, а также управлять сайленсингом целевого гена, она может называться направляющей нитью.

В определенных вариантах осуществления длина антисмысловой нити составляет меньше нуклеотидов, чем в смысловой нити. В некоторых примерах олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), предусмотренный в данном документе, может содержать антисмысловую нить, включая нить длиной от 10 до 40 нуклеотидов (например, 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 и 40 нуклеотидов). Соответственно, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), предусмотренный в данном документе, может содержать антисмысловую нить, включая нить длиной от 15 до 30 нуклеотидов (например, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 нуклеотидов). Например, длина антисмысловой нити может составлять от 20 до 25 нуклеотидов (например, 20, 21, 22, 23, 24 и 25 нуклеотидов). В определенных вариантах осуществления длина антисмысловой нити может составлять 22 нуклеотида.

Олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержать антисмысловую нить, содержащую непрерывную последовательность длиной от 12 до 22 нуклеотидов (например, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 и 22 нуклеотида), которая комплементарна последовательности под SEQ ID NO: 12. Например, олигонуклеотид может содержать антисмысловую нить, содержащую непрерывную последовательность длиной от 15 до 21 нуклеотида (например, 15, 16, 17, 18, 19, 20 и 21 нуклеотид), которая комплементарна последовательности под SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может содержать антисмысловую нить, содержащую непрерывную последовательность длиной 19 нуклеотидов, которая комплементарна последовательности под SEQ ID NO: 12.

Олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержать антисмысловую нить, содержащую последовательность под любым из SEQ ID NO: 3 или 6. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержать антисмысловую нить, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, как в соединении В, показанном на фиг. 2В. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить может представлять собой фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую соль) SEQ ID NO: 6. SEQ ID NO: 6 может характеризоваться химической структурой, показанной на фиг. 1В. В качестве альтернативы антисмысловая нить может содержать последовательность под SEQ ID NO:

3, как в соединении А, показанном на фиг. 1D и 1E. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить может представлять собой фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую соль) SEQ ID NO: 3

Дополнительно, первое положение на 5'-конце антисмысловой нити может представлять собой уридин. Уридин может предусматривать фосфатный аналог; например, уридин может представлять собой 4'-*O*-монометилфосфонат-2'-*O*-метилуридин.

#### Смысловые нити

Смысловая нить олигонуклеотида может называться сопровождающей нитью. В определенных вариантах осуществления длина сопровождающей нити составляет большее число нуклеотидов, чем в направляющей нити. В некоторых примерах олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), предусмотренный в данном документе, может содержать смысловую нить, включая нить длиной от 10 до 45 нуклеотидов (например, 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 и 45 нуклеотидов). Соответственно, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), предусмотренный в данном документе, может содержать смысловую нить, включая нить длиной от 20 до 50 нуклеотидов (например, 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 и 50 нуклеотидов). В определенных вариантах осуществления длина смысловой нити может составлять 20 нуклеотидов. В других вариантах осуществления длина смысловой нити может составлять 36 нуклеотидов.

Олигонуклеотид может содержать смысловую нить, которая содержит непрерывную последовательность длиной от 7 до 36 нуклеотидов (например, 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 и 36 нуклеотидов) относительно последовательности под SEQ ID NO: 12. Соответственно, смысловая нить может содержать непрерывную последовательность длиной от 10 до 30 нуклеотидов (например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 нуклеотидов) из SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, раскрытые в данном документе, могут содержать смысловую нить, которая содержит непрерывную последовательность нуклеотидов относительно последовательности под SEQ ID NO: 12, длина которой составляет 19 нуклеотидов.

Смысловая нить может содержать структуру стебель-петля на своем 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит структуру стебель-петля на своем 5'-конце. Длина смысловой нити, содержащей структуру стебель-петля, может находиться в диапазоне от 10 до 50 нуклеотидов (например, длина составляет 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 и 50 нуклеотидов). Соответственно, длина смысловой нити, содержащей структуру стебель-петля, может находиться в диапазоне от 20 до 40 нуклеотидов (например, длина составляет 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 и 40 нуклеотидов). Например, длина смысловой нити, содержащей структуру стебель-петля, может составлять 36 нуклеотидов.

Кроме того, область структуры стебель-петля в смысловой нити способна образовывать дуплексную область сама с собой. Длина дуплексной области, содержащейся в структуре стебель-петля, может составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 нуклеотидов. Например, длина дуплексной области, содержащейся в структуре стебель-петля, может составлять 6 нуклеотидов. Структура стебель-петля может обеспечивать олигонуклеотиду для RNAi защиту от деградации (например, ферментативной деградации) и может улучшать характеристики нацеливания для доставки в клетку-мишень. Например, петля может предоставлять добавленные нуклеотиды, в которых можно осуществить модификацию без существенного влияния на активность олигонуклеотида, заключающуюся в подавлении экспрессии гена. В определенных вариантах осуществления в данном документе предусмотрен олигонуклеотид, в котором смысловая нить содержит (например, на своем 3'-конце) структуру стебель-петля, представленную в следующем виде:  $S_1$ -L- $S_2$ , где  $S_1$  комплементарен  $S_2$ , и где L образует петлю между  $S_1$  и  $S_2$  длиной до 10 нуклеотидов (например, длиной 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов). Соответственно, длина петли между  $S_1$  и  $S_2$  может составлять 4 нуклеотида, образующих четверную петлю, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления длина области  $S_1$  составляет 6 нуклеотидов, длина областей  $S_2$  составляет 6 нуклеотидов, и область L представляет собой четверную петлю из 4 нуклеотидов.

Смысловая нить олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) может содержать область, представляющую собой структуру стебель-петля, и область, которая образует дуплекс с антисмысловой нитью. Область, представляющая собой структуру стебель-петля, может содержать нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% идентична (например, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше) олигонуклеотидной последовательности под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления область, представляющая собой структуру стебель-петля, содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Петля (L) структуры стебель-петля может представлять собой четверную петлю (например, в пределах структуры четверной петли с разрывом). Петля структуры стебель-петля может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 8. Четверная петля может содержать рибонуклеотиды, дезоксирибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и их комбинации. Как правило, петля структуры стебель-петля содержит от 4 до 5 нуклеотидов. Однако в некоторых вариантах осуществления петля структуры стебель-петля может содержать от 3 до 6 нуклеотидов. Например, петля структуры стебель-петля может содержать 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. Петля структуры стебель-петля может содержать комбинацию остатков гуанозина и аденозина нуклеиновой кислоты.

Олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержать последовательность смысловой нити, содержащую полинуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 4 и 5. Смысловая нить может содержать последовательность под SEQ ID NO: 4, как в соединении В, показанном на фиг. 2В. SEQ ID NO: 4 может характеризоваться химической структурой, показанной на фиг. 1А. В некоторых вариантах

осуществления смысловая нить может представлять собой фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую соль) SEQ ID NO: 4. В качестве альтернативы смысловая нить может содержать нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1, как в соединении А, показанном на фиг. 1D и 1E. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить может представлять собой фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую соль) SEQ ID NO: 1.

#### Модификации олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды могут быть модифицированы различными способами для улучшения или контроля специфичности, стабильности, доставки, биологической доступности, устойчивости к деградации нуклеазами, иммуногенности, свойств спаривания оснований, распределения РНК и клеточного поглощения и других признаков, соответствующих терапевтическому или исследовательскому применению, см., Bramsen et al., *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37, 2867-2881; Bramsen et al., *Frontiers in Genetics*, 3 (2012): 1-22). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут содержать одну или несколько подходящих модификаций. Модифицированный нуклеотид может содержать модификацию в своем основании или нуклеиновом основании, сахаре (например, рибозе, дезоксирибозе) или фосфатной группе.

Ряд модификаций в олигонуклеотиде и положения данных модификаций нуклеотидов могут влиять на свойства олигонуклеотида. Например, олигонуклеотиды можно доставлять *in vivo* путем их конъюгации с липидной наночастицей (LNP) или сходным носителем или их поглощения ими. Однако если олигонуклеотид не защищен LNP или сходным носителем, может быть предпочтительным, чтобы по меньшей мере некоторые из нуклеотидов были модифицированы. Соответственно, в определенных вариантах осуществления любого из олигонуклеотидов, предусмотренных в данном документе, все или практически все нуклеотиды олигонуклеотида являются модифицированными. В определенных вариантах осуществления более половины нуклеотидов являются модифицированными. В других вариантах осуществления менее половины нуклеотидов являются модифицированными. Как правило, при "голой" доставке каждый сахар модифицирован в 2'-положении. Такие модификации могут быть обратимыми или необратимыми. Олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержать определенное количество и тип модифицированных нуклеотидов, достаточные для обеспечения требуемой характеристики (например, защиты от ферментативной деградации, способности нацеливаться на требуемую клетку после введения *in vivo* и/или термодинамической стабильности).

#### Модификации сахаров

Модифицированный сахар, также называемый в данном документе сахарным аналогом, предусматривает модифицированный дезоксирибозный или рибозный фрагмент, в котором в 2'-, 3'-, 4'- и/или 5'-углеродном положении сахара имеет место одна или несколько модификаций. Модифицированный сахар также может предусматривать неприродные альтернативные углеродные структуры, такие как присутствующие в



"заблокированных" нуклеиновых кислотах ("LNA") (см. Koshkin et al. (1998), *Tetrahedron* 54, 3607-3630), "незаблокированных" нуклеиновых кислотах ("UNA") (см. Snead et al. (2013), *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2, e103) и мостиковых нуклеиновых кислотах ("BNA") (см. Imanishi and Obika (2002), *The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun.*, 1653-1659). Koshkin et al., Snead et al. и Imanishi and Obika включены в данный документ посредством ссылки с целью их раскрытия в отношении модификаций сахаров.

Модификация нуклеотида при сахаре может предусматривать 2'-модификацию. 2'-Модификация может представлять собой 2'-аминоэтил, 2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил и 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-β-d-арабинонуклеиновую кислоту. Как правило, модификация представляет собой 2'-фтор, 2'-О-метил или 2'-О-метоксиэтил. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой 2'-фтор и/или 2'-О-метил. В некоторых вариантах осуществления 2'-фтормодификация представляет собой 2'-фтордезоксидезоксирибонуклеозид, и/или 2'-О-метилмодификация представляет собой 2'-О-метилрибонуклеозид. Модификация в сахаре может предусматривать модификацию сахарного кольца, которое может характеризоваться модификацией одного или нескольких атомов углерода сахарного кольца. Например, модификация сахара нуклеотида может предусматривать 2'-кислород сахара, связанный с 1'-углеродом или 4'-углеродом сахара, или 2'-кислород, связанный с 1'-углеродом или 4'-углеродом посредством этиленового или метиленового мостика. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать ациклический сахар, в котором отсутствует связь 2'-углерода с 3'-углеродом. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать тиольную группу, например, в 4'-положении сахара.

Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), описанный в данном документе, может содержать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35, по меньшей мере 40, по меньшей мере 45, по меньшей мере 50, по меньшей мере 55, по меньшей мере 60 или больше). Например, смысловая нить олигонуклеотида может содержать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, по меньшей мере 30, по меньшей мере 35 или больше). Также, например, антисмысловая нить олигонуклеотида может содержать по меньшей мере один модифицированный нуклеотид (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 или больше).

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), описанный в данном документе, может содержать от 20 до 50 (например, от 20 до 30, от 24 до 30, от 28 до 30, от 30 до 40, от 34 до 40, от 38 до 44, от 44 до 50 и от 48 до 50) модифицированных нуклеотидов.

Все нуклеотиды смысловой нити олигонуклеотида могут быть модифицированными. Кроме того, все нуклеотиды антисмысловой нити олигонуклеотида

могут быть модифицированными. В некоторых вариантах осуществления все нуклеотиды олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi), включая обе из смысловой нити и антисмысловой нити, являются модифицированными. Модифицированный нуклеотид может предусматривать 2'-модификацию (например, 2'-фтор или 2'-О-метил). 2'-Модификация нуклеотида может представлять собой 2'-фтор и/или 2'-О-метил, где необязательно 2'-фтормодификация представляет собой 2'-фтордезоксирибонуклеозид, и/или 2'-О-метилмодификация представляет собой 2'-О-метилрибонуклеозид.

В настоящем изобретении предусмотрены олигонуклеотиды, характеризующиеся различными профилями модификаций. Олигонуклеотид, содержащий смысловую нить и антисмысловую нить, может содержать от 40 до 50 (например, 41, 2, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49) 2'-О-метилмодификаций. Модифицированные олигонуклеотиды могут содержать смысловую нить, содержащую нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 1 или 4, и антисмысловую нить, содержащую нуклеотидную последовательность под любым из SEQ ID NO: 3 или 6 (например, олигонуклеотид для RNAi может содержать смысловую нить под SEQ ID NO: 4 и антисмысловую нить под SEQ ID NO: 6, или олигонуклеотид для RNAi может содержать смысловую нить под SEQ ID NO: 1 и антисмысловую нить под SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления в случае таких олигонуклеотидов одно или несколько из положений 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 35 и 36 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 1, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 и 22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метилмодифицированного нуклеозида, такого как 2'-О-метилрибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления все из положений 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 35 и 36 смысловой нити и все из положений 1, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 и 22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метилмодифицированного нуклеозида, такого как 2'-О-метилрибонуклеозид. В других вариантах осуществления одно или несколько из положений 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 35 и 36 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 1, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 21 и 22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метилмодифицированного нуклеозида, такого как 2'-О-метилрибонуклеозид. В определенных вариантах осуществления все из положений 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 35 и 36 смысловой нити и/или все из положений 1, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 21 и 22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метилмодифицированного нуклеозида, такого как 2'-О-метилрибонуклеозид.

Олигонуклеотид, содержащий смысловую нить и антисмысловую нить, может содержать от 5 до 15 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14) 2'-О-фтормодификаций. В случае таких олигонуклеотидов одно или несколько из положений 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 17 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 16 и 19 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтормодифицированного

нуклеозида. Например, все из положений 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и/или все из положений 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтормодифицированного нуклеозида. В других вариантах осуществления одно или несколько из положений 3, 8, 10, 12, 13 и 17 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити могут быть модифицированы. В другом примере все из положений 3, 8, 9, 10, 12, 13 и 17 смысловой нити и/или все из положений 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтормодифицированного нуклеозида.

В случае олигонуклеотидов, содержащих смысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 1, и антисмысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 3, одно или несколько из положений 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метилмодифицированного нуклеозида. Кроме того, все из положений 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метилмодифицированного нуклеозида. В случае олигонуклеотидов со смысловой нитью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 1, и антисмысловой нитью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 3, одно или несколько из положений 8-11 смысловой нити и одно или несколько из положений 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтормодифицированного нуклеозида. Соответственно, все из положений 8-11 смысловой нити и все из положений 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтормодифицированного нуклеозида.

Например, в случае олигонуклеотидов со смысловой нитью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 1, и антисмысловой нитью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 3, все из положений 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метилмодифицированного нуклеозида, и все из положений 8-11 смысловой нити и все из положений 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтора, где химическая структура смысловой нити показана на фиг. 1А, антисмысловая нить показана на фиг. 1В, и олигонуклеотид для RNAi показан на фиг. 1С-1 и фиг. 1С-2.

В случае олигонуклеотидов, содержащих смысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 4, и антисмысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 6, одно или несколько из положений 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 35 и 36 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 1, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 21 и 22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метила. В некоторых вариантах осуществления все из положений 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

26, 27, 31, 32, 33, 34, 35 И 36 смысловой нити и все из положений 1, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 21 и 22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метила. Дополнительно, в случае олигонуклеотидов, содержащих смысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 4, и антисмысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 6, одно или несколько из положений 3, 8, 9, 10, 12, 13 и 17 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтора. В некоторых вариантах осуществления все из положений 3, 8, 9, 10, 12, 13 и 17 смысловой нити и все из положений 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтора. Например, в случае олигонуклеотидов, содержащих смысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 4, и антисмысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 6, все из положений 1, 2, 4, 5, 6, 7, 11, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 35 И 36 смысловой нити и все из положений 1, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 20, 21 и 22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метила, и все из положений 3, 8, 9, 10, 12, 13 и 17 смысловой нити и все из положений 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтора; химические структуры смысловой нити и антисмысловой нити показаны на фиг. 2А-1 и фиг. 2А-2.

В некоторых вариантах осуществления концевая группа на 3'-конце (например, 3'-гидроксил) может быть модифицирована с помощью фосфатной группы или другой группы, которая может использоваться, например, для присоединения линкеров, адаптеров или меток или для непосредственного лигирования олигонуклеотида с другой нуклеиновой кислотой.

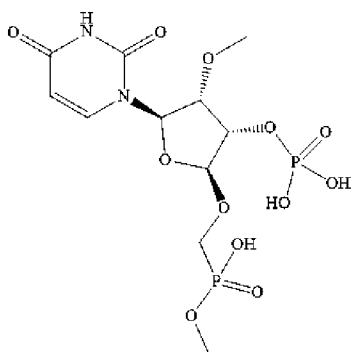
#### 5'-Концевые фосфаты

5'-Концевые фосфатные группы олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) могут обеспечивать усиление взаимодействия с Argonaute 2. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) содержит уридин в первом положении 5'-конца антисмысловой нити. Однако олигонуклеотиды, содержащие 5'-фосфатную группу, могут быть чувствительны к деградации фосфатазами или другими ферментами, которые могут ограничивать их биологическую доступность *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат аналоги 5'-фосфатов, которые устойчивы к такой деградации. Следовательно, уридин на 5'-конце антисмысловой нити может содержать фосфатный аналог. Фосфатный аналог может представлять собой оксиметилфосфонат, винилфосфонат или малонилфосфонат. Кроме того, 5'-конец нити олигонуклеотида может быть присоединен к химическому фрагменту, который имитирует электростатические и стерические свойства природной 5'-фосфатной группы ("фосфатный имитатор") (см. Prakash et al., *Nucleic Acids Res.* 2015 Mar 31; 43(6): 2993-3011, содержание каждой из которых, относящееся к фосфатным аналогам, включено в данный документ посредством ссылки). Было разработано множество фосфатных имитаторов, которые могут присоединяться к 5'-концу (см. патент США № 8927513,

содержание которого, относящееся к фосфатным аналогам, включено в данный документ посредством ссылки). Были разработаны другие модификации для 5'-конца олигонуклеотидов (см. WO 2011/133871, содержание которой, относящееся к фосфатным аналогам, включено в данный документ посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления гидроксильная группа может быть присоединена к 5'-концу олигонуклеотида.

Олигонуклеотид может содержать фосфатный аналог в 4'-углеродном положении сахара, называемый "4'-фосфатный аналог". См., например, WO 2018/045317, содержание которой, относящееся к фосфатным аналогам, включено в данный документ посредством ссылки. Олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, может содержать 4'-фосфатный аналог при 5'-концевом нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления фосфатный аналог представляет собой оксиметилфосфонат, в котором атом кислорода оксиметильной группы связан с сахарным фрагментом (например, при его 4'-углероде) или его аналогом. В других вариантах осуществления 4'-фосфатный аналог представляет собой тиометилфосфонат или аминометилфосфонат, в котором атом серы тиометильной группы или атом азота аминометильной группы связан с 4'-углеродом сахарного фрагмента или его аналога. В определенных вариантах осуществления 4'-фосфатный аналог представляет собой оксиметилфосфонат. В некоторых вариантах осуществления оксиметилфосфонат представлен формулой  $-O-CH_2-PO(OH)_2$  или  $-O-CH_2-PO(OR)_2$ , в которой R независимо выбран из H,  $CH_3$ , алкильной группы,  $CH_2CH_2CN$ ,  $CH_2OCOC(CH_3)_3$ ,  $CH_2OCH_2CH_2Si(CH_3)_3$  или защитной группы. В определенных вариантах осуществления алкильная группа представляет собой  $CH_2CH_3$ . Более типично R независимо выбран из H,  $CH_3$  или  $CH_2CH_3$ . В некоторых вариантах осуществления R представляет собой  $CH_3$ . В некоторых вариантах осуществления 4'-фосфатный аналог представляет собой 5'-метоксифосфонат-4'-окси. В некоторых вариантах осуществления 4'-фосфатный аналог представляет собой 4'-(метилметоксифосфонат). В некоторых вариантах осуществления фосфатный аналог представляет собой 4'-О-монометилфосфонатный аналог.

В некоторых вариантах осуществления фосфатный аналог, присоединенный к олигонуклеотиду, представляет собой метоксифосфонат (MOP). Фосфатный аналог, присоединенный к олигонуклеотиду, может представлять собой MOP, защищенный 5'-монометиллом. В некоторых вариантах осуществления может использоваться следующий уридиновый нуклеотид, содержащий фосфатный аналог, например, в первом положении антисмысловой нити:



при этом модифицированный нуклеотид называется [MeФосфонат-4O-mU] или 5'-метоксифосфонат-4'окси-2'-О-метилуридин. 5'-Метоксифосфонат-4'окси-2'-О-метилуридин может представлять собой первый нуклеотид на 5'-конце антисмысловой нити. Например, первый нуклеотид на 5'-конце под любым из SEQ ID NO: 3 или 6 может представлять собой 5'-метоксифосфонат-4'окси-2'-О-метилуридин.

#### Модифицированные межнуклеозидные связи

Фосфатные модификации или замены в олигонуклеотиде могут обеспечивать получение олигонуклеотида, который содержит по меньшей мере одну (например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6) модифицированную межнуклеотидную связь. Любой из олигонуклеотидов, раскрытых в данном документе, может содержать от 1 до 10 (например, от 1 до 10, от 2 до 8, от 4 до 6, от 3 до 10, от 5 до 10, от 1 до 5, от 1 до 3 или от 1 до 2) модифицированных межнуклеотидных связей. Например, любой из олигонуклеотидов, раскрытых в данном документе, может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модифицированных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) может содержать 5 модифицированных межнуклеотидных связей. Например, смысловая нить олигонуклеотида может содержать 1 модифицированную межнуклеотидную связь, и антисмысловая нить может содержать 4 модифицированные межнуклеотидные связи.

Модифицированная межнуклеотидная связь может представлять собой фосфородитионатную связь, фосфоротионатную связь, фосфотриэфирную связь, тиоалкилфосфонатную связь, тиоалкилфосфотриэфирную связь, фосфороамидитную связь, фосфонатную связь или борфосфатную связь. По меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь любого из олигонуклеотидов, раскрытых в данном документе, может представлять собой фосфоротионатную связь. В определенных вариантах осуществления все модифицированные межнуклеотидные связи олигонуклеотида могут представлять собой фосфоротионатные связи.

Олигонуклеотид, описанный в данном документе, может содержать фосфоротионатную связь между одним или несколькими из положений 1 и 2 смысловой нити, положений 1 и 2 антисмысловой нити, положений 2 и 3 антисмысловой нити, положений 20 и 21 антисмысловой нити и положений 21 и 22 антисмысловой нити. Например, смысловая нить олигонуклеотида может содержать фосфоротионатную связь между положениями 1 и 2 смысловой нити, положениями 1 и 2 антисмысловой нити, положениями 2 и 3 антисмысловой нити, положениями 20 и 21 антисмысловой нити и положениями 21 и 22 антисмысловой нити. Соответственно, смысловая нить, содержащая последовательность под SEQ ID NO: 1 или 4, может содержать фосфоротионатную связь между положениями 1 и 2, и антисмысловая нить, содержащая последовательность под SEQ ID NO: 3 или 6, может содержать фосфоротионатную связь между положениями 1 и 2, 2 и 3, 20 и 21 и 21 и 22.

#### Модификации оснований

Олигонуклеотиды, предусмотренные в данном документе, могут содержать одно или несколько модифицированных нуклеиновых оснований. Модифицированные нуклеиновые основания, также называемые в данном документе аналогами оснований, могут быть связаны при 1'-положении сахарного фрагмента нуклеотида. Модифицированное нуклеиновое основание может представлять собой азотистое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеиновое основание может содержать атом азота. См. опубликованную заявку на патент США № 2008/0274462, содержание которой, относящееся к модифицированным нуклеиновым основаниям, включено в данный документ посредством ссылки. Модифицированный нуклеотид также может содержать универсальное основание. Однако в определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может не содержать нуклеиновое основание (например, с удаленным основанием).

В некоторых вариантах осуществления универсальное основание представляет собой гетероциклический фрагмент, расположенный при 1'-положении сахарного фрагмента нуклеотида в модифицированном нуклеотиде или эквивалентном положении замещающего сахарного фрагмента нуклеотида, который, при наличии в дуплексе, может быть расположен напротив более чем одного типа основания без существенного изменения структуры дуплекса. В некоторых вариантах осуществления при сравнении с эталонной одонитевой нуклеиновой кислотой (например, олигонуклеотидом или полинуклеотидом), которая полностью комплементарна целевой нуклеиновой кислоте, одонитевая нуклеиновая кислота, содержащая универсальное основание, образует дуплекс с целевой нуклеиновой кислотой, которая характеризуется более низкой  $T_m$ , чем дуплекс, образованный с комплементарной нуклеиновой кислотой. Однако в некоторых вариантах осуществления при сравнении с эталонной одонитевой нуклеиновой кислотой, в которой универсальное основание было заменено на основание с получением одного ошибочного спаривания, одонитевая нуклеиновая кислота, содержащая универсальное основание, образует дуплекс с целевой нуклеиновой кислотой, которая характеризуется более высокой  $T_m$ , чем дуплекс, образованный с нуклеиновой кислотой, содержащей ошибочно спаренное основание. Неограничивающие примеры универсальных связывающихся нуклеотидов включают инозин, 1- $\beta$ -D-рибофуранозил-5-нитроиндол и/или 1- $\beta$ -D-рибофуранозил-3-нитропиррол (см. US 2007/0254362; Van Aerschot et al., *Nucleic Acids Res.* 1995 Nov 11;23(21):4363-70; Loakes et al., *Nucleic Acids Res.* 1995 Jul 11;23(13):2361-6; Loakes et al., *Nucleic Acids Res.* 1994 Oct 11;22(20):4039-43. Каждый из вышеуказанного включен посредством ссылки в данный документ с целью раскрытия, относящегося к модификациям оснований).

#### Обратимые модификации

В то время как некоторые модификации можно осуществлять для защиты олигонуклеотида от среды *in vivo* перед достижением клеток-мишеней, они могут снижать эффективность или активность олигонуклеотида, когда он достигает цитозоля клетки-мишени. Обратимые модификации можно осуществлять таким образом, чтобы молекула

сохраняла требуемые свойства вне клетки, которые затем удаляются после попадания в цитозольную среду клетки. Обратимую модификацию можно удалять, например, путем действия внутриклеточного фермента или с помощью химических условий вне клетки (например, посредством восстановления внутриклеточным глутатионом).

Обратимо модифицированный нуклеотид может содержать фрагмент, чувствительный к глутатиону. Как правило, молекулы нуклеиновой кислоты можно химически модифицировать с помощью циклических дисульфидных фрагментов для маскировки отрицательного заряда, создаваемого межнуклеотидными дифосфатными связями, и улучшения клеточного поглощения и устойчивости к нуклеазам. См. US 2011/0294869, первоначально относящийся к Traversa Therapeutics, Inc. ("Traversa"), публикацию согласно PCT № WO 2015/188197 к Solstice Biologics, Ltd. ("Solstice"), Meade et al., Nature Biotechnology, 2014,32:1256-1263 ("Meade"), публикацию согласно PCT № WO 2014/088920 к Merck Sharp & Dohme Corp, каждая из которых включена посредством ссылки с целью раскрытия таких модификаций. Обратимую модификацию межнуклеотидных дифосфатных связей конструируют с целью расщепления внутриклеточно путем восстановления среды цитозоля (например, глутатиона). Более ранние примеры включают нейтрализующие фосфотриэфирные модификации, которые, как сообщалось, расщепляются внутри клеток (см., Dellinger et al. J. Am. Chem. Soc. 2003,125:940-950).

Такая обратимая модификация обеспечивает защиту во время введения *in vivo* (например, переноса посредством крови и/или лизосомального/эндосомального компартментов клетки), где олигонуклеотид будет подвергнут воздействию нуклеаз и других жестких условий среды (например, pH). При высвобождении в цитозоле клетки, где уровни глутатиона выше по сравнению с внеклеточным пространством, модификация устраняется, и результатом является отщепленный олигонуклеотид. С применением обратимых глутатион-чувствительных фрагментов можно вводить стерически более крупные химические группы в олигонуклеотид, представляющий интерес, по сравнению с вариантами, доступными с применением необратимых химических модификаций. Это возможно, поскольку такие более крупные химические группы будут удалены в цитозоле, следовательно, не будут препятствовать биологической активности олигонуклеотидов внутри цитозоля клетки. В результате такие более крупные химические группы можно конструировать для придания различных преимуществ нуклеотиду или олигонуклеотиду, таких как устойчивость к нуклеазам, липофильность, заряд, термическая стабильность, специфичность и пониженная иммуногенность. Структуру глутатион-чувствительного фрагмента можно конструировать для модификации кинетики его высвобождения.

В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный фрагмент присоединен к сахару нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный фрагмент присоединен к 2'-углероду сахара модифицированного нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный фрагмент расположен при 5'-углероде сахара, например, если модифицированный нуклеотид



представляет собой 5'-концевой нуклеотид олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный фрагмент расположен при 3'-углероде сахара, например, если модифицированный нуклеотид представляет собой 3'-концевой нуклеотид олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный фрагмент предусматривает сульфонильную группу. См., например, заявку на публикацию патента США номер 2019/0177355, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки с целью соответствующего раскрытия.

#### Нацеливающие лиганды

Может быть желательным нацеливание олигонуклеотидов по настоящему изобретению на одну или несколько клеток или один или несколько органов (например, клетки печени). Такая стратегия может помочь избежать нежелательных эффектов в других органах или может обеспечить избегание чрезмерной потери олигонуклеотида в клетках, ткани или органах, которые не получают пользу от олигонуклеотида. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды, раскрытые в данном документе, могут быть модифицированы для облегчения нацеливания на конкретную ткань, клетку или орган, например, для облегчения доставки олигонуклеотида в печень. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды, раскрытые в данном документе, могут быть модифицированы для облегчения доставки олигонуклеотида в гепатоциты печени. Олигонуклеотид может содержать нуклеотид, который конъюгирован с одним или несколькими нацеливающими лигандами.

Нацеливающий лиганд может предусматривать углеводов, аминсахар, холестерин, пептид, полипептид, белок или часть белка (например, антитело или фрагмент антитела) или липид. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой аптамер. Например, нацеливающий лиганд может представлять собой пептид RGD, который используют для нацеливания на сосудистую сеть опухоли или клетки глиомы, пептид CREKA для нацеливания на сосудистую сеть опухоли или стому, перенос, лактоферрин или аптамер для нацеливания на рецепторы трансферрина, экспрессирующиеся в сосудистой сети ЦНС, или антитело к EGFR для нацеливания на EGFR на клетках глиомы. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд представляет собой один или несколько фрагментов из N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

Каждый из одного или нескольких (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) нуклеотидов олигонуклеотида может быть конъюгирован с отдельным нацеливающим лигандом. В некоторых случаях каждый из 2-4 нуклеотидов олигонуклеотида конъюгирован с отдельным нацеливающим лигандом. Нацеливающие лиганды могут быть конъюгированы с 2-4 нуклеотидами на любом из концов смысловой или антисмысловой нити (например, лиганд конъюгирован с выступом из 2-4 нуклеотидов или удлинением на 5'- или 3'-конце смысловой или антисмысловой нити) таким образом, что нацеливающие лиганды напоминают щетинки зубной щетки, и олигонуклеотид напоминает зубную щетку. Например, олигонуклеотид может содержать структуру стебель-петля на любом из 5'- или 3'-конца смысловой нити, и 1, 2, 3 или 4 нуклеотида петли стебля могут быть по

отдельности конъюгированы с нацеливающим лигандом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит структуру стебель-петля на 3'-конце смысловой нити, и 3 нуклеотида петли стебля по отдельности конъюгированы с нацеливающим лигандом.

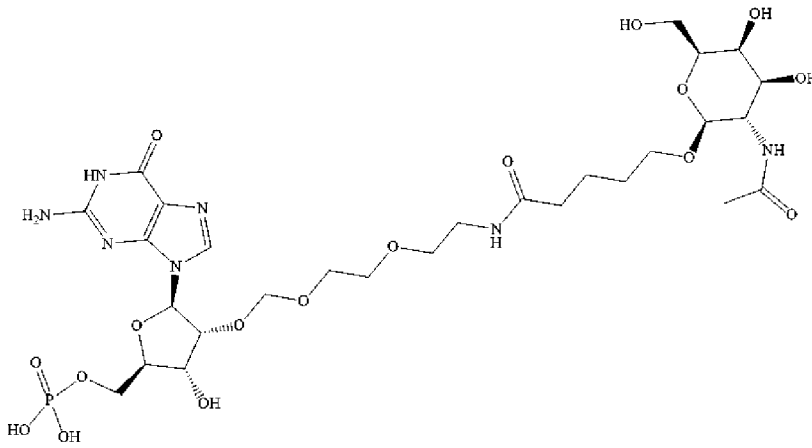
В некоторых вариантах осуществления необходимо нацеливать олигонуклеотид, который обеспечивает снижение экспрессии СЗ, на гепатоциты печени субъекта. Для данной цели можно использовать любой подходящий фрагмент, нацеливающийся на гепатоциты.

GalNAc представляет собой лиганд с высокой аффинностью к асиалогликопротеиновым рецепторам (ASGPR), которые экспрессируются преимущественно на синусоидальной поверхности клеток-гепатоцитов, и играет основную роль в связывании, интернализации и последующем клиренсе циркулирующих гликопротеинов, которые содержат концевые остатки галактозы или N-ацетилгалактозамина (асиалогликопротеины). Опосредованную или непосредственную конъюгацию фрагментов GalNAc с олигонуклеотидами по настоящему изобретению можно использовать для нацеливания этих олигонуклеотидов на ASGPR, экспрессирующийся на этих клетках-гепатоцитах.

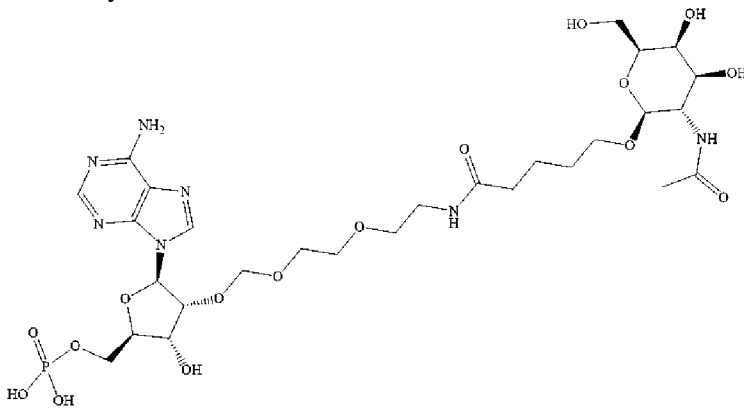
Например, олигонуклеотид по настоящему изобретению может быть непосредственно или опосредованно конъюгирован с моновалентным GalNAc. Олигонуклеотид может быть непосредственно или опосредованно конъюгирован с более чем одним (например, 2, 3, 4 или более) моновалентным GalNAc и, как правило, конъюгирован с 3 или 4 моновалентными фрагментами GalNAc. Фрагмент(фрагменты) GalNAc может присутствовать в пределах области петли олигонуклеотидов, описанных в данном документе. Фрагмент GalNAc можно использовать для нацеливания олигонуклеотидов по настоящему изобретению на ASGPR на гепатоцитах; после чего конъюгированный с GalNAc олигонуклеотид может быть интернализован и интегрирован во внутриклеточный механизм RNAi, называемый РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC). Белок Argonaute-2 (Argo-2) RISC в данном комплексе нацеливается на антисмысловую нить дуплекса олигонуклеотида и комплементарной mRNA СЗ и инициирует ее деградацию, блокируя таким образом трансляцию мишени.


В некоторых вариантах осуществления каждый из 2-4 нуклеотидов петли (L) из структуры стебель-петля конъюгирован с отдельным фрагментом GalNAc. В некоторых вариантах осуществления три нуклеотида петли стебля олигонуклеотида могут быть непосредственно или опосредованно конъюгированы с тремя отдельными моновалентными фрагментами GalNAc. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид конъюгирован с одним или несколькими бивалентными GalNAc, тривалентными GalNAc или тетравалентными фрагментами GalNAc.

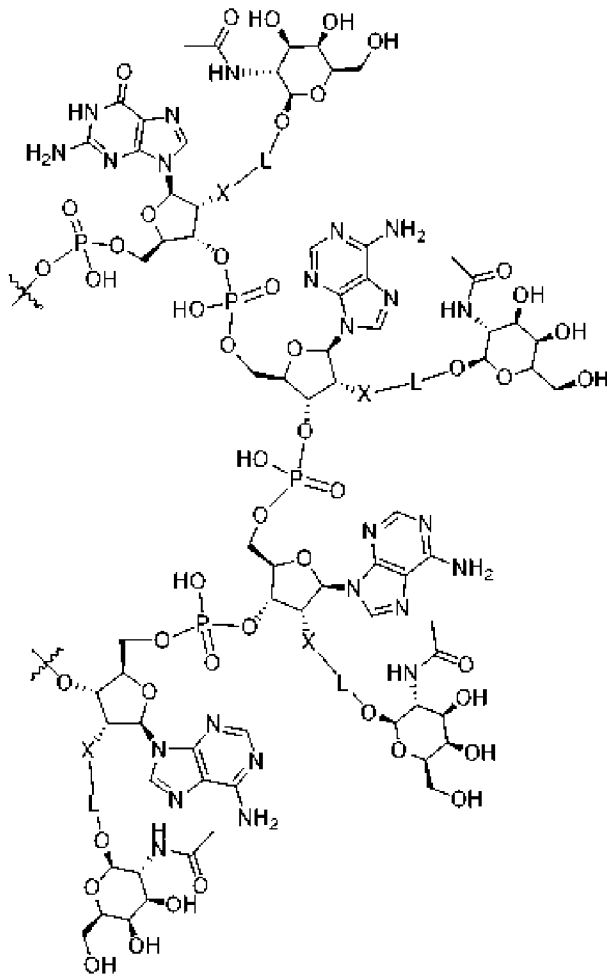
Олигонуклеотид, описанный в данном документе, может содержать моновалентный GalNAc, присоединенный к гуаниновому нуклеиновому основанию, называемому [ademG-GalNAc] или 2'-аминодиэтоксиметанолгуанин-GalNAc, изображенному ниже:



Дополнительно или в качестве альтернативы олигонуклеотид в данном документе может содержать моновалентный GalNAc, присоединенный к адениновому нуклеиновому основанию, называемому [ademA-GalNAc] или 2'-аминодиэтоксиметаноладенин-GalNAc, изображенному ниже.



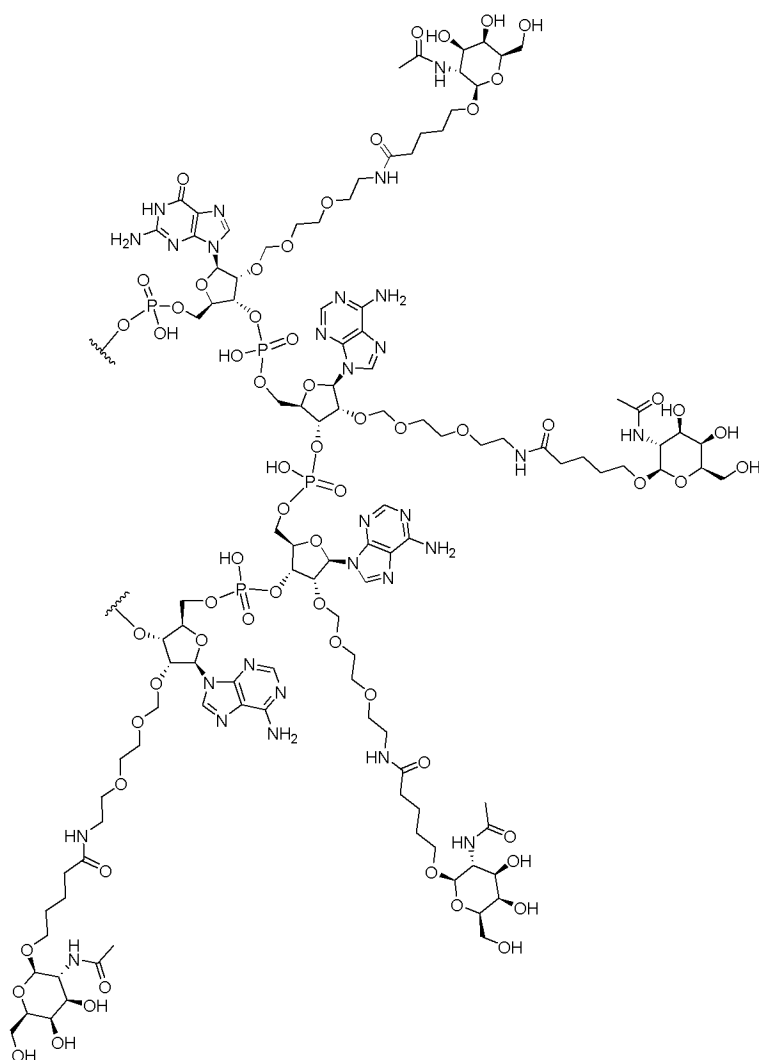
Пример такой конъюгации показан ниже для петли, содержащей в направлении от 5'-конца к 3'-концу нуклеотидную последовательность GAAA (SEQ ID NO: 8) (L=линкер, X=гетероатом), показаны точки присоединения к стеблю. Такая петля может присутствовать, например, в нуклеотидных положениях 27-30 молекулы, показанной на фиг. 1А. В химической формуле  представляет собой точку присоединения к нити олигонуклеотида.



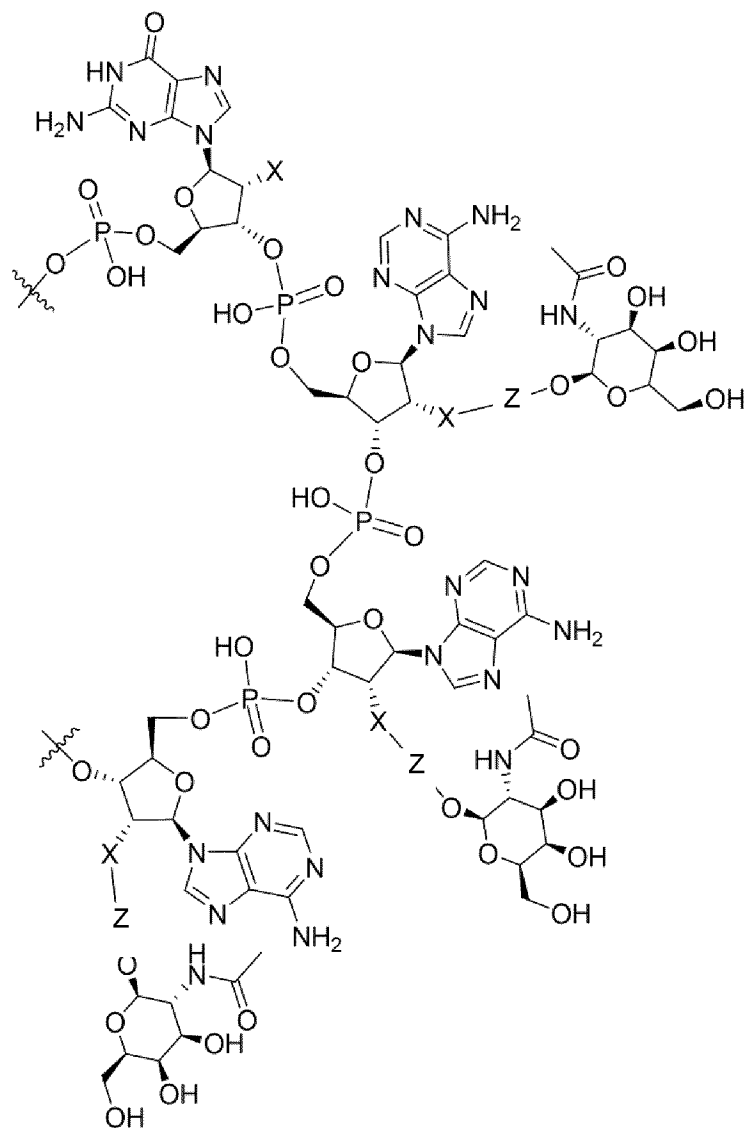
Подходящие способы или химические методы (например, клик-химию) можно использовать для связывания нацеливающего лиганда с нуклеотидом. Нацеливающий лиганд может быть конъюгирован с нуклеотидом с применением клик-линкера. Кроме того, можно использовать линкер на основе ацетала для конъюгации нацеливающего лиганда с нуклеотидом любого из олигонуклеотидов, описанных в данном документе. Линкеры на основе ацетала раскрыты, например, в Международной публикации заявки на патент номер WO 2016/100401 A1, которая опубликована 23 июня 2016 года, и содержание которой, касающееся таких линкеров, включено в данный документ посредством ссылки. Линкер может представлять собой лабильный линкер. Однако в других вариантах осуществления линкер является стабильным (нелабильным).

Пример показан ниже для четверной петли, содержащей в направлении от 5'-конца к 3'-концу нуклеотиды GAAA (SEQ ID NO: 8), в которой четыре (4) фрагмента GalNAc присоединены к нуклеотидам петли с применением ацетального линкера. Такая петля может присутствовать в олигонуклеотиде, раскрытом в данном документе (см., например, положения 27-30 олигонуклеотидов, содержащих последовательности под SEQ ID NO: 1 и

4). В химической формуле  представляет собой точку присоединения к нити олигонуклеотида.



В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид в данном документе (например, олигонуклеотид для RNAi) содержит смысловую нить, содержащую четверную петлю, где три (3) фрагмента GalNAc конъюгированы с нуклеотидами, образующими четверную петлю, и где каждый фрагмент GalNAc конъюгирован с одним (1) нуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид в данном документе (например, олигонуклеотид для RNAi) содержит смысловую нить, содержащую четверную петлю, содержащую GalNAc-конъюгированные нуклеотиды, где четверная петля характеризуется следующей структурой:

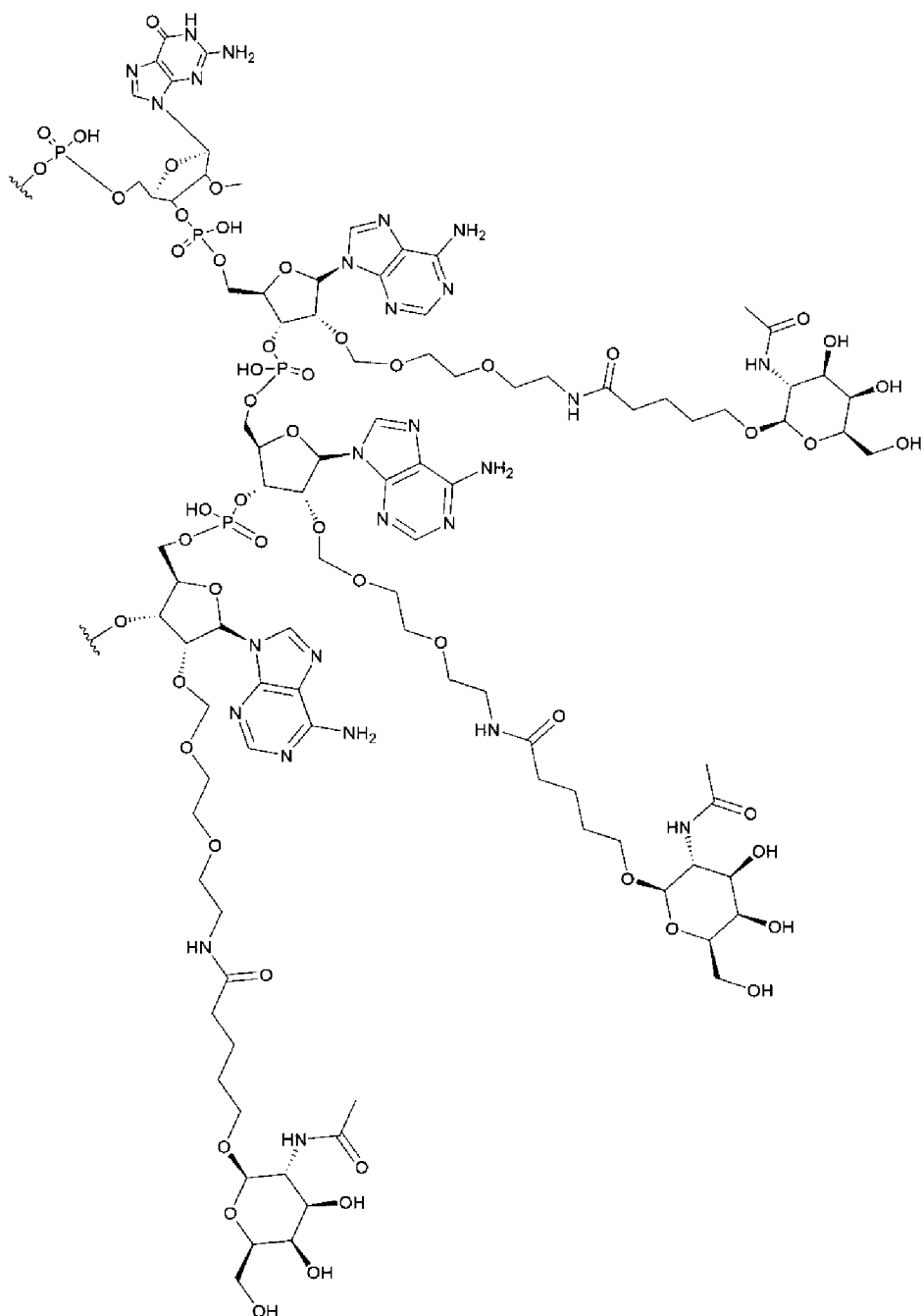


в которой:

Z представляет собой связь, группу для обеспечения возможности реакции клик-химии или линкер длиной от 1 до 20 включительно последовательных ковалентно связанных атомов, выбранный из группы, состоящей из замещенного и незамещенного алкилена, замещенного и незамещенного алкенилена, замещенного и незамещенного алкинилена, замещенного и незамещенного гетероалкилена, замещенного и незамещенного гетероалкенилена, замещенного и незамещенного гетероалкинилена и их комбинаций, и

X представляет собой O, S или N.

В другом варианте осуществления олигонуклеотид в данном документе (например, олигонуклеотид для RNAi) содержит смысловую нить, содержащую четверную петлю, содержащую три (3) фрагмента GalNAc, конъюгированные с нуклеотидами, где четверная петля характеризуется следующей структурой:



В некоторых вариантах осуществления предусмотрено удлинение дуплекса (например, длиной до 3, 4, 5 или 6 пар оснований) между нацеливающим лигандом (например, фрагментом GalNAc) и олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi). В некоторых вариантах осуществления длина удлинения дуплекса между нацеливающим лигандом (например, фрагментом GalNAc) и олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi) составляет 6 пар оснований.

#### Составы

Были разработаны различные составы для облегчения применения олигонуклеотидов. Например, олигонуклеотиды могут быть доставлены субъекту или в клеточную среду с применением состава, который сводит к минимуму деградацию, облегчает доставку и/или поглощение или обеспечивает другое благоприятное свойство олигонуклеотидам в составе. В некоторых вариантах осуществления в данном документе

предусмотрены композиции, содержащие олигонуклеотиды (например, одонитевые или двухнитевые олигонуклеотиды) для снижения экспрессии СЗ. Такие композиции можно соответствующим образом составлять таким образом, чтобы при введении субъекту или непосредственно в среду клетки-мишени или системно достаточная часть олигонуклеотидов попадала в клетку для снижения экспрессии СЗ. Любое разнообразие подходящих составов на основе олигонуклеотида можно использовать для доставки олигонуклеотидов с целью снижения уровня СЗ, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, фармацевтическая композиция, вектор или клетка составлены в буферных растворах, таких как фосфатно-буферные солевые растворы, липосомы, мицеллярные структуры, векторы и капсиды.

Составы, раскрытые в данном документе, могут содержать вспомогательное вещество. Вспомогательное вещество может придавать композиции улучшенную стабильность, улучшенное всасывание, улучшенную растворимость и/или терапевтическое усиление активного ингредиента. Вспомогательное вещество может представлять собой буферное средство (например, цитрат натрия, фосфат натрия, трис-основание или гидроксид натрия) или среду-носитель (например, буферизованный раствор, вазелин, диметилсульфоксид или минеральное масло). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть лиофилизирован для увеличения срока хранения и затем получен в растворе перед применением (например, перед введением субъекту). Соответственно, вспомогательное вещество в композиции, содержащей любой из олигонуклеотидов, описанных в данном документе, может представлять собой лиопротектор (например, маннит, лактозу, полиэтиленгликоль или поливинилпирролидон) или модификатор температуры разрушения (например, декстран, фикоилл или желатин).

Фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид, может быть составлена таким образом, что она совместима с предполагаемым путем ее введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например, подкожное, внутривенное, интрадермальное, пероральное (например, ингаляцию), трансдермальное (местное), трансмукозальное и ректальное введение (например, подкожное введение).

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (в случае водорастворимых) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Stenophor EL (BASF, Парсипани, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS). Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п.) и их подходящие смеси. Во многих случаях будет необязательным включение изотонических средств, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит и сорбит, и хлорида натрия в композицию. Стерильные растворы для инъекций можно получать путем включения олигонуклеотидов в необходимом количестве в



выбранный растворитель с одним или комбинацией перечисленных выше ингредиентов, при необходимости с последующей стерилизацией посредством фильтрации.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид, содержит стерильную воду (или воду для инъекций (WFI)). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид, содержит PBS.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид, содержит стерильный раствор в WFI без консерванта. В некоторых вариантах осуществления pH фармацевтической композиции составляет приблизительно 7,2 (например, pH 7,2). В некоторых вариантах осуществления 0,1 н. NaOH или 0,1 н. HCl можно титровать при необходимости для доведения pH раствора до целевого значения, составляющего 7,2. В некоторых вариантах осуществления концентрация формы свободной кислоты олигонуклеотида для RNAi в фармацевтической композиции составляет приблизительно 160 мг/мл (например, 160 мг/мл). WFI может использоваться в некоторых вариантах осуществления для доведения общей концентрации до приблизительно 160 мг/мл в виде формы свободной кислоты. В некоторых вариантах осуществления целевой объем заполнения составляет приблизительно 1,3 мл в стеклянном флаконе объемом 2 мл. В некоторых вариантах осуществления предполагается, что раствор будет предоставляться пациентам подкожно в качестве пути его введения.

В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% терапевтического средства (например, олигонуклеотида для снижения экспрессии C3) или больше, хотя процент активного ингредиента(ингредиентов) может составлять от приблизительно 1% до приблизительно 80% или больше от веса или объема общей композиции. Такие факторы как растворимость, биологическая доступность, биологический период полужизни, путь введения, срок хранения продукта, а также другие фармакологические параметры будут приниматься во внимание специалистом в области получения таких фармацевтических составов, и разнообразие доз и схем лечения как таковое может быть желательным.

Несмотря на то, что ряд вариантов осуществления направлен на доставку любого из олигонуклеотидов, раскрытых в данном документе, нацеленную на печень, также рассматривается нацеливание на другие ткани.

#### Фармацевтическое применение

В данном документе раскрыты способы доставки в клетку или субъекту эффективного количества любого из олигонуклеотидов (например, олигонуклеотидов для RNAi), раскрытых в данном документе, в целях снижения экспрессии C3 в клетке или у субъекта.

Олигонуклеотиды, раскрытые в данном документе, можно вводить в клетку субъекта с заболеванием или нарушением, опосредованным активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции C3), с применением любого подходящего способа доставки нуклеиновой кислоты.

Например, олигонуклеотиды могут быть доставлены в клетку путем инъекции раствора, содержащего олигонуклеотиды, бомбардировки частицами, покрытыми олигонуклеотидами, подвергания клетки или организма воздействию раствора, содержащего олигонуклеотиды, или электропорации клеточных мембран в присутствии олигонуклеотидов.

Составы на основе олигонуклеотидов с катионными липидами можно использовать для облегчения трансфекции клеток олигонуклеотидами. Например, можно использовать катионные липиды, такие как липофектин, катионные производные глицерина и поликатионные молекулы (например, полилизин). Подходящие липиды включают олигофектамин, липофектамин (Life Technologies), NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Боулдер, Колорадо) или FuGene 6 (Roche), все из которых можно использовать в соответствии с инструкциями производителя.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления состав содержит липидную наночастицу. В некоторых вариантах осуществления вспомогательное вещество предусматривает липосому, липид, липидный комплекс, микросферу, микрочастицу, наносферу или наночастицу или может быть иным образом составлено для введения в клетки, ткани, органы или организм субъекта, нуждающегося в этом (см., например, Remington: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 22nd edition, Pharmaceutical Press, 2013).

Эффективные внутриклеточные концентрации олигонуклеотида, раскрытого в данном документе, также могут быть достигнуты посредством устойчивой экспрессии полинуклеотида, кодирующего олигонуклеотид (например, путем интеграции в ядерный или митохондриальный геном клетки млекопитающего), или путем временной экспрессии в клетке, приведенной в контакт с полинуклеотидом (например, плазмидой или другим вектором (например, вирусным вектором), кодирующим олигонуклеотид). Примеры векторов экспрессии раскрыты, например, в WO 1994/011026 и включены в данный документ посредством ссылки. Векторы экспрессии для применения в композициях и способах, описанных в данном документе, содержат олигонуклеотидную последовательность, которая обеспечивает снижение экспрессии СЗ, а также, например, дополнительные элементы последовательности, используемые для экспрессии этих средств и/или интеграции этих полинуклеотидных последовательностей в геном клетки млекопитающего. Вектор экспрессии может представлять собой вирусный вектор, ретровирусный вектор, аденовирусный вектор или вектор на основе аденоассоциированного вируса.

Также можно использовать другие способы доставки олигонуклеотидов в клетки, такие как липид-опосредуемый транспорт носителя, транспорт, опосредуемый химическими веществами, трансфекция с помощью катионных липосом, таких как фосфат кальция, и векторов, содержащих олигонуклеотиды. Векторы, используемые для доставки олигонуклеотидов, описанных в данном документе, могут представлять собой вирусные векторы, такие как ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор),

аденовирусный вектор (например, Ad5, Ad26, Ad34, Ad35 и Ad48) и вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 и AAV10).

В некоторых примерах олигонуклеотид, описанный в данном документе, может быть доставлен в форме трансгена, который сконструирован для экспрессии в клетке олигонуклеотидов (например, их смысловых и антисмысловых нитей). Трансгены могут быть доставлены с применением вектора, например, вирусного вектора (например, аденовируса, ретровируса, вируса осповакцины, поксвируса, аденоассоциированного вируса или вируса простого герпеса), описанного выше, или невирусного вектора (например, плазмид или синтетических mRNA). В некоторых вариантах осуществления трансгены можно вводить путем инъекции непосредственно субъекту, например, в место действия или рядом с ним (например, в печень или рядом с ней), или в кровотоки.

### Подавление C3

После введения олигонуклеотиды по настоящему изобретению способны к связыванию с mRNA C3 и подавлению ее экспрессии. Подавление экспрессии гена C3 может проявляться путем снижения количества mRNA, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, выделенном (например, полученном) из организма субъекта), в которых ген C3 транскрибируется и которые были обработаны (например, путем приведения клетки или клеток в контакт с олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi) по настоящему изобретению или путем введения олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) по настоящему изобретению субъекту, у которого присутствуют или присутствовали клетки) таким образом, что экспрессия гена C3 подавляется по сравнению со второй клеткой или группой клеток, по сути идентичных первой клетке или группе клеток, но которые не были обработаны таким образом (контрольная клетка(клетки), не обработанная олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi) или не обработанная олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi), нацеливающимся на ген, представляющий интерес). Уровень целевой mRNA можно измерять с применением методик, широко известных специалисту в данной области техники, таких как RT-qPCR. Степень подавления может быть выражена следующим образом:

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

Изменение уровней экспрессии гена C3 можно оценить по снижению параметра, который функционально связан с экспрессией гена C3, например, экспрессии белка C3, активности белка C3 или путей передачи сигнала C3. Сайленсинг гена C3 можно определять в любой клетке, экспрессирующей C3, эндогенной или гетерологичной по отношению к конструкции для экспрессии, и посредством любого анализа, известного из уровня техники.

Последствия подавления mRNA C3 можно подтвердить посредством подходящего анализа для оценки одного или нескольких свойств клетки или субъекта или путем

биохимических методик, которые позволяют оценивать молекулы, указывающие на экспрессию C3 (например, РНК, белка). Степень, с которой олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, обеспечивает снижение уровней экспрессии C3, оценивают путем сравнения уровней экспрессии с подходящим контролем (например, уровнем экспрессии mRNA C3 в клетке или популяции клеток, которым олигонуклеотид не был доставлен или которым был доставлен отрицательный контроль). Подходящий контрольный уровень экспрессии mRNA C3 может представлять собой предварительно определенный уровень или значение, за счет чего контрольный уровень не нужно измерять каждый раз. Предварительно определенный уровень или значение может иметь ряд форм, включая единичное пороговое значение, такое как медианное или среднее значение. Например, предварительно определенный уровень или значение может находиться или составлять приблизительно уровень 75-175 мг/дл белка C3, что соответствует уровню белка C3, который, как правило, обнаруживается в сыворотке крови здорового субъекта.

Уровень экспрессии mRNA C3 в образце можно определять, например, путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, mRNA. РНК можно экстрагировать из клеток с применением методик выделения РНК, в том числе, например, с применением кислотной экстракции с применением фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol™ B; Biogenesis), наборов для получения РНК RNeasy™ (Qiagen) или PAXGENE™ (PreAnalytix, Швейцария). mRNA C3 в образце также можно определять с применением ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR). Например, РНК можно экстрагировать путем гомогенизации образцов ткани в лизирующем реагенте QIAzol с применением TissueLyser II (Qiagen) и очистки с применением технологии MAGMAX® (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Затем можно использовать наборы для обратной транскрипции cDNA с высокой производительностью (ThermoFisher Scientific) для получения cDNA. Использовали специфические праймеры и зонды для контроля C3 и белков "домашнего хозяйства" для ПЦР с применением системы выявления CFX384 (Bio-Rad Laboratories) посредством ПЦР в режиме реального времени и использовали программное обеспечение BioRad CFX Maestro для оценки значений Ct; уровень экспрессии рассчитывали в EXCEL® и наносили на график в Prism (GraphPad). Праймеры, использованные для RT-PCR, описаны в таблице 2.

Таблица 2. Праймеры, использованные для RT-PCR

Ген-мишень	Праймеры	ID последовательности/зонда	Краситель и метка-гаситель	SEQ ID NO:
C3 <i>Mus musculus</i> (Mm)	F4080 mC3	AAT GAG GCC TTC TCT CTA ACA	N/A	55
C3 Mm	mC3 R4183	ACT TCT TGC AGG TGA CTT TG	N/A	56

C3 Mm	mC3 P4125	/56-FAM/TT GTC GGT G/ZEN/G TGG CAG TGT ATC AT/3IABkFQ/	FAM/ZEN/IA BkFQ	--
HPRT F576 Mm	Прямой	CAA ACT TTG CTT TCC CTG GT	N/A	57
HPRT R664 Mm	Обратный	CAA AGT CTG GCC TGT ATC	N/A	58
HPRT P616 Mm	Зонд	TGGTTAAGGTTGCAAGCTTGC TGGTG	5'-Hex, Zen, 3'-IABkFQ	--
F1313 hC3	Прямой	CCA AAC TCA GCA TCA ACA CAC	N/A	59
R1419 hC3	Обратный	CTG CAT GGT CCT GGT AGC	N/A	60
P1339 hC3	Зонд	/56-FAM/AG CCA GAA G/ZEN/C CCT TGA GCA TCA C/3IABkFQ/	FAM/ZEN/IA BKfQ	
F4147 hC3	Прямой	GCC AAA GAT CAA CTC ACC TGT A	N/A	61
R4296 hC3	Обратный	AGA CAT AGT GGC ATC CTG GT	N/A	62
P4197 hC3	Зонд	/56-FAM/CC TCT TTT C/ZEN/T GTT TCC GGT GCT GGT /3IABkFQ/	FAM/ZEN/IA BKfQ	--
C3 обезьяны	Тагман	Mf02794722_m1	5'-FAM	--
NeoR-F172	Прямой	AAT GAA CTG CAG GAC GAG G	NA	63
(Устойчивос ть к неомицину)	Обратный	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TCC	NA	64
Для эксперимент ов HDI	Зонд	/5HEX/CAC TGA AGC /ZEN/GGG AAG GGA CTG G/3IABkFQ/	5'-Hex, Zen, 3'-IABkFQ	--
RhHPRT1	RhHPRT1- F583	CTT TCC TTG GTC AGG CAG TAT	NA	65
RhHPRT1	RhHPRT1- R642	CAA CAC TTC GTG GAG TCC TT	NA	66
RhHPRT1	RhHPRT1- R607	/5HEX/CC AAA GAT G/ZEN/G TCA AGG TCG CAA	5'-HEX, ZEN, 3' IABLfQ	--

		GC/3IABkFQ/		
RhPPIB	Taqman	Mf02802985_m1	5'-VIC-MGB	---

Типичные форматы анализа с применением гибридизации рибонуклеиновых кислот включают ядерные анализы run-on, RT-PCR, анализы с защитой от РНКаз, нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и анализ с применением микрочипов. Циркулирующую mRNA можно выявлять с применением способов, которые описаны в публикации согласно РСТ WO2012/177906, полное содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки. Уровень экспрессии гена, представляющего интерес, также можно определять с применением зонда на основе нуклеиновой кислоты.

Выделенную mRNA можно использовать в анализах на основе гибридизации или амплификации, которые включают без ограничения нозерн- или саузерн-анализы, анализы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) и чипы с зондами. Один способ определения уровней mRNA включает приведение выделенной mRNA в контакт с молекулой нуклеиновой кислоты (зондом), которая способна к гибридизации с mRNA гена, представляющего интерес. mRNA может быть иммобилизована на твердой поверхности и приведена в контакт с зондом, например, путем анализа выделенной mRNA в агарозном геле и переноса mRNA из геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза. Зонд(зонды) также может быть иммобилизован на твердой поверхности, и mRNA приводят в контакт с зондом(зондами), например, на чипе AFFYMETRIX® GENECHIP®. Известные из уровня техники способы выявления mRNA можно адаптировать для применения в определении уровня mRNA гена, представляющего интерес.

Альтернативный способ определения уровня экспрессии гена, представляющего интерес, в образце включает процесс амплификации и/или обратной транскрипции нуклеиновой кислоты (с получением cDNA), например, mRNA в образце, например, путем RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления представлен в Mullis, 1987, патент США № 4683202), лигазной цепной реакции (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193), самоподдерживающейся репликации последовательностей (Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878), системы транскрипционной амплификации (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177), репликасы Q-Beta (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), репликации по типу "котящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033) или любого другого способа амплификации нуклеиновой кислоты с последующим выявлением амплифицированных молекул с применением методик, широко известных из уровня техники. Эти схемы выявления особенно полезны при выявлении молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень низких количествах. В некоторых аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии гена, представляющего интерес (например, C3), определяют посредством количественной флуорогенной RT-PCR (т. е. системы TAQMAN™) или люциферазного анализа DUAL-GLO®.

Уровни экспрессии mRNA гена, представляющего интерес, можно подвергать мониторингу с применением мембранного блоттинга (такого как применяемый в анализе

на основе гибридизации, таком как нозерн, саузерн, дот и т. п.) или микролунок, пробирок для образцов, гелей, гранул или волокон (или любой твердой подложки, содержащей связанные нуклеиновые кислоты). См. патенты США №№ 5770722; 5874219; 5744305; 5677195 и 5445934, которые включены в данный документ посредством ссылки. Определение уровня экспрессии гена также может включать применение зондов на основе нуклеиновой кислоты в растворе.

С применением анализов, описанных выше, можно проводить определение эффективности лечения с помощью олигонуклеотидов, описанных в данном документе, на основании снижения количества mRNA C3. Снижение уровней mRNA C3 может представлять собой снижение до 1% или ниже, 5% или ниже, 10% или ниже, 15% или ниже, 20% или ниже, 25% или ниже, 30% или ниже, 35% или ниже, 40% или ниже, 45% или ниже, 50% или ниже, 55% или ниже, 60% или ниже, 70% или ниже, 80% или ниже или 90% или ниже по сравнению с подходящим контрольным уровнем mRNA C3 или уровнем C3 у субъекта до лечения. Подходящий контрольный уровень может представлять собой уровень экспрессии mRNA C3 в клетке или популяции клеток, которые не приводили в контакт с олигонуклеотидом, описанным в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эффект доставки олигонуклеотида в клетку в соответствии со способом, раскрытым в данном документе, оценивают после конечного периода времени. Например, уровни mRNA C3 можно анализировать в клетке через по меньшей мере 8 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа или по меньшей мере 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 или 80 дней после введения олигонуклеотида в клетку.

Кроме того, подавление гена C3 может привести к подавлению экспрессии белка C3, которое может проявляться путем снижения уровня белка C3, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как объяснено выше, для оценки супрессии mRNA подавление уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток можно сходным образом выражать в виде процента уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Последствия подавления экспрессии белка C3 можно подтвердить посредством подходящего анализа для оценки одного или нескольких свойств клетки или субъекта или путем биохимических методик, которые позволяют оценивать молекулы, указывающие на экспрессию белка C3. Степень, с которой олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, обеспечивает снижение уровней экспрессии белка C3, оценивают путем сравнения уровней экспрессии с подходящим контролем (например, уровнем экспрессии белка C3 в клетке или популяции клеток, которым олигонуклеотид не был доставлен или которым был доставлен отрицательный контроль). Подходящий контрольный уровень экспрессии белка C3 может представлять собой предварительно определенный уровень или значение, такие, чтобы не нужно было измерять контрольный уровень каждый раз, такой как количество белка C3, которое, как определено, находится в нормальном диапазоне, например, 75-175 мг/дл в сыворотке крови. Предварительно определенный уровень или значение может иметь ряд форм, включая единичное пороговое значение, такое как

медианное или среднее значение.

Уровень белка C3, продуцируемого путем экспрессии гена C3, может быть определен с применением любого способа, известного из уровня техники, для измерения уровней белка. Такие способы включают, например, электрофорез, капиллярный электрофорез, высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC), жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией (LC/MS/MS), тонкослойную хроматографию (TLC), гипердиффузионную хроматографию, реакции преципитации в жидкости или геле, абсорбционную спектроскопию, калориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию (одинарную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемолуминесцентные анализы и т. п. Такие анализы также можно использовать для выявления белков, указывающих на наличие или репликацию белков, продуцируемых геном, представляющим интерес. Дополнительно, указанные выше анализы можно использовать для фиксации изменения в последовательности mRNA, представляющей интерес, что приводит к восстановлению или изменению функции белка, тем самым обеспечивая терапевтический эффект и пользу субъекту с лечением нарушения у субъекта и/или снижением симптомов нарушения у субъекта.

С применением анализов, описанных выше, можно проводить определение эффективности лечения с помощью олигонуклеотидов, описанных в данном документе, на основании снижения количества белка C3. Снижение уровней белка C3 может представлять собой снижение до 1% или ниже, 5% или ниже, 10% или ниже, 15% или ниже, 20% или ниже, 25% или ниже, 30% или ниже, 35% или ниже, 40% или ниже, 45% или ниже, 50% или ниже, 55% или ниже, 60% или ниже, 70% или ниже, 80% или ниже или 90% или ниже по сравнению с соответствующим контрольным уровнем C3 (например, приблизительно 75-175 мг/дл). Подходящий контрольный уровень может представлять собой уровень экспрессии C33 в клетке или популяции клеток, которые не приводили в контакт с олигонуклеотидом, описанным в данном документе. Эффект доставки олигонуклеотида в клетку в соответствии со способом, раскрытым в данном документе, можно оценивать после конечного периода времени. Например, уровни C3 можно анализировать в клетке через по меньшей мере 8 часов, 12 часов, 18 часов, 24 часа или по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь или четырнадцать дней после введения олигонуклеотида в клетку. Уровень C3 может быть определен с целью оценки того, нуждается ли субъект в повторном лечении. Например, если уровень C3 повышается до уровня до лечения (или уровня, который составляет по меньшей мере приблизительно 20% или больше (например, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больше) от уровня до лечения), субъект может нуждаться в повторном лечении.

Кроме того, подавление гена C3 с применением способов, описанных в данном документе, может привести к снижению транскрипции mRNA C3 в клетке субъекта, идентифицированного как имеющего заболевание, опосредованное активацией или



нарушением регуляции пути системы комплемента. Способы, предусмотренные в данном документе, применимы в любом подходящем типе клеток (например, клетке, которая экспрессирует С3, такой как гепатоцит). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой первичную клетку, которая была получена от субъекта и которая могла пройти ограниченное число пассажей, таким образом, чтобы клетка по сути сохраняла свои природные фенотипические свойства. В некоторых вариантах осуществления клетка, в которую доставляют олигонуклеотид, находится *ex vivo* или *in vitro* (т. е. может быть доставлен в клетку в культуре или в организм, в котором находится клетка). В конкретных вариантах осуществления предусмотрены способы доставки в клетку эффективного количества олигонуклеотида(олигонуклеотидов), раскрытого в данном документе, в целях снижения экспрессии С3 только в гепатоцитах.

Эффективное количество олигонуклеотида(олигонуклеотидов), раскрытого в данном документе, может быть определено как количество олигонуклеотида(олигонуклеотидов), которое приводит к снижению симптомов заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, такого как одно из заболеваний или нарушений, описанных в данном документе. Снижение симптомов заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, может представлять собой снижение на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100%, например, определенное с применением клинических оценок, известных специалисту в данной области техники. Степень снижения симптомов заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, можно использовать для определения того, необходимо ли субъекту повторное лечение с помощью олигонуклеотида(олигонуклеотидов), фармацевтической композиции(композиций), вектора(векторов) или клетки(клеток), описанных в данном документе. Примеры анализов для определения снижения степени проявления заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, включают без ограничения измерение и/или количественное определение уровня циркулирующего белка С3, функциональные анализы (например, анализ WEISLAB® и гемолитический анализ). Количественное определение отложения С3 (или продуктов расщепления С3) можно осуществлять посредством ИНС или иммунофлуоресценции и с помощью специфических биомаркеров заболевания.

Кроме того, олигонуклеотид, описанный в данном документе, который содержит как смысловую нить, так и антисмысловую нить в виде дуплексного полипептида, можно вводить в клетку субъекта с применением любой подходящей доставки нуклеиновой кислоты. Дуплексный олигонуклеотид может быть доставлен в клетку путем инъекции раствора, содержащего олигонуклеотид, бомбардировки частицами, покрытыми олигонуклеотидом, подвергания клетки или организма воздействию раствора, содержащего

олигонуклеотид, или электропорации клеточных мембран в присутствии олигонуклеотида. Дуплексные олигонуклеотиды также можно доставлять в клетки с применением липид-опосредованного транспорта носителя, транспорта, опосредованного химическими веществами, трансфекции с помощью катионных липосом, таких как фосфат кальция, и векторов, кодирующих нуклеиновые кислоты однонитевого олигонуклеотида. Векторы, используемые для доставки дуплексного олигонуклеотида, могут представлять собой вирусные векторы, такие как ретровирусный вектор (например, лентивирусный вектор), аденовирусный вектор (например, Ad5, Ad26, Ad34, Ad35 и Ad48) и вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 и AAV9).

#### Способы лечения

Также в данном документе раскрыты способы лечения заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, в том числе, например, одного или нескольких заболеваний, ассоциированных с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, раскрытых в данном документе, у субъекта путем введения композиций, описанных в данном документе (например, олигонуклеотида, вектора, кодирующего олигонуклеотид, клетки, содержащей вектор, и фармацевтической композиции). Способ может включать лечение заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, у субъекта путем введения фармацевтически приемлемой соли (например, натриевой соли) олигонуклеотида для RNAi, описанного в данном документе. Способы, описанные в данном документе, как правило включают введение субъекту эффективного количества олигонуклеотида или его фармацевтически приемлемой соли, другими словами, количества, способного обеспечивать требуемый терапевтический результат (например, нокдаун экспрессии C3). Терапевтически приемлемое количество может представлять собой количество, которое способно обеспечивать лечение заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции C3). Подходящая дозировка для любого субъекта будет зависеть от определенных факторов, в том числе размера субъекта, площади поверхности тела, возраста, конкретной композиции, подлежащей введению, активного ингредиента(ингредиентов) в композиции, времени и пути введения, общего состояния здоровья и других лекарственных средств, вводимых одновременно. Такие средства лечения можно использовать, например, для замедления, остановки развития или предупреждения любого типа заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, и можно вводить либо профилактически, либо терапевтически. Введение профилактического средства можно осуществлять до выявления или проявления симптомов, характерных для заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, таким образом, чтобы достигалось предупреждение заболевания или нарушения или, в качестве альтернативы, замедление его прогрессирования. Субъекты с

риском развития заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, могут быть идентифицированы посредством, например, одного или комбинации диагностических или прогностических анализов, известных из уровня техники.

Композиции, раскрытые в данном документе, можно вводить субъекту с применением любого стандартного способа. Например, любую из композиций, раскрытых в данном документе, можно вводить энтерально (например, перорально, с помощью желудочной трубки для кормления, с помощью дуоденальной трубки для кормления, через гастростому или ректально), парентерально (например, подкожная инъекция, внутривенная инъекция или инфузия, внутриартериальная инъекция или инфузия, внутрикостная инфузия, внутримышечная инъекция, интрацеребральная инъекция, интрацеребровентрикулярная инъекция, интратекальная), местно (например, накожно, путем ингаляции, с помощью глазных капель или через слизистую оболочку) или путем прямой инъекции в орган-мишень (например, печень субъекта). Как правило, олигонуклеотиды, раскрытые в данном документе, вводят внутривенно или подкожно. Наиболее подходящий путь введения в любом конкретном случае будет зависеть от конкретной вводимой композиции, субъекта, конкретного заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, подлежащего лечению, способов фармацевтического составления, способов введения (например, времени введения и пути введения), возраста субъекта, веса тела, пола, тяжести заболеваний, подлежащих лечению, рациона субъекта и скорости экскреции субъекта.

Субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, опосредованным активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, можно вводить олигонуклеотиды, описанные в данном документе, например, один раз в год (например, один раз в 12 месяцев), один раз в полгода (например, один раз в шесть месяцев), один раз в квартал (например, один раз в три месяца), один раз в два месяца (например, один раз каждые два месяца), один раз в месяц или один раз в неделю. В других случаях олигонуклеотиды можно вводить один раз в одну, две или три недели. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды можно вводить один раз в сутки.

Субъект, подлежащий лечению заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, может представлять собой человека или примата, отличного от человека, или другого субъекта-млекопитающего (например, человека). Другие иллюстративные субъекты, которых можно лечить с помощью олигонуклеотидов, описанных в данном документе, включают одомашненных животных, таких как собаки и кошки; домашний скот, такой как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы и куры, и животных, таких как мыши, крысы, морские свинки и хомяки.

#### Дозировки

Дозировка композиции по настоящему изобретению (например, композиции, содержащей олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе) может варьироваться в зависимости от множества

факторов, таких как фармакодинамические свойства соединения, способ введения, возраст, состояние здоровья и вес реципиента, природа и степень выраженности симптомов, частота лечения и/или тип сопутствующего лечения, если таковое имеется, и скорость клиренса соединения у субъекта, подлежащего лечению. Специалист в данной области техники может определить подходящую дозировку на основании вышеуказанных факторов.

Олигонуклеотиды по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемые соли можно вводить в количестве и в течение периода времени, эффективных для достижения одного или нескольких из (например, 2 или более, 3 или более, 4 или более из): (a) уменьшения экспрессии белка C3 в клетке субъекта, (b) снижения транскрипции C3 в клетке субъекта, (c) снижения уровня белка C3 в клетке субъекта, (d) снижения активности белка C3 в клетке субъекта и/или (e) снижения степени проявления одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение эффективного количества описанного олигонуклеотида, который специфически связывается с mRNA C3 и подавляет экспрессию белка C3 у субъекта. Например, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида, фармацевтической композиции, вектора или клетки, раскрытых в данном документе.

Подлежащее лечению заболевание, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, при котором применяются раскрытые способы и композиции, может представлять собой, например, одно или несколько заболеваний, ассоциированных с активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, раскрытых в данном документе.

Лечение заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, можно осуществлять путем введения олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi), который подавляет экспрессию и/или трансляцию mRNA C3 (например, экспрессию белка C3), такого как олигонуклеотиды, описанные в данном документе.

Раскрытые композиции можно вводить в количествах, которые, как определено специалистами в данной области техники, являются подходящими. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, описанный в данном документе, можно вводить изначально в подходящей дозе, которую можно при необходимости регулировать, в зависимости от клинического ответа.

В некоторых случаях олигонуклеотид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе, составляющей 0,01-100 мг/кг (например, 0,01-1 мг/кг, 1-5 мг/кг, 5-20 мг/кг, 20-50 мг/кг, 50-100 мг/кг) веса тела субъекта. В определенных случаях олигонуклеотид

вводят в концентрации 0,01-50 мг/кг (например, 0,01-1 мг/кг, 1-5 мг/кг, 5-10 мг/кг, 10-20 мг/кг, 20-30 мг/кг, 30-40 мг/кг, 40-50 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01-20 мг/кг (например, 0,01-1 мг/кг, 1-5 мг/кг, 5-10 мг/кг, 10-15 мг/кг, 15-20 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01-15 мг/кг (например, 0,01-1 мг/кг, 1-2 мг/кг, 2-5 мг/кг, 5-8 мг/кг, 8-10 мг/кг, 10-12 мг/кг, 12-15 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01-10 мг/кг (например, 0,01-1 мг/кг, 1-2 мг/кг, 2-5 мг/кг, 5-8 мг/кг, 8-10 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01-5 мг/кг (например, 0,01-1 мг/кг, 1-2 мг/кг, 2-3 мг/кг, 3-4 мг/кг, 4-5 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,1-20 мг/кг (0,1-1 мг/кг, 1-5 мг/кг, 5-10 мг/кг, 10-15 мг/кг и 15-20 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,1-10 мг/кг (например, 0,1-1 мг/кг, 1-2 мг/кг, 2-5 мг/кг, 5-7 мг/кг и 7-10 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,1-5 мг/кг (например, 0,1-1 мг/кг, 2-3 мг/кг, 3-4 мг/кг и 4-5 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 1-50 мг/кг (например, 1-10 мг/кг, 10-20 мг/кг, 20-30 мг/кг, 30-40 мг/кг и 40-50 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 1-20 мг/кг (например, 1-5 мг/кг, 5-10 мг/кг, 10-15 мг/кг и 15-20 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 1-10 мг/кг (например, 1-2 мг/кг, 2-5 мг/кг, 5-7 мг/кг и 7-10 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 1-5 мг/кг (например, 1-2 мг/кг, 2-3 мг/кг, 3-4 мг/кг и 4-5 мг/кг) веса тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 30-300 мг/кг (например, 30-200 мг/кг, 30-100 мг/кг, 30-50 мг/кг, 50-300 мг/кг, 100-300 мг/кг, 200-300 мг/кг и 250-300 мг/кг).

В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид вводят в дозе менее 10 мг/кг (например, 9 мг/кг или меньше, 8 мг/кг или меньше, 7 мг/кг или меньше, 6 мг/кг или меньше, 5 мг/кг или меньше, 4 мг/кг или меньше, 3 мг/кг или меньше, 2 мг/кг или меньше, 1 мг/кг или меньше) веса тела субъекта. В других вариантах осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 10 мг/кг или меньше. В другом варианте осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 9 мг/кг или меньше (например, 8,9 мг/кг, 8 мг/кг, 7 мг/кг, 5 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг или меньше). В других вариантах осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 8 мг/кг или меньше (например, 7,9 мг/кг, 7 мг/кг, 5 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг или меньше). В другом варианте осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 7 мг/кг или меньше (например, 6,9 мг/кг, 6 мг/кг, 4 мг/кг, 2 мг/кг и 1 мг/кг или меньше). В другом варианте осуществления олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) вводят в дозе приблизительно 6 мг/кг или меньше (например, 5,9 мг/кг, 5 мг/кг, 3 мг/кг и 1 мг/кг или меньше). В другом варианте осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 5 мг/кг или меньше (например, 4,9 мг/кг, 4 мг/кг, 3 мг/кг, 2 мг/кг и 1 мг/кг или меньше). В другом варианте осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 4 мг/кг или меньше (например, 3,9 мг/кг, 3 мг/кг, 2 мг/кг и 1 мг/кг или меньше). В другом варианте

осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 3 мг/кг или меньше (например, 2,9 мг/кг, 2,5 мг/кг, 2 мг/кг, 1 мг/кг или меньше). В другом варианте осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 2 мг/кг или меньше (например, 1,9 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1 мг/кг и 0,5 мг/кг или меньше). В другом варианте осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 1 мг/кг или меньше (например, 0,9 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,2 мг/кг и 0,1 мг/кг или меньше).

В другом варианте осуществления олигонуклеотид вводят в дозе приблизительно 0,1-10 мг/кг, приблизительно 0,2-10 мг/кг, приблизительно 0,3-10 мг/кг, приблизительно 0,4-10 мг/кг, приблизительно 0,5-10 мг/кг, приблизительно 1-10 мг/кг, приблизительно 2-10 мг/кг, приблизительно 3-10 мг/кг, приблизительно 4-10 мг/кг, приблизительно 5-10 мг/кг, приблизительно 6-10 мг/кг, приблизительно 7-10 мг/кг, приблизительно 8-10 мг/кг или приблизительно 9 мг/кг веса тела субъекта.

В других случаях доза композиции (например, композиции, содержащей олигонуклеотид для RNAi, описанный в данном документе) представляет собой профилактически или терапевтически эффективное количество. В некоторых случаях вирусный вектор (например, вектор на основе гAAV) вводят в дозе  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ ,  $10^{14}$  или  $10^{15}$  копий генома (GC) на субъекта. В некоторых вариантах осуществления гAAV вводят в дозе  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  или  $10^{14}$  GC/кг (общего веса субъекта).

Необязательно раскрытые олигонуклеотиды можно вводить как часть фармацевтически приемлемой композиции, подходящей для доставки субъекту, как описано в данном документе. Раскрытые средства включены в такие композиции в количествах, достаточных для обеспечения требуемой дозы и/или индуцирования терапевтически благоприятного эффекта, которые могут быть легко определены специалистами в данной области техники.

Раскрытые композиции, описанные в данном документе, можно вводить в количестве (например, эффективном количестве) и в течение периода времени, достаточных для лечения субъекта или для достижения одного из исходов, описанных выше (например, снижения одного или нескольких симптомов заболевания у субъекта). Раскрытые композиции можно вводить один раз или более одного раза. Раскрытые композиции можно вводить один раз в сутки, два раза в сутки, три раза в сутки, один раз в два дня, один раз в неделю, два раза в неделю, три раза в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в два месяца, два раза в год или один раз в год. Лечение может быть дискретным (например, инъекция) или непрерывным (например, лечение с помощью имплантата или инфузионной помпы). Субъекты могут быть оценены в отношении эффективности лечения через 1 неделю, 2 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев или больше после введения композиции по настоящему изобретению в зависимости от композиции и пути введения, используемых для лечения. Субъектов можно лечить в течение дискретного периода времени (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или

12 месяцев) или до тех пор, пока степень проявления заболевания или состояния не уменьшится, или лечение может быть хроническим, в зависимости от тяжести и природы заболевания или состояния, подлежащего лечению (например, в течение жизни субъекта). Например, субъекту, у которого диагностирована PNH и которого лечили композицией, раскрытой в данном документе, можно давать одно или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше) дополнительных средств лечения, если первоначальный или последующие курсы лечения не вызывают терапевтической пользы, в том числе снижения степени проявления любого из симптомов, ассоциированных с PNH, таких как утомляемость, слабость, одышка, легкое появление синяков или кровоподтеков, рекуррентные инфекции, сильная головная боль, тромбы и затруднения при остановке кровотечения, или снижения уровней mRNA C3 или уровней белка C3 в клетках или сыворотке крови субъекта.

#### Наборы

В настоящем изобретении также описаны наборы, содержащие (а) фармацевтическую композицию, содержащую средство на основе олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) или его фармацевтически приемлемую соль, которое обеспечивает снижение уровня и/или активности C3 в клетке или у субъекта, как описано в данном документе, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. Набор может содержать вектор, кодирующий олигонуклеотид(олигонуклеотиды) (например, олигонуклеотид(олигонуклеотиды) для RNAi), описанный в данном документе, или клетку, содержащую вектор, кодирующий олигонуклеотид(олигонуклеотиды) (например, олигонуклеотид(олигонуклеотиды) для RNAi), описанный в данном документе. Набор также может содержать листок-вкладыш с инструкциями для осуществления любого из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит (а) фармацевтическую композицию, содержащую средство на основе олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi), которое обеспечивает снижение уровня и/или активности C3 в клетке или у субъекта, как описано в данном документе, (b) дополнительное терапевтическое средство и (c) листок-вкладыш с инструкциями для осуществления любого из способов, описанных в данном документе.

#### Примеры

Следующие примеры предназначены лишь для иллюстрации и никоим образом не подразумеваются как ограничивающие каким-либо образом настоящее изобретение.

#### **Пример 1. Получение олигонуклеотидов для RNAi**

##### *Синтез и очистка олигонуклеотидов*

Олигонуклеотиды для RNAi, описанные в данном и вышеуказанных примерах, химически синтезировали с применением способов, описанных в данном документе. Как правило, олигонуклеотиды для RNAi синтезировали с применением способов твердофазного синтеза олигонуклеотидов, как описано для 19-23-мерных siRNA (см., например, Scaringe *et al.* (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:5433-5441 и Usman *et al.* (1987) *J. Am.*

*Chem. Soc.* 109:7845-7845; см. также патенты США №№ 5804683; 5831071; 5998203; 6008400; 6111086; 6117657; 6353098; 6362323; 6437117 и 6469158), в дополнение к применению известного фосфоамидитного синтеза (см., например, Hughes and Ellington (2017) *COLD SPRING HARB PERSPECT BIOL.* 9(1):a023812; Beaucage S.L., Caruthers M.H., *Studies on Nucleotide Chemistry V: Deoxynucleoside Phosphoramidites-A New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis*, *TETRAHEDRON LETT.* 1981;22:1859-1862. doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7).

Олигонуклеотиды для RNAi, имеющие 19-мерную коровую последовательность, преобразовывали формат конструкций, имеющих 25-мерную смысловую цепь и 27-мерную антисмысловую цепь, для обеспечения возможности процессинга посредством механизма RNAi. 19-Мерная коровая последовательность являлась комплементарной области в С3 mRNA.

Отдельные нити РНК синтезировали и очищали посредством HPLC в соответствии со стандартными способами (Integrated DNA Technologies; Коралвилл, Айова). Например, олигонуклеотиды РНК синтезировали с применением твердофазной фосфоамидитной химии, удаляли защитную группу и обессоливали на колонках NAP-5 (Amersham Pharmacia Biotech; Пискатауэй, Нью-Джерси) с применением стандартных методик (Damha & Olgivie (1993) *METHODS MOL. BIOL.* 20:81-114; Wincott *et al.* (1995) *NUCLEIC ACIDS RES.* 23:2677-2684). Олигомеры очищали с применением ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (IE-HPLC) на колонке Amersham Source 15Q (1,0 см × 25 см; Amersham Pharmacia Biotech) с использованием ступенчато-линейного градиента в течение 15 мин. Градиент варьировался от 90:10 буферов А:В до 52:48 буферов А:В, где буфер А представляет собой 100 мМ трис с pH 8,5, а буфер В представляет собой 100 мМ трис с pH 8,5, 1 М NaCl. Мониторинг образцов осуществляли при 260 нм и полноразмерные олигонуклеотидные соединения соответствующих пиков собирали, объединяли, обессоливали на колонках NAP-5 и лиофилизировали.

Чистоту каждого олигомера определяли посредством капиллярного электрофореза (CE) с помощью Beckman PACE 5000 (Beckman Coulter, Inc.; Фуллертон, Калифорния). Капилляры для CE имеют внутренний диаметр 100 мкм и содержат гель ssDNA 100R (Beckman-Coulter). Как правило, приблизительно 0,6 нмоль олигонуклеотида вводили в капилляр, пропускали через электрическое поле, предусматривающее 444 В/см, и осуществляли их обнаружение по поглощению в УФ-области спектра при 260 нм. Подвижный денатурирующий буфер на основе трис-бората и 7 М мочевины приобретали у Beckman-Coulter. Для использования в описанных ниже экспериментах получали олигорибонуклеотиды с чистотой по меньшей мере 90% согласно оценке посредством CE. Идентичность соединения подтверждали посредством времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) с помощью рабочей станции VOYAGER-DE™ BIOSPECTROMETRY™ (Applied Biosystems; Фостер-Сити, Калифорния), следуя рекомендуемому производителем протоколу. Получали относительные молекулярные массы всех олигомеров, которые часто



находились в пределах 0,2% от расчетной молекулярной массы.

#### *Получение дуплексов*

Олигомеры одонитевой РНК ресуспендировали (например, в концентрации 100 мкМ) в дуплексном буфере, состоящем из 100 мМ ацетата калия, 30 мМ HEPES, pH 7,5. Комплементарные смысловую и антисмысловую нити смешивали в равных молярных количествах с получением конечного раствора, предусматривающего, например, 50 мкМ дуплекса. Образцы нагревали до 100°C в течение 5 минут в РНК-буфере (IDT) и оставляли охлаждаться до комнатной температуры перед применением. Олигонуклеотиды для RNAi хранили при -20°C. Олигомеры одонитевой РНК хранили в лиофилизированном виде или в воде, не содержащей нуклеаз, при -80°C.

### **Пример 2. Синтез C3-нацеливающихся олигонуклеотидов для RNAi**

#### *Идентификация целевых последовательностей mRNA C3*

Система комплемента представляет собой строго регулируемый ферментный каскад, который может быть активирован посредством нескольких разных путей, включая классический путь активации системы комплемента (ССР), при котором комплексы на основе антител индуцируют активацию. Независимо от того, какой путь инициирует процесс, активация системы комплемента сводится к C3 в каскаде. После активации C3 расщепляется с образованием эффекторных молекул C3a и C3b, что приводит к воспалению, отложению C3b в тканях и активации терминальных компонентов системы комплемента, а также дальнейшему повреждению тканей.

Для получения олигонуклеотидов для RNAi, подавляющих экспрессию C3, применяли компьютерный алгоритм для вычислительного определения целевых последовательностей mRNA C3, подходящих для анализа подавления экспрессии C3 посредством RNAi-пути. Свыше 300 последовательностей направляющей (антисмысловой) нити олигонуклеотидов для RNAi, каждая из которых характеризовалась наличием области комплементарности с подходящей целевой последовательностью mRNA C3 человека (см. таблицу 3), получали и анализировали *in vitro* на предмет подавления экспрессии C3. Для дополнительного исследования из этих олигонуклеотидов для RNAi выбирали подгруппу из девяти (см. таблицу 4). Подгруппа из девяти направляющих последовательностей, идентифицированных алгоритмом, была также комплементарна соответствующей целевой последовательности C3 из mRNA C3 обезьяны (SEQ ID NO: 67; таблица 3). Предполагается, что олигонуклеотиды для RNAi C3, содержащие область комплементарности с гомологичными целевыми последовательностями mRNA C3 со сходством нуклеотидных последовательностей, обладают способностью к нацеливанию на гомологичные mRNA C3.

**Таблица 3. Последовательности mRNA C3 человека и обезьяны**

<b>Видовая принадлежность</b>	<b>Ссылочный № последовательности</b>	<b>SEQ ID NO</b>
Человек (Hs)	NM_000064.4	12
Яванский макак (Mf)	XM_005587719.2	67

### Пример 3. Идентификация олигонуклеотидов для RNAi для подавления экспрессии C3 *in vitro*

Активность олигонуклеотидов для RNAi (представленных в формате олигонуклеотидов dsRNA), полученных как описано в примерах 1 и 2, в отношении снижения уровня mRNA C3 измеряли с применением клеточных анализов *in vitro*. Вкратце, клетки печени человека HepG2, экспрессирующие эндогенный C3, трансфицировали олигонуклеотидами для RNAi в концентрации 1 нМ (фигура 3А) или подгруппой выбранных в ходе скрининга олигонуклеотидов для RNAi, изображенных на фиг. 3А, в двух разных концентрациях (0,1 и 1 нМ) (фигура 3В), как указано, в отдельных лунках многолуночного культурального планшета. Клетки поддерживали в течение 24 ч после осуществления трансфекции, а затем определяли уровни mRNA C3 для трансфицированных клеток с применением анализов qPCR на основе TAQMAN®. Два анализа RT-qPCR, 3'-анализ и 5'-анализ, применяли для определения уровней mRNA, измеренных с помощью зондов HEX и FAM соответственно. Подгруппу олигонуклеотидов-кандидатов для RNAi выбирали для дополнительного анализа *in vivo* на основе подавления уровней mRNA C3, определенного посредством RT-qPCR.

### Пример 4. Скрининг олигонуклеотидов для RNAi на мышах, экспрессирующих cDNA C3 человека (мыши HDI)

Подгруппу олигонуклеотидов-кандидатов для RNAi (или "соединения") из примера 3 подвергали скринингу на мышах, экспрессирующих cDNA C3 человека. Мышам CD-1, трансфицированным векторами, экспрессирующими cDNA C3 человека, вводили однократную подкожную дозу выбранных соединений (соединения А-І) в количестве 0,5 или 1 мг/кг. Животных умерщвляли спустя 4 дня для оценки уровней mRNA C3 человека в гомогенатах печени, определяемых посредством RT-qPCR с применением специфических зондов. Соединения, для которых была продемонстрирована по меньшей мере 50% активность по нокдауну у трансфицированных мышей, выбирали для тестирования на яванских макаках. Результаты скрининга подгруппы из 9 соединений (т. е. соединений А, В, С, D, E, F, G, H и I) *in vivo* изображены на фигурах 4В и 4С, а их соответствующие смысловые и антисмысловые нити обобщены в таблице 4 и на фигуре 4А. Данные выражены как процентная доля mRNA C3, остающейся в печени, относительно обработанных PBS мышей.

Таблица 4. Краткое описание смысловых и антисмысловых цепей соединений А-І

Соединение	SEQ ID NO: смысловой цепи	SEQ ID NO: смысловой цепи с модификациями	SEQ ID NO: антисмысловой цепи	SEQ ID NO: антисмысловой цепи с модификациями
А	1	37	3	38
В	4	39	6	40
С	17	41	18	42

D	18	43	20	44
E	21	45	22	46
F	23	47	24	48
G	25	49	26	50
H	27	51	28	52
I	29	53	30	54

#### **Пример 5. Скрининг олигонуклеотидов для RNAi на яванских макаках**

Все соединения от А до I, как описано в примере 4, таблице 4 и фигуре 4А, предварительно выбранные во время скрининга на мышах, тестировали на яванских макаках (NHP) в отношении продолжительности сайленсинга mRNA C3 после однократного подкожного введения соединений А-I в количестве 4 мг/кг. Биопсию печени у всех тестируемых животных (n=5/соединение) проводили перед введением препарата и в день 28 и день 56 после инъекции. Как показано на фигуре 5, наблюдалось по меньшей мере 50% снижение уровней mRNA C3 в печени для большинства тестируемых соединений по сравнению с нормализованными исходными уровнями и сопоставимыми по времени контролями, которым вводили PBS, как определено с помощью RT-qPCR. Два лидерных соединения (соединения А и В) выбирали на основе уровня нокдауна mRNA C3 в печени яванских макаков после однократного введения для тестирования в многодозовом исследовании.

Соединения А и В выбирали после исследования однократной дозы для дополнительной оценки в многодозовом исследовании на NHP. Введение доз яванским макакам проводили подкожно в количестве 1 мг/кг или 2 мг/кг в день 0, день 28, день 56 и день 84, в общей сложности предусматривая 4 дозы. Биоптаты печени собирали до осуществления введения и в дни 28, 56 и 112 после первоначальной обработки для оценки уровней mRNA C3 в печени с помощью RT-qPCR (фигура 6А). Забор образцов сыворотки крови осуществляли до введения дозы, в дни 1, 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98 и 112 после введения начальной дозы для оценки уровней белка C3 с помощью набора C3 ELISA (фигура 6В), активности системы комплемента с помощью анализа WIESLAB® AP (фигура 8) и посредством гемолиза эритроцитов кролика (фигура 9). Животные, обработанные PBS, использовались в качестве контроля применительно к mRNA C3 в печени, белку C3 в сыворотке крови и функциональным исследованиям. Многократная обработка яванских макаков соединением А или В приводила к устойчивому во времени сайленсингу mRNA C3 в печени, значительному уменьшению циркулирующего C3 в сыворотке крови, >95% уменьшению вовлечения альтернативного пути активации комплемента и полному подавлению лизиса эритроцитов кролика в гемолитическом анализе после нескольких введений соединений А и В, как показано на фигурах 6А, 6В, 8 и 9 соответственно.

Активность соединений А и В рассчитывали путем объединения результатов для дня 28 как для одно-, так и для многодозовых исследований на NHP. Примерную ED<sub>50</sub> для соединений А (0,65 мг/кг) и соединения В (0,55 мг/кг) рассчитывали исходя из кривой

зависимости доза-ответ, построенной для обоих соединений (фигура 7).

**Пример 6. Фармакокинетическое и фармакодинамическое исследование влияния соединения J на экспрессию C3 у мышей CD-1**

Мышей CD-1 обрабатывали соединением J (мышиным суррогатом соединения A) для оценки процента нокдауна mRNA C3 в печени и уровней белка C3 в сыворотке крови у мышей в результате введения соединения J. Процент нокдауна mRNA C3 в печени в результате введения соединения J измеряли с применением RT-qPCR. Количество C3 в сыворотке крови измеряли с применением анализа ELISA для мышинового C3. Мыши получали однократную подкожную дозу соединения J в количестве 0,5 мг/кг, 1 мг/кг или 6 мг/кг. Однократное введение соединения J продемонстрировало дозозависимую процентную долю нокдауна mRNA C3 в печени с более чем 90% уменьшением уровня mRNA C3 в печени животных, получивших дозу 6 мг/кг (n=5 мышей/временная точка). Наиболее низкий уровень нокдауна mRNA наблюдался через 3-14 дней после введения дозы 6 мг/кг, как показано на фигуре 10А. Процентную долю белка C3 в сыворотке крови мышей CD-1 измеряли на протяжении исследования и его уровень подвергался соответствующему подавлению (фигура 10В).

Количество соединения J в плазме крови, тканях печени, почки и селезенки мышей CD-1, которым однократно подкожно вводили соединение J в дозе 6 мг/кг, измеряли с применением qPCR с содержащими структуру стебель-петля праймерами в течение периода 672 часов после получения дозы (фигура 11). Фармакокинетический анализ показал, что наибольшее воздействие соединения J наблюдалось в печени, затем в селезенке, почке и плазме крови (фигура 11).

В многодозовом исследовании, проводимом на протяжении 70-дневного периода, процентное содержание mRNA C3 измеряли с применением RT-qPCR, а количество белка C3 в сыворотке крови измеряли посредством анализа ELISA для мышинового C3, при этом мыши CD-1 получали четыре дозы, составляющие 1 мг/кг или 6 мг/кг, соединения J в дни 0, 14, 28 и 42, как показано на фигурах 12А и 12В соответственно. Данная схема привела в результате к ~75% и >95% нокдауну mRNA C3 в печени и сокращению уровней белка сыворотки крови соответственно. Процедуры биопсии и сбора сыворотки крови проводили в дни 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56 и 70 после первоначальной дозы. Анализ концентрации соединения J в печени и плазме крови после введения 4 доз, составляющих 1 мг/кг, проводили на биоптатах печени и образцах плазмы крови с применением qPCR с содержащими структуру стебель-петля праймерами (SL-qPCR), как показано на фигурах 13А и 13В соответственно. Мышей CD-1, обработанных PBS, использовали в качестве контроля как для уровней mRNA C3 в печени, так и для уровней белка C3 в сыворотке крови.

Данное многодозовое исследование продемонстрировало, что соединение J (мышиный суррогат соединения A) продемонстрировало дозозависимый нокдаун mRNA C3 в печени, который сохранялся на протяжении периода длительностью 70 дней. Снижение уровней циркулирующего белка C3 соответствовало снижению уровня mRNA

C3, наблюдаемому в печени. Кроме того, концентрации соединения J в плазме крови и печени у животных, которым вводили дозу, не продемонстрировали накопления соединения J при введении дозы один раз в две недели (1 мг/кг) (фигуры 13А и 13В соответственно).

**Пример 7. Эффект соединения J в отношении экспрессии C3 у мышей NZB/W F1, являющихся моделью волчаночного нефрита**

Мышиную модель волчанки NZB/W F1 применяли для тестирования в рамках подтверждения механизма действия, проводимого на модели заболевания с использованием соединения J. Животным NZB/W F1 подкожно вводили соединение J в дозах 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг каждые 4 недели, начиная с возраста 21 недели (n=10/группа). Животных, обработанных PBS, использовали в качестве отрицательного контроля, а почки мышей CD1 использовали в качестве контроля с отсутствием заболевания. В возрасте 37 недель оценивали клубочковое отложение C3 и пропердина посредством иммунофлуоресцентной визуализации почек у животных, обработанных соединением J, и у контрольных животных, обработанных PBS (фигура 14). В возрасте 29 недель измеряли процентное содержание mRNA C3 в печени с применением RT-qPCR (фигура 15А), а количество белка C3 в сыворотке крови количественно определяли с применением анализа ELISA для мышинового C3 (фигура 15В) для каждого уровня дозы соединения J. После обработки несколькими дозами соединения J наблюдали дозозависимое снижение клубочкового отложения C3 и пропердина у обработанных соединением J животных. Многодозовая обработка мышей NZB/W F1 соединением J показала дозозависимый нокдаун mRNA C3 в печени, который сохранялся на протяжении периода 16 недель. Снижение уровней циркулирующего белка C3 (фигура 15А) соответствовало снижению mRNA C3, наблюдаемому в печени (фигура 15В).

Для измерения циркулирующих иммунных комплексов (CIC) IgG посредством анализа ELISA собирали образцы сыворотки крови в возрасте 29 и 37 недель после 8 и 16 недель обработки соединением J соответственно (фигура 16А и фигура 16В). После обработки несколькими дозами соединения J не наблюдалось повышения уровней циркулирующих иммунных комплексов при нокдауне экспрессии C3 в печени по сравнению с уровнями CIC, наблюдаемыми у обработанной PBS контрольной группы.

**Пример 8. Эффект соединения J в отношении экспрессии C3 у мышей MRL/lpr, являющихся моделью волчаночного нефрита**

Использовали мышиную модель волчанки MRL/lpr и осуществляли ее обработку соединением J. Мыши получали многократные дозы соединения J, составляющие 6 мг/кг. Фигура 17 демонстрирует снижение клубочкового отложения C3 в почках мышей MRL/lpr, обработанных многократными дозами соединения J, составляющими 6 мг/кг. Также наблюдали снижение отложений пропердина в образцах почек животных, которых обрабатывали соединением J подкожно в дозах 6 мг/кг каждые две недели с возраста 8 недель до 16 недель, как показано на фигуре 17.

**Пример 9. Эффект соединения J в отношении экспрессии C3 у мышей Cfh<sup>-/-</sup>,**

### **являющихся моделью дисрегуляции комплемента**

Мышам с дефицитом фактора комплемента Н (*Cfh*<sup>-/-</sup>) вводили четыре ежемесячные дозы соединения J, составляющие 0,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг, с возраста 4 месяцев до возраста 8 месяцев. Через 4 недели после введения последней дозы соединения J осуществляли сбор почек во всех группах с обработкой и проводили иммунофлуоресцентный анализ для визуализирования отложений как С3, так и пропердина в клубочках обработанных животных CFH<sup>-/-</sup>. На фигуре 18 показано дозозависимое снижение клубочкового отложения С3 в почках мышей CFH<sup>-/-</sup>, обработанных многократными возрастающими дозами соединения J. Также наблюдали снижение отложений пропердина в образцах почек животных, которым вводили подкожно дозы соединения J каждые четыре недели с возраста 16 недель до возраста 32 недель, как показано на фигуре 18. Процентное содержание mRNA С3 в печени измеряли с применением RT-qPCR (фигура 19). Обработка устраняла отложение С3 и пропердина в почках. Кроме того, обработка соединением J также обеспечивала нормализацию уровней С5 в сыворотке крови этих мышей (сокращение количества С5 является отличительным признаком дисрегуляции комплемента в данной модели).

### **Пример 10. Эффект соединения J в отношении экспрессии С3 в мышинной модели индуцированного артрита, являющейся моделью CAIA**

Эффект соединения J в отношении лечения связанных с артритом симптомов изучали с использованием мышинной модели индуцированного артрита, являющейся моделью индуцированного антителами к коллагену артрита (CAIA), которая является простой моделью ревматоидного артрита. Мышиную модель индуцированного артрита, являющуюся моделью CAIA, создавали введением мыши антител к коллагену в день 0 с последующим введением бустера LPS в день 3. Соединение J тестировали как в превентивных, так и в терапевтических исследованиях. Животным вводили соединение J в дозе 3 или 6 мг/кг в день -7 в случае превентивного исследования (фигура 20А) или после возникновения заболевания в день 5 в случае терапевтического исследования (фигура 20В). Воспаление задней лапы анализировали визуально в день 10, и результаты как превентивного, так и терапевтического исследований показаны на фигурах 21А и 21В соответственно. Профилактическое лечение соединением J предупреждало опухание задних лап, что является характерным отличительным признаком данной модели (фигура 21А). Терапевтическое лечение соединением J обеспечивало полную реверсию манифестации клинического заболевания после однократной дозы по сравнению с обработанными PBS контрольными животными (фигура 21В).

Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) проводили в отношении биоптатов задних лап и коленных суставов и оно продемонстрировало снижение местной инфильтрации мононуклеарными клетками у мышей, которых обрабатывали однократной дозой соединения J, составляющей 6 мг/кг, либо превентивно с помощью 3 доз (фигура 22А), либо терапевтически с помощью однократной дозы (фигуры 22В и 24А соответственно). Кроме того, проводили окрашивание биоптатов на маркеры лимфоцитов

(CD45-положительные клетки), лейкоцитов (CD11b-положительные клетки) и макрофагов (F4/80-положительные клетки), как показано на фигурах 25, 26 и 27 соответственно, с целью продемонстрировать снижение местного воспаления в результате терапевтического лечения соединением J в дозе 6 мг/кг. Биоптаты также окрашивали сафранином O с визуализацией хрящевой ткани в коленных суставах животных мышиной модели индуцированного артрита, являющейся моделью CAIA. Животные, обработанные соединением J в количестве 6 мг/кг, продемонстрировали значительное снижение эрозии хряща по сравнению с обработанными PBS мышами при превентивной (фигура 23) или терапевтической (фигура 24B) обработке. Эксперименты с применением гибридизации *in situ* для mRNA C3 и CD45 проводили на биоптатах с целью оценки экспрессии компонентов системы комплемента в местных очагах воспаления у животных мышиной модели индуцированного артрита, являющейся моделью CAIA, получавших и не получавших обработку соединением J в дозе 6 мг/кг, что показано на фигуре 28. Нокаун C3 в печени с помощью соединения J снижал инфильтрацию лимфоцитами (CD45-положительными клетками) и локальную экспрессию mRNA C3 при терапевтической обработке соединением J по сравнению с животными, обработанными PBS, в качестве контрольной группы.

**Пример 11. Эффект соединения J в отношении экспрессии C3 в мышиной модели рассеянного склероза**

Экспериментальную мышиную модель индуцированного миелиновым олигодендроцитным гликопротеином (MOG) аутоиммунного энцефаломиелита (EAE), которая является моделью, широко применяемой для исследований иммуноопосредованных механизмов нейровоспаления и демиелинизации, превентивно обрабатывали соединением J в дозе 6 мг/кг (n=2 эксперимента). Уровни печеночной mRNA C3 после обработки соединением J, а также белок C3 в сыворотке крови оценивали с применением RT-qPCR и анализа ELISA для мышиногo C3 соответственно, как показано на фигурах 31A и 31B. Аналогично, оценивали процентное содержание оставшейся после обработки соединением J mRNA C3, а также количество C3 в сыворотке крови мышей с MOG-индуцированным EAE после обработки соединением J в дозе 6 мг/кг по сравнению с мышами с дефицитом C3 и линией мышей с MOG-индуцированным EAE, характеризующейся дефицитом C3, получавшими обработку с помощью PBS. Нокаун C3 в печени с помощью соединения J снижал тяжесть заболевания в обоих проведенных экспериментах (фигура 29). Наблюдаемое при нокауте в печени с помощью обработки соединением J снижение тяжести заболевания было схожим с таковым, имевшем место при клиническом наблюдении за животными с дефицитом C3 (полный нокаут).

Также от мышей с MOG-индуцированным EAE, обработанных соединением J, получали образцы поясничного отдела спинного мозга. Проводили окрашивание образцов поясничного отдела спинного мозга люксолом прочным синим наряду с окрашиванием гематоксилин-эозином с целью визуализации миелинизации, а также инфильтрации мононуклеарными клетками, как показано на фигуре 30. Сравнивали окрашенные люксолом прочным синим образцы спинного мозга больных животных, обработанных

соединением J в дозе 6 мг/кг, обработанных PBS и мышей с дефицитом C3<sup>-</sup>, как показано на фигуре 30. Животные с MOG-индуцированным EAE, обработанные соединением J, продемонстрировали снижение демиелинизации и предупреждение инфильтрации иммунными клетками, подобные уровням, наблюдаемым у мышей с MOD-индуцированным EAE, характеризующихся дефицитом C3.

Подобные результаты наблюдали в модели индуцированного протеолипидным белком (PLP) EAE. Обработка с помощью siRNA для C3 снижала тяжесть заболевания, но недостаточно для предупреждения рецидива, характерной черты данной животной модели.

#### **Пример 12. Исследование абсорбции, распределения, метаболизма и экскреции (ADME) у мышей**

Исследование фармакокинетики и биораспределения проводили на самцах мышей CD-1, которым вводили PBS (n=18) или 3, 10 или 100 мг/кг соединения A путем однократной подкожной (SC) инъекции (n=39/когорты) или 3 мг/кг путем однократной внутривенной (IV) инъекции (n=36). Биологическая доступность составляла примерно 18%, основываясь на сравнении значений  $AUC_{last}$  после вводимой IV относительно вводимой SC дозы, составляющей 3 мг/кг. Однако, показатели воздействия в печени у когорты с введением 3 мг/кг IV и SC были сходными. Воздействие в плазме крови в случае группы с введением 10 мг/кг по сравнению с группой с введением дозы, составляющей 3 мг/кг, возрастало, в целом, дозопропорциональным образом, а в группе с введением 100 мг/кг более чем дозопропорциональным образом. Воздействие в печени, основываясь на  $C_{max}$  и  $AUC_{last}$ , увеличивалось примерно дозозависимым образом при введении 10 мг/кг и менее чем дозопропорциональным образом при введении 100 мг/кг по сравнению с группой с введением дозы, составляющей 3 мг/кг, что указывает на насыщение процесса распределения в печени. Период полувыведения в печени варьировался от 2,1 до 4 дней.

#### **Пример 13. Активация тромбоцитов соединением A**

Оценка активации тромбоцитов в цельной крови человека при стимулировании соединением A не показало активации тромбоцитов. Образцы цельной крови (5 доноров-мужчин и 5 доноров-женщин) стимулировали PBS или соединением A в дозировке 10, 100, 200 или 300 мкг/мл.

#### **Пример 14. Переносимость соединения A яванскими макаками**

Переносимость вводимой дозы соединения A оценивали в исследовании на интактных самцах и самках яванских макаков. Животным вводили SC-дозы фосфатно-солевого буфера (PBS), n=12) или соединения A при уровнях дозы, составляющих 1,5 мг/кг (низкий) или 3 мг/кг (высокий), в день 0 (n=6/когорты), а в день 21 проводили процедуры биопсии печени для определения уровня нокдауна C3 в печени. Основываясь на данном анализе, уровни вводимой дозы в дни 28, 56 и 84 были установлены на уровне 3 мг/кг (в качестве низкой дозы) или 6 мг/кг (в качестве высокой дозы) с целью осуществления попытки приблизительного достижения 75% и 90% нокдауна мРНК C3 соответственно. Забор образцов крови осуществляли в дни -21, -7, -3, 0, 28, 56 и 112 и проводили вирусные, бактериальные и паразитарные исследования с тестированием в общей сложности на 28



патогенов до начала исследования, в день 56 и при некропии с помощью серологических исследований и PCR крови или фекалий с целью отслеживания возможной реактивации латентных вирусов и/или инфекций. Терминальную некропию для оценки клиническим патологом проводили с целью выявления возможных признаков инфекции. Также проводили промежуточное измерение уровней циркулирующего белка СЗ в сыворотке крови, наряду с СВС, анализом свертываемости, клиническим биохимическим анализом и анализом мочи. По достижении дня 49 после введения дозы, осуществляемого либо при низких, либо при высоких дозах соединения А, достигался нокдаун мРНК СЗ в печени на примерно 75 или 80% соответственно, сопровождаемый примерно 80% снижением уровней циркулирующего белка СЗ. Данные случаи снижения уровней мРНК СЗ в печени и белка СЗ сохранялись на протяжении всех временных точек, оцениваемых вплоть до дня 112, когда исследование было завершено. При некропии не наблюдалось крупных или микроскопических отклонений, также не было внеплановой смертности. Продолжительное введение соединения А не оказывало влияния на вес тела, функциональные тесты печени, количества клеток крови, результаты биохимических анализов крови и параметры липидного метаболизма, а также не наблюдалось признаков усиления патогенных паразитических, бактериальных или вирусных инфекций у обработанных обезьян по сравнению с когортой, предусматривающей введение доз PBS.

#### **Пример 15. Переносимость соединения J у мышей CD-1 и NZB/W F1**

Переносимость продолжительного введения дозы соединения J оценивали на мышах CD-1 и NZB/W F1. Мышам CD-1 вводили в общей сложности 4 ежемесячных SC-дозы PBS или соединения J (1 или 100 мг/кг), спустя один месяц после последней дозы их умерщвляли и проводилось исследование патологом в слепом режиме на признаки вирусной или бактериальной инфекции и гистологических изменений. Ассоциированные с лечением гистопатологические изменения или повышенный уровень инфицирования не были выявлены. Сходным образом мышам NZB/W F1 вводили 1 или 6 мг/кг соединения J один раз в 4 недели с возраста 28 недель до возраста 40 недель с конечным умерщвлением в возрасте 44 недель либо с возраста 24 недель до возраста 36 недель с конечным умерщвлением в возрасте 40 недель. Серологические исследования и тестирование с помощью PCR в отношении вирусной панели, бактериальных патогенов и паразитов не выявили признаков повышения уровня инфекции, а результаты процедур терминальной некропии по окончании эксперимента, проведенных ветеринарным патологом в слепом режиме по отношению к группам с обработкой, не выявили каких-либо ассоциированных с лечением изменений.

#### **Пример 16. Исследование фармакологической безопасности соединения А на яванских макаках**

Соединение А оценивали на фармакологическую безопасность при подкожном введении яванским макакам. Четирем животным вводили PBS или возрастающие однократные дозы соединения А (при уровнях дозы, составляющих 30, 100 и 300 мг/кг) один раз в 7 дней, при этом в каждом случае введения дозы использовали тех же самых

четырёх животных. Во время данного исследования проводили изучение фармакологической безопасности, включая оценку сердечно-сосудистых (например, ECG, кровяное давление, частота сердечных сокращений и т. д.), респираторных (частота дыхания) и неврологических (набор функциональных наблюдательных тестов) конечных точек, а также процедуры оценки клинических показателей. При любом уровне дозы не наблюдалось сердечно-сосудистых или респираторных эффектов. При дозе соединения А, составляющей 30 или 100 мг/кг, не наблюдалось неврологических эффектов. При 300 мг/кг у 3 животных были отмечены клинические проявления в виде случаев тремора от незначительной до умеренной степени (затрагивающего конечности или все тело) через 4 и 24 часа после введения дозы. Результаты неврологических наблюдений при дозе 300 мг/кг были сочтены нежелательными. Следовательно, 100 мг/кг определены как уровень, не приводящий к возникновению наблюдаемых нежелательных эффектов (NOAEL). Кроме этого, процедуры оценки генотоксичности, которые включали анализ микроядер *in vitro* и анализ обратных мутаций у бактерий *in vitro*, характеризовались отрицательным результатом в отношении индуцирования микроядер и в отношении мутагенной активности соответственно.

#### **Пример 17. Исследование PK/PD соединения А на яванских макаках**

Исследование PK/PD однократной дозы проводили на яванских макаках. Животные получали SC-дозу PBS (контроль) или однократную SC- или IV-дозу соединения А, составляющую 3 мг/кг, в день 0 (n=5/группа). Оценивали концентрации соединения А в плазме крови, моче и тканях. Процедуры биопсии печени проводили в дни 2, 35, 70, 112, 158 и 252 для оценки уровней mRNA C3 в печени (основной фармакодинамический маркер). Уровни циркулирующего белка C3 и функциональная активность системы комплемента являлись дополнительными маркерами PD, которые оценивались в ходе проведения исследования.

Концентрации соединения А определяли в плазме крови, печени и моче с применением сертифицированного способа анионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии на основе гибридизации с флуоресцентной детекцией (AEX-HPLC-FD). Снижение экспрессии mRNA компонента 3 системы комплемента (C3) в печени обезьян измеряли посредством количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (RT-qPCR). Белок C3 в сыворотке крови обезьян измеряли с применением ELISA, а функциональную активность системы комплемента (классический путь, путь с участием маннозосвязывающего лектина (MBL) и альтернативный путь) измеряли посредством анализа WIESLAB®.

Концентрации соединения А в плазме крови с течением времени использовали для определения некомпартментного профиля PK для отдельных животных (среднее значение для группы нанесено на график на фигуре 32А). Диапазон  $T_{max}$  для плазмы крови после SC-введения составлял от 1 до 6 часов, а  $T_{max}$  для IV-введения составлял 0,25 часа (первая зафиксированная временная точка) для всех животных. Концентрации соединения А в плазме крови снижались двухфазно, при этом для SC-пути введения наблюдалась более

медленная фаза распределения по сравнению с IV-путем. Двухфазное снижение свидетельствует о первоначальной быстрой фазе распределения, главным образом в печени, с последующей более медленной фазой выведения. Значения периода полувыведения из плазмы крови регистрировали у 1 животного из 5 в группе с SC-введением (2,51 часа) и у 2 животных из 5 в группе с IV-введением (среднее значение=1,21 часа). Значения периода полувыведения для остальных животных не регистрировали, так как не были соблюдены критерии допустимости для константы скорости заключительной фазы. Биологическая доступность соединения А составляла примерно 28,5% для SC-дозы относительно IV-дозы, основываясь на  $AUC_{last}$ .

Концентрации соединения А в печени с течением времени использовали для генерирования некомпартментного профиля РК для отдельных животных (среднее значение для группы показано на фигуре 32В). Значения периода полувыведения в печени рассчитывали для всех 5 животных в обеих группах с SC-введением и IV-введением, и они варьировались в диапазоне от 13 до 20 дней и от 20 до 33 дней соответственно.

Использовали общее количество соединения А, выделяемого каждым животным с мочой в течение каждого временного интервала ее сбора, для расчета общего количества выведенного лекарственного средства и % выведенного лекарственного средства. Средний уровень выведения с мочой соединения А составлял 4,3% и 4,8% для групп с SC-введением и IV-введением соответственно.

После однократного SC- или IV-введения соединения А в дозе 3 мг/кг наблюдалось снижение экспрессии мРНК *C3* в печени обезьян в день 2 (только при SC-введении), и максимальных значений оно достигало (примерно 70% для обоих путей введения дозы) в день 35 после введения дозы (фигура 33). Наблюдали постепенное восстановление экспрессии мРНК *C3* с течением времени с возвратом к уровням, близким к исходным значениям, по достижении дня 114. Данное восстановление сохранялось вплоть до дня 252 при обоих путях введения.

После однократного SC-введения соединения А в количестве 3 мг/кг наблюдали снижение уровня белка *C3* в сыворотке крови в период от дня 7 до дня 70 (фигура 34). Максимальные средние уровни белка *C3* в сыворотке крови снижались на 54,7% через 28 дней после введения дозы и возвращались к уровням до введения дозы по достижении дня 168. Относительно контроля не наблюдали снижения уровней белка *C3* в сыворотке крови животных, которым вводили однократную IV-дозу соединения А, составляющую 3 мг/кг.

В группе либо с SC-введением, либо с IV-введением не наблюдали какого-либо эффекта в отношении классического пути активации системы комплемента относительно контролей (фигура 35). Наблюдали пониженную функциональность лектинового и альтернативного путей в группе с SC-введением относительно контролей в дни 14, 28 и 35. Наблюдали минимальное снижение функциональности лектинового пути (примерно 13%) во все три дня (фигура 36), при этом функциональность альтернативного пути снижалась на 87%, 85% и 73% в дни 14, 28 и 35 (фигура 37) соответственно. Происходило возвращение функциональности к исходным уровням по достижении дня 70 для лектинового пути и по

достижении дня 168 для альтернативного пути.

После однократного SC-введения соединения А в дозе 3 мг/кг имело место максимальное снижение уровня mRNA на 70% в день 35, имело место максимальное снижение уровня белка С3 на 54,7% в день 28, а также имело место максимальное снижение активности альтернативного пути на  $\geq 87\%$  в день 14. Происходило восстановление экспрессии mRNA до исходных уровней по достижении дня 168, возвращение экспрессии белка С3 до исходного уровня по достижении дня 28, а также имело место восстановление функциональности альтернативного пути по достижении дня 168.

#### **Пример 18. Токсикологические исследования на мышах CD-1 и яванских макаках**

Проводили 6-месячное токсикологическое исследование на мышах и 9-месячное токсикологическое исследование на яванских макаках. Диапазоны величины дозы в данных исследованиях выбирали таким образом, чтобы достичь воздействия, по меньшей мере 10-кратно превышающего ожидаемый уровень воздействия самой высокой предусматриваемой клинической дозы.

В исследовании на мышах оценивали потенциальную токсичность повторного (каждые 4 недели; 7 доз) SC-введения дозы PBS или соединения А (30, 100 или 300 мг/кг) мышам CD-1 и потенциальную обратимость любых результатов после 8-недельного восстановительного периода. Десять самцов и 10 самок мышей на дозовую когорту оценивали во время части исследования, предусматривающей введение дозы, и 6 самцов и 6 самок содержали во время фазы восстановления. Кроме того, в дополнительном исследовании определяли токсикокинетические характеристики соединения А (n=111). Была установлена хорошая переносимость соединения А вводимого при уровнях дозы, составляющих 30, 100 и 300 мг/кг, при отсутствии связанных с соединением А смертности или нежелательных результатов. Результаты клинической патологической оценки включали минимально повышенный уровень аланинаминотрансферазы и минимально сниженный уровень триглицеридов в день 171 с полной или частичной обратимостью, очевидной в конце периода восстановления. Присутствовали связанные с соединением А не относящиеся к нежелательным наблюдения, выявленные посредством микроскопических исследований, включающие минимальное или легкое смешанное воспаление клеток печени, гепатоцеллюлярную кариоцитомегалию, повышенные уровни митоза и гиперплазию овальных клеток при эвтаназии после завершения исследований, при этом при эвтаназии после периода восстановления все еще присутствовали минимально или умеренно повышенные уровни митоза и гепатоцеллюлярная кариоцитомегалия. На основе данных результатов значение NOAEL определили как равное 300 мг/кг, что соответствовало средним значениям  $AUC_{last}$ , составляющим 760000 и 543000 ч\*нг/мл, и средним значениям  $C_{max}$ , составляющим 160000 и 96400 нг/мл, для самцов и самок соответственно в день 169.

В исследовании на обезьянах оценивали потенциальную токсичность повторного SC-введения (0, 30, 100, 300 мг/кг каждые 4 недели при общем количестве 10 доз) доз

соединения А и обратимость, персистирование или отсроченное возникновение любых эффектов после 8-недельного периода восстановления. Четырех самцов и 4 самки обезьян включали в каждую дозовую когорту в основном исследовании с введением дозы и 2 самцов и 2 самок включали в 2-месячный период восстановления. Кроме того, определяли токсикокинетические и PD-характеристики соединения А. Установили хорошую переносимость повторного SC-введения соединения А яванским макакам в течение 9 месяцев. Повторное введение дозы соединения А не вызывало каких-либо изменений, связанных с тестируемым изделием, применительно ко следующим параметрам: клинические наблюдения, результаты неврологического обследования, результаты офтальмологического обследования, значения веса тела, качественные показатели потребления пищи, гематологические показатели, показатели клинической биохимии, показатели анализа мочи, цитокины (т. е. MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1RA, G-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  и IP-1), факторы комплемента Bb и C3a, грубая патология или значения веса органов во время фазы введения дозы в рамках исследования. Кроме того, во время данного исследования не фиксировали преждевременной смертности, и все животные доживали до плановой некропсии. При количестве  $\geq 100$  мг/кг/доза наблюдались случаи не относящегося к нежелательному повышению уровня фибриногена, связанного с соединением А. При количестве  $\geq 30$  мг/кг/доза наблюдались не относящиеся к нежелательным микроскопические отклонения (вакуолизированные/гранулярные макрофаги) в печени, а также в нескольких других тканях. На основании наблюдаемых результатов определили значение NOAEL как равное 300 мг/кг/доза, что соответствовало значению  $AUC_{last}$  1330000 ч\*нг/мл и значению  $C_{max}$  70900 нг/мл (самцы и самки в совокупности, день 253).

Процедуры оценки генотоксичности, которые включали анализ микроядер *in vitro* и анализ обратных мутаций у бактерий *in vitro*, характеризовались отрицательным результатом в отношении мутагенной активности и в отношении индуцирования микроядер соответственно.

На основе общей совокупности данных значение NOAEL определили как равное 300 мг/кг. Неврологические клинические признаки (например, тремор), которые обнаружили в исследовании с еженедельно увеличивающимися дозами, не обнаружили в 9-месячном токсикологическом исследовании на обезьянах с ежемесячным введением доз.

#### **Пример 19. Эффект соединения В в отношении экспрессии С3 у яванских макаков, являющихся моделью AMR**

Фармакологическое исследование проводили на четырех сенсibilизированных яванских макаках с почечными аллотрансплантатами. В данном исследовании животным вводили SC-дозу соединения В один раз в 4 недели в общей сложности на протяжении 4 месяцев.

#### **Пример 20. Исследование диапазона доз с участием людей**

Исследование однократной возрастающей дозы (SAD) с участием здоровых добровольцев в сочетании с когортой многократных возрастающих доз (MAD) с участием пациентов с заболеваниями, индуцированными системой комплемента, проводили в

качестве клинического исследования, впервые проводимого с участием людей (ФИН). Перед получением соединения А здоровые добровольцы и пациенты получали профилактическую вакцинацию против *Neisseria meningitidis* типов А, С, W, Y и B, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* B типа.

#### **Пример 21. Лечение рассеянного склероза с помощью соединения А у людей**

Лечение субъекта, страдающего рассеянным склерозом, осуществляют с помощью фармацевтической композиции, содержащей соединение А (например, при дозе, предусматривающей количество, составляющее 0,01 мг/кг - 50 мг/кг веса тела субъекта). Композицию вводили субъекту с частотой приблизительно один раз в неделю, например, путем подкожной инъекции, на протяжении периода приблизительно 12 месяцев или дольше (например, до устранения или стабилизации симптомов). Примерно один раз в месяц лечащий врач оценивал симптомы и уровни СЗ в сыворотке крови у субъектов для оценивания эффективности соединения А. Уровень СЗ в сыворотке крови у субъекта количественно определяли с использованием образца сыворотки крови и его величину можно сравнивать с количеством белка СЗ, обнаруженном в сыворотке крови субъекта до введения соединения А, или с контрольным количеством белка СЗ, или с количеством белка СЗ, имеющимся в образце сыворотки крови нормального субъекта (например, субъекта, у которого не имеется заболевания). Лечение с помощью соединения А определяли как эффективное в случае, если количество белка СЗ в сыворотке крови снижалось, т. е. по меньшей мере на 10%, по сравнению с количеством белка СЗ в сыворотке крови до лечения соединением А. Кроме того, лечащий врач может проводить оценку симптомов субъекта, ассоциированных с рассеянным склерозом, таких как нечеткое зрение, невнятная речь, головокружение, покалывание, отсутствие координации и неустойчивая походка, для оценки того, имеется ли уменьшение какого-либо или всех симптомов, которые наблюдаются у субъекта, по сравнению с симптомами, наблюдавшимися у субъекта до введения соединения А, и/или по сравнению с контрольным субъектом, получавшим плацебо.

#### **Пример 22. Лечение артрита с помощью соединения А у человека**

Субъекта с диагностированным артритом лечили фармацевтическим соединением, содержащим соединение А (например, в дозе приблизительно 1,5 мг/кг). Композицию вводили субъекту с частотой приблизительно один раз в месяц, например, путем подкожной инъекции, на протяжении периода приблизительно 6 месяцев или дольше (например, до устранения или стабилизации симптомов). Осмотр субъекта осуществлялся лечащим врачом каждые один или два месяца (например, посредством оценивания симптомов и/или уровней сывороточного СЗ субъекта) с целью оценки эффективности соединения А. Сывороточный СЗ субъекта количественно определяют, используя образец сыворотки крови от субъекта, и результаты сравнивают с количеством белка СЗ, обнаруженном в сыворотке крови субъекта до введения соединения А или относительно контрольного количества белка СЗ, или с количеством белка СЗ, имеющимся в образце сыворотки крови от нормального субъекта (например, субъекта, у которого не имеется заболевания), и/или

сравнивают с количеством белка С3, имеющимся в образце сыворотки крови пациента, получавшего лечение с помощью плацебо. Лечение с помощью соединения А определяли как эффективное, если количество белка С3 в сыворотке крови снижалось на по меньшей мере 10% по сравнению с количеством белка С3 в сыворотке крови до лечения с помощью соединения А. Кроме того, лечащий врач может оценить симптомы субъекта, ассоциированные с артритом, включая боль, скованность, опухание, покраснение и ограниченный диапазон движений, для определения того, имеется ли уменьшение какого-либо или всех симптомов, которые наблюдаются у субъекта, по сравнению с симптомами, наблюдавшимися у субъекта до введения соединения.

### **Пример 23. Анализы для оценки С3**

Для определения характеристик эффекта соединения А в отношении уровней С3 могут применяться различные анализы, описанные в данном документе, включающие оценку содержания соединения А в плазме крови или в ткани, анализы функциональной активности системы комплемента WIESLAB<sup>®</sup>, оценку уровней циркулирующего С3, экспрессии mRNA С3 и фармакокинетические анализы.

#### *Фармакокинетические анализы соединения А*

Измеряли концентрации соединения А или соединения J в плазме крови мышей и обезьян. Образцы плазмы крови (холостые, неизвестные, стандартные и QC-образцы) подвергали ферментативной обработке с последующей гибридизацией с зондом на основе пептидной нуклеиновой кислоты (PNA), последовательность которого комплементарна антисмысловой нити соединения А или соединения J. Образцы вводят в систему высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), оснащенную детектором флуоресценции. Хроматографическое разделение проводили с использованием градиентной системы на системах Shimadzu Prominence с использованием аналитических колонок DNAPAC<sup>™</sup> RA200. Флуоресцентный детектор регистрировал сигналы в диапазоне от 436 нм (возбужд.) до 484 нм (испуск.). Для проверки времени удерживания метаболитов получали и вводили эталонные образцы от индивидуумов и смеси. Успешно разделяли пики соединения А и его ожидаемых метаболитов. Количественное определение соединения А или соединения J в плазме крови обезьян или мышей соответственно проводили с применением линейной регрессии. Данный анализ применяли, например, в примерах 6, 12 и 17, как описано выше.

#### *Анализ функциональной активности системы комплемента (CCP, CAP, CLP) WIESLAB<sup>®</sup>*

Формы активности классического пути активации системы комплемента (CCP), CAP и лектинового пути активации системы комплемента оценивали с применением скринингового анализа системы комплемента WIESLAB<sup>®</sup> с применением меченых антител, специфичных по отношению к неоантигену, с целью обнаружения терминального комплекса комплемента человека (C5b-9), образовавшегося в результате активации системы комплемента. Данный анализ также способен обеспечивать обнаружение C5b-9 яванских макаков. Количество образовавшегося неоантигена являлось пропорциональным

уровню функциональной активности отдельных путей активации. Лунки микротитровальных стрипов системы анализа покрывали специфическими активаторами классического, или альтернативного, или лектинового путей. Образцы сыворотки крови обезьян разбавляли разбавителем, содержащим блокатор, гарантирующий активацию только соответствующего пути. Лунки промывали и проводили обнаружение C5b-9 с помощью специфического меченного щелочной фосфатазой антитела к экспрессируемому неоантигену. Степень активации системы комплемента коррелировала с интенсивностью окрашивания, измеренной по поглощению при 405 нм. Значение для положительного контроля, представленного в наборе для тестирования, определяли как 100% активацию системы комплемента. Все измеренные значения выражали в виде процентной (%) активности системы комплемента, определяемой следующим образом:

$$\left[ \frac{\text{образец} - \text{отрицательный контроль}}{\text{положительный контроль} - \text{отрицательный контроль}} \right] * 100.$$

Данный анализ применяли, например, в приведенном выше примере 17.

#### ***Уровень циркулирующего белка C3***

Оценку уровней циркулирующего белка C3 у яванских макаков проводили с применением набора для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) на фактор C3 системы комплемента человека (кат. № Ab108823, Abcam, Cambridge, Великобритания), разработанного для количественного измерения концентраций фактора C3 системы комплемента в сыворотке крови человека. Поскольку имеет место перекрестная реактивность с C3 обезьяны, данный набор также применяли для обнаружения белка C3 в образцах сыворотки крови яванских макаков. 96-луночные планшеты предварительно покрывали специфическими антителами к фактору C3 системы комплемента и блокировали. Стандарты или тестируемые образцы добавляли в лунки, а затем добавляли специфичное по отношению к фактору C3 системы комплемента биотинилированное детектирующее антитело с последующим добавлением промывочного буфера. Добавляли стрептавидин-пероксидазный конъюгат и удаляли несвязанные конъюгаты с помощью промывочного буфера. Для визуализации стрептавидин-пероксидазной ферментативной реакции использовали тетраметилбензидин (ТМВ). ТМВ окислялся стрептавидин-пероксидазой с образованием продукта, имеющего синюю окраску, которая изменяется на желтую после добавления кислотного стоп-раствора. Оптическая плотность желтого окрашивания была прямо пропорциональна количеству фактора C3 системы комплемента, захваченного в планшете. Концентрацию в образцах, рассчитанную путем обратных вычислений, определяли с помощью программы для регрессионного анализа с аппроксимацией кривой, построенной по калибровочным стандартам. Данный анализ применяли, например, в приведенных выше примерах 14 и 17.

#### ***Уровни экспрессии mRNA C3***

Оценку экспрессии mRNA C3 проводили в образцах печени яванских макаков с применением мультиплексного относительного количественного анализа ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. mRNA выделяли из замороженной ткани печени с



последующими количественным определением mRNA и транскрипцией в комплементарную ДНК (сDNA). сDNA применяли в качестве матрицы для реакции qPCR для измерения уровней mRNA С3 с нормализацией по пептидил-пролил-цис/транс-изомеразе В (PPIB). Степень присутствия mRNA С3 в обработанных группах рассчитывали как процентное значение уровня экспрессии (нормализованного по уровням mRNA PPIB) относительно необработанной группы или значений для группы до введения препарата, где уровень экспрессии mRNA С3 в контрольной группе принимали за 100%.

#### ***Фармакокинетические анализы***

Концентрации соединения А в плазме крови человека измеряют с применением аналитического метода HPLC-FD. Образцы плазмы крови (холостые, неизвестные, стандартные образцы и образцы для контроля качества [QC]) подвергают ферментативной обработке протеиназой К с последующей гибридизацией с зондом на основе PNA, последовательность которого являлась комплементарной антисмысловой нити соединения А. Образцы вводят в систему HPLC, оснащенную детектором флуоресценции. Хроматографическое разделение проводят с использованием градиентной системы на системах Shimadzu Prominence с использованием аналитических колонок DNAPAC™ PA200. Флуоресцентный детектор регистрирует сигналы в диапазоне от 436 нм (возбужд.) до 484 нм (испуск.). Условия градиента LC корректируют и определяют на основе времени удерживания потенциальных метаболитов соединения А. Для оценки времени удерживания метаболитов получают и вводят эталонные образцы от индивидуумов и смеси. Пики соединения А и метаболитов разделяют. Количественное определение соединения А в плазме крови человека проводят с использованием линейной регрессии.

#### ***Анализ на антитела к лекарственному средству***

Анализ на антитела к лекарственному средству (ADA) для соединения А в сыворотке крови человека находится на стадии разработки, и его проведение планируется с применением мостикового электрохемилюминесцентного (ECL) анализа. Положительные контроли (PC) получают с использованием кроликов, иммунизированных против иммуногенного коктейля, состоящего из соединения А, конъюгированного с гемоцианином фисуреллы (KLH), и олигонуклеотидов различной длины, конъюгированных с KLH, соответствующих модифицированным последовательностям соединения А. PC, отрицательные контроли (NC) и исследуемые образцы будут подвергать стадии кислотной диссоциации при комнатной температуре, затем будут осуществлять их добавление в планшет, содержащий TRIS, биотин-соединение А и меченное рутением соединение А, что позволит произойти образованию мостиковых комплексов между меченым соединением А и антителами к соединению А, присутствующими в образце. После инкубации NC, PC и исследуемые образцы перенесут в покрытый стрептавидином планшет и будут инкубировать в темноте в течение 1 часа, во время чего лекарственное средство связывается с планшетом, захватывая мостиковый комплекс ADA. Затем предусматривается промывка планшета и добавление в него буфера для считывания Meso Scale Discovery® (MSD®) с целью создания сигнала ECL, который прямо пропорционален количеству ADA в образце.

Анализ ADA будет валидирован до оценки клинических образцов.

#### Другие варианты осуществления

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая независимая публикация или заявка на патент были специально и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки. Несмотря на то, что в данном документе описаны конкретные варианты осуществления, специалисту в данной области техники будет понятно, что охватываются дополнительные модификации и варианты осуществления, включая вариации, варианты применения или адаптации, в целом следующие описанным в данном документе принципам и включающие такие отклонения от настоящего изобретения, которые относятся к известной или общепринятой практике в данной области техники и могут быть применены к существенным признакам, указанным выше и изложенным в объеме формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль для снижения экспрессии компонента C3 (C3) системы комплемента, при этом олигонуклеотид содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплексную область, где антисмысловая нить содержит область комплементарности с целевой последовательностью mRNA C3 под SEQ ID NO: 13 или 14, и где длина области комплементарности составляет по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов.

2. Олигонуклеотид для RNAi по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина смысловой нити составляет от 15 до 50 нуклеотидов.

3. Олигонуклеотид для RNAi по п. 1 или п. 2 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина смысловой нити составляет от 18 до 36 нуклеотидов.

4. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина антисмысловой нити составляет от 15 до 30 нуклеотидов.

5. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина антисмысловой нити составляет 22 нуклеотида, и где антисмысловая нить и смысловая нить образуют дуплексную область длиной по меньшей мере 19 нуклеотидов, необязательно длиной по меньшей мере 20 нуклеотидов.

6. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-5 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина смысловой нити составляет 36 нуклеотидов, и где антисмысловая нить и смысловая нить образуют дуплексную область длиной по меньшей мере 19 нуклеотидов, необязательно длиной по меньшей мере 20 нуклеотидов.

7. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-6 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина области комплементарности составляет по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, необязательно длина составляет по меньшей мере 20 нуклеотидов.

8. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-7 или его фармацевтически приемлемая соль, где 3'-конец смысловой нити содержит структуру стебель-петля, представленную как S1-L-S2, где S1 комплементарен S2, и где L образует петлю между S1 и S2 длиной 3-5 нуклеотидов.

9. Олигонуклеотид для RNAi по п. 8 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой тройную петлю или четверную петлю.

10. Олигонуклеотид для RNAi по п. 9 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой четверную петлю.

11. Олигонуклеотид для RNAi по п. 10 или его фармацевтически приемлемая соль, где четверная петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 8.

12. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 8-11 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина S1 и S2 составляет 1-10 нуклеотидов, где необязательно S1 и S2 характеризуются одинаковой длиной.

13. Олигонуклеотид для RNAi по п. 12 или его фармацевтически приемлемая соль,

где длина S1 и S2 составляет 1 нуклеотид, 2 нуклеотида, 3 нуклеотида, 4 нуклеотида, 5 нуклеотидов, 6 нуклеотидов, 7 нуклеотидов, 8 нуклеотидов, 9 нуклеотидов или 10 нуклеотидов.

14. Олигонуклеотид для RNAi по п. 13 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина S1 и S2 составляет 6 нуклеотидов.

15. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 8-14 или его фармацевтически приемлемая соль, где область стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 85% идентичностью с SEQ ID NO: 7.

16. Олигонуклеотид для RNAi по п. 15 или его фармацевтически приемлемая соль, где область стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 7.

17. Олигонуклеотид для RNAi по п. 16 или его фармацевтически приемлемая соль, где область стебель-петля содержит SEQ ID NO:7.

18. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 8-16 или его фармацевтически приемлемая соль, где структура стебель-петля содержит нуклеиновую кислоту, содержащую до 1, 2 или 3 замен, вставок или делеций относительно SEQ ID NO: 7.

19. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-17 или его фармацевтически приемлемая соль, где антисмысловая нить содержит последовательность 3'-выступа длиной один или несколько нуклеотидов.

20. Олигонуклеотид для RNAi по п. 19 или его фармацевтически приемлемая соль, где антисмысловая нить содержит 3'-выступ из по меньшей мере 2 связанных нуклеотидов.

21. Олигонуклеотид для RNAi по п. 20 или его фармацевтически приемлемая соль, где длина последовательности 3'-выступа составляет 2 нуклеотида, где необязательно последовательность 3'-выступа представляет собой GG.

22. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-21 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид.

23. Олигонуклеотид для RNAi по п. 22 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид содержит от 20 до 50 модифицированных нуклеотидов.

24. Олигонуклеотид для RNAi по п. 22 или п. 23 или его фармацевтически приемлемая соль, где все нуклеотиды олигонуклеотида являются модифицированными.

25. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 22-24 или его фармацевтически приемлемая соль, где модифицированный нуклеотид содержит 2'-модификацию.

26. Олигонуклеотид для RNAi по п. 25 или его фармацевтически приемлемая соль, где 2'-модификация представляет собой модификацию, выбранную из 2'-аминоэтила, 2'-фтора, 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила и 2'-дезоксидезокси-2'-фтор-β-d-арабинонуклеиновой кислоты.

27. Олигонуклеотид для RNAi по п. 26 или его фармацевтически приемлемая соль, где 2'-модификация представляет собой 2'-фтор или 2'-О-метил, при этом необязательно 2'-фтормодификация представляет собой 2'-фтордезоксидезоксирибонуклеозид, и/или 2'-О-

метилмодификация представляет собой 2'-О-метилрибонуклеозид.

28. Олигонуклеотид для RNAi по п. 27 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид для RNAi содержит от 40 до 50 2'-О-метилмодификаций, где необязательно олигонуклеотид для RNAi содержит от 40 до 50 2'-О-метилрибонуклеозидов.

29. Олигонуклеотид для RNAi по п. 28 или его фармацевтически приемлемая соль, где по меньшей мере один из нуклеотидов 1-7, 11-27 и 31-36 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метила, например, 2'-О-метилрибонуклеозида.

30. Олигонуклеотид для RNAi по п. 29 или его фармацевтически приемлемая соль, где от 10 до 30 нуклеотидов 1-7, 11-27 и 31-36 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метила, например, 2'-О-метилрибонуклеозида.

31. Олигонуклеотид для RNAi по п. 29 или его фармацевтически приемлемая соль, где все из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метила, например, 2'-О-метилрибонуклеозида.

32. Олигонуклеотид для RNAi по п. 29 или его фармацевтически приемлемая соль, где все из нуклеотидов 1, 2, 4-7, 11, 14-16, 18-27 и 31-36 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 1, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18 и 20-22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метила, например, 2'-О-метилрибонуклеозида.

33. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 28-32 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид содержит от 5 до 15 2'-фтормодификаций, например, модификацию с помощью 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

34. Олигонуклеотид для RNAi по п. 28 или его фармацевтически приемлемая соль, где по меньшей мере один из нуклеотидов 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 17 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтора, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

35. Олигонуклеотид для RNAi по п. 34 или его фармацевтически приемлемая соль, где от 2 до 4 из нуклеотидов 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 17 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтора, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

36. Олигонуклеотид для RNAi по п. 34 или его фармацевтически приемлемая соль, где все из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтора, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

37. Олигонуклеотид для RNAi по п. 34 или его фармацевтически приемлемая соль, где все из нуклеотидов 3, 8-10, 12, 13 и 17 смысловой нити и один, или несколько, или все из нуклеотидов 2-5, 7, 8, 10, 12, 14, 16 и 19 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтора, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

38. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-37 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеотидную связь.

39. Олигонуклеотид для RNAi по п. 38 или его фармацевтически приемлемая соль, где по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой фосфоротиоатную связь.

40. Олигонуклеотид для RNAi по п. 39 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид для RNAi содержит фосфоротиоатную связь между нуклеотидами 1 и 2 смысловой нити и нуклеотидами 1 и 2, 2 и 3, 20 и 21 и 21 и 22 антисмысловой нити.

41. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-40 или его фармацевтически приемлемая соль, где межнуклеотидная связь между смысловой нитью и антисмысловой нитью отсутствует.

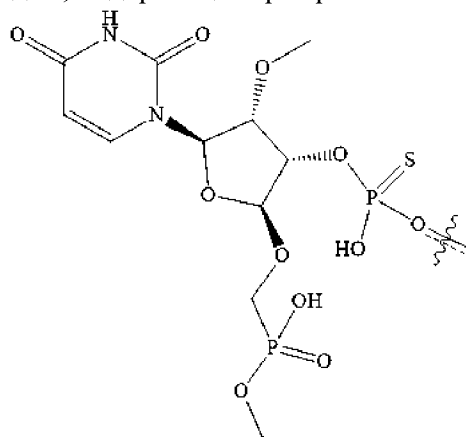
42. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-41 или его фармацевтически приемлемая соль, где 4'-углерод сахара 5'-нуклеотида антисмысловой нити содержит фосфатный аналог.

43. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-41 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид для RNAi содержит уридин в первом положении 5'-конца антисмысловой нити.

44. Олигонуклеотид для RNAi по п. 43 или его фармацевтически приемлемая соль, где уридин содержит фосфатный аналог.

45. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 42-44 или его фармацевтически приемлемая соль, где фосфатный аналог представляет собой 4'-O-монометилфосфонат.

46. Олигонуклеотид для RNAi по п. 44 или его фармацевтически приемлемая соль, где уридин, содержащий фосфатный аналог, характеризуется следующей структурой:



47. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-46 или его фармацевтически приемлемая соль, где по меньшей мере один нуклеотид олигонуклеотида конъюгирован с одним или несколькими нацеливающими лигандами.

48. Олигонуклеотид для RNAi по п. 47 или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый нацеливающий лиганд содержит углевод, аминокислоту, холестерин, полипептид или липид.

49. Олигонуклеотид для RNAi по п. 47 или п. 48 или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый нацеливающий лиганд содержит фрагмент из N-ацетилгалактозамина (GalNAc).

50. Олигонуклеотид для RNAi по п. 49 или его фармацевтически приемлемая соль, где фрагмент GalNAc представляет собой моновалентный фрагмент GalNAc, бивалентный фрагмент GalNAc, тривалентный фрагмент GalNAc или тетравалентный фрагмент GalNAc.

51. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 8-50 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид для RNAi содержит от одного до пяти фрагментов из 2'-O-N-ацетилгалактозамина (GalNAc), конъюгированных со смысловой нитью.

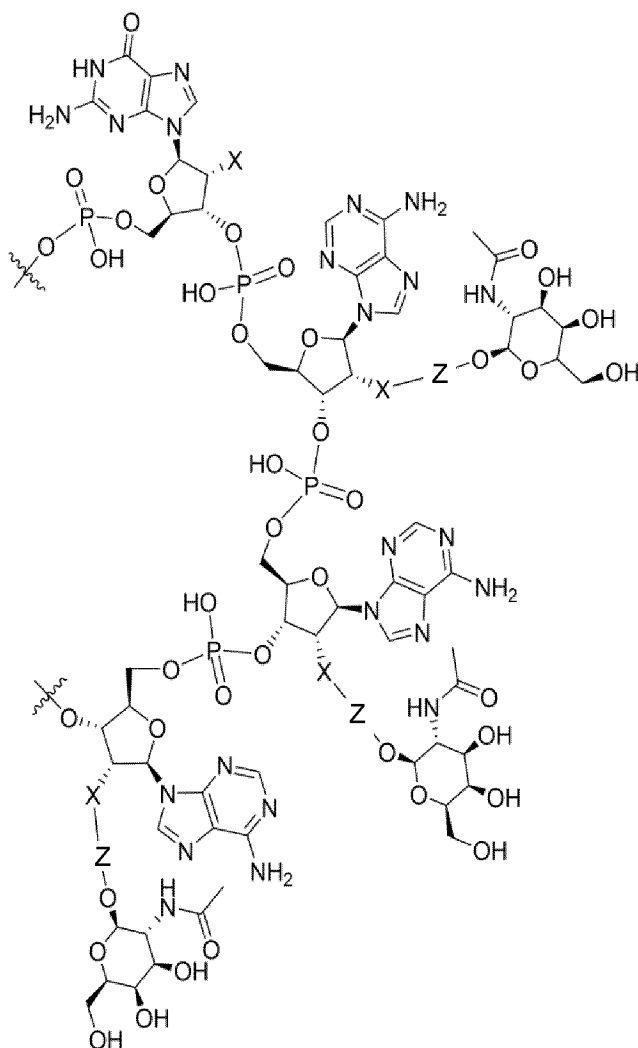
52. Олигонуклеотид для RNAi по п. 51 или его фармацевтически приемлемая соль, где до 4 нуклеотидов L структуры стебель-петля конъюгированы с моновалентным фрагментом GalNAc.

53. Олигонуклеотид для RNAi по п. 52 или его фармацевтически приемлемая соль, где один или несколько нуклеотидов в положениях нуклеотидов 28-30 в смысловой нити конъюгированы с моновалентным фрагментом GalNAc.

54. Олигонуклеотид для RNAi по п. 53 или его фармацевтически приемлемая соль, где каждый из нуклеотидов в положениях 28-30 в смысловой нити конъюгирован с моновалентным фрагментом GalNAc.

55. Олигонуклеотид для RNAi по п. 54 или его фармацевтически приемлемая соль, где нуклеотиды в положениях 28-30 в смысловой нити характеризуются следующей структурой:

где:



*Z* представляет собой связь, группу для обеспечения возможности реакции клик-химии или линкер длиной от 1 до 20 включительно последовательных ковалентно связанных атомов, выбранный из группы, состоящей из замещенного и незамещенного алкилена, замещенного и незамещенного алкенилена, замещенного и незамещенного алкинилена, замещенного и незамещенного гетероалкилена, замещенного и незамещенного гетероалкенилена, замещенного и незамещенного гетероалкинилена и их комбинаций, и

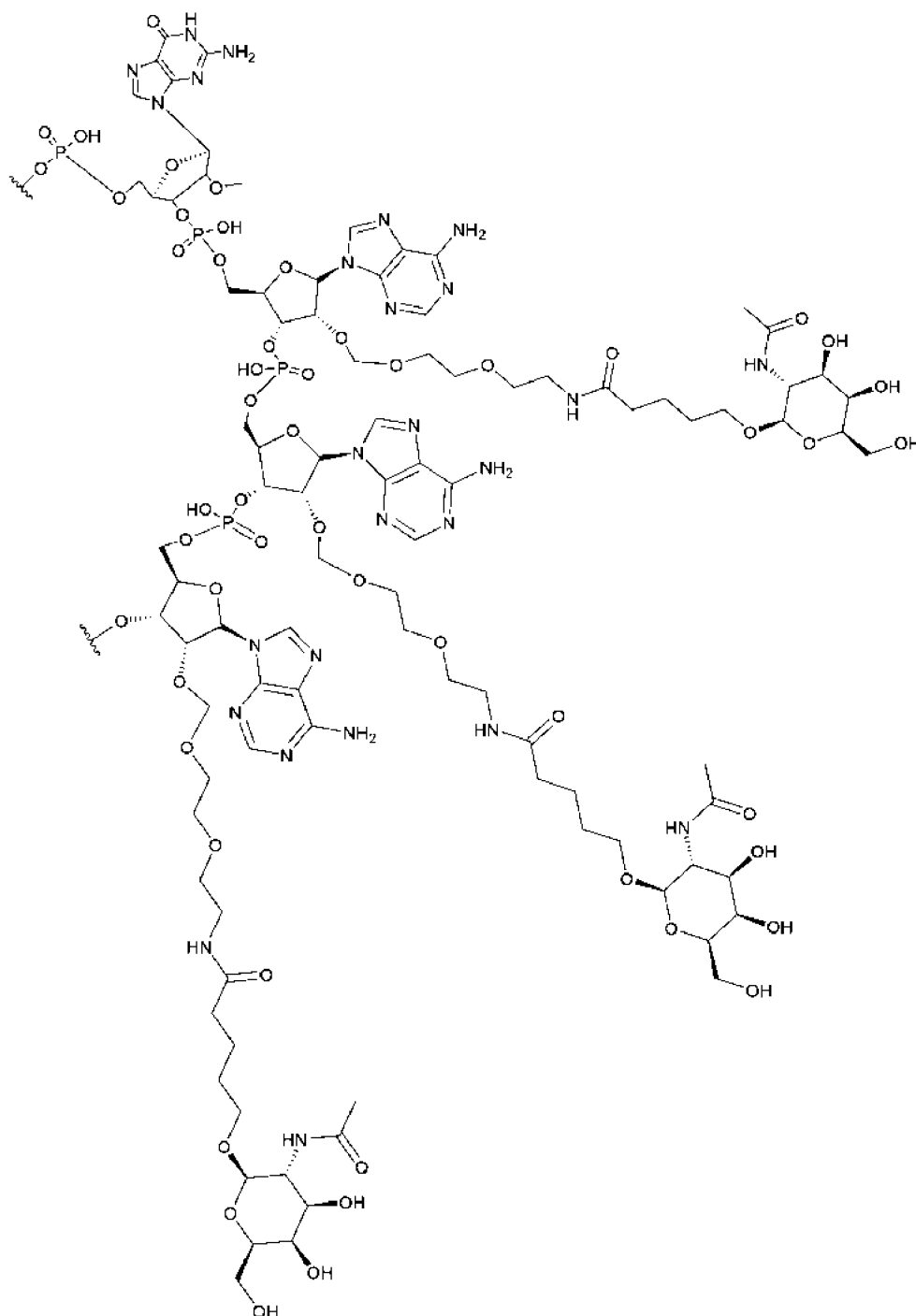
*X* представляет собой O, S или N.

56. Олигонуклеотид для RNAi по п. 55 или его фармацевтически приемлемая соль, где *Z* представляет собой ацетальный линкер.

57. Олигонуклеотид для RNAi по любому из п. 55 или п. 56 или его фармацевтически приемлемая соль, где *X* представляет собой O.

58. Олигонуклеотид для RNAi по п. 54 или его фармацевтически приемлемая соль, где нуклеотиды в положениях 28-30 в смысловой нити характеризуются следующей структурой:





59. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-58 или его фармацевтически приемлемая соль, при этом смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 4.

60. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-59 или его фармацевтически приемлемая соль, где антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 6.

61. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-60 или его фармацевтически приемлемая соль, где смысловая нить и антисмысловые нити содержат нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 1 и 3 соответственно и

(b) SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно.

62. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-60 или его фармацевтически приемлемая соль, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 1, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 3.

63. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-60 или его фармацевтически приемлемая соль, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 6.

64. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-61 или его фармацевтически приемлемая соль, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 37, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 38.

65. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-61 или его фармацевтически приемлемая соль, где смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 39, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 40.

66. Фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

67. Способ лечения заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, включающий приведение клетки субъекта в контакт с олигонуклеотидом для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемой солью или фармацевтической композицией по п. 66.

68. Способ по п. 67, где клетку приводят в контакт в течение периода времени, достаточного для обеспечения деградации mRNA-транскрипта C3.

69. Способ по п. 67 или п. 68, где обеспечивают снижение экспрессии C3 в клетке.

70. Способ по п. 67 или п. 68, где обеспечивают снижение транскрипции C3 в клетке.

71. Способ по п. 67, где обеспечивают снижение уровня и/или активности C3 в клетке.

72. Способ по п. 67, где обеспечивают снижение уровня и/или активности C3 на от 10% до 100% относительно уровня и/или активности C3 в клетке субъекта, которому не вводят олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-65 или фармацевтическую композицию по п. 66.

73. Способ по п. 72, где обеспечивают снижение уровня и/или активности C3 на от 50% до 99% относительно уровня и/или активности C3 в клетке субъекта, которому не вводят олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию по п. 66.

74. Способ по любому из пп. 67-73, где субъект представляет собой млекопитающее.

75. Способ по п. 74, где субъект является человеком.

76. Способ по любому из пп. 67-75, где субъект идентифицирован как имеющий заболевание, нарушение или состояние, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента.

77. Способ по любому из пп. 67-76, где заболевание, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, представляет собой пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), IgA-нефропатию, волчаночный нефрит, С3-гломерулопатию (С3G), дерматомиозит/аутоиммунный миозит, системный склероз, демиелинизирующую полинейропатию, пузырчатку, мембранозную нефропатию, фокально-сегментарный гломерулосклероз (FSGS), буллезный пемфигоид, приобретенный буллезный эпидермолиз (EBA), пемфигоид слизистой оболочки, ANCA-васкулит, уртикарный васкулит с гипокомплементемией, иммуннокомплексный васкулит мелких сосудов, кожный васкулит мелких сосудов, аутоиммунную некротизирующую миопатию, отторжение трансплантированного органа, такое как отторжение трансплантата почки, печени, сердца или легкого, включая антителоопосредованное отторжение (AMR), такое как хроническое AMR (сAMR), антифосфолипидный (aPL) синдром, опосредованный Ab, гломерулонефрит, астму, болезнь плотных отложений (DDD), возрастную макулярную дегенерацию (AMD), системную красную волчанку (SLE), ревматоидный артрит (RA), тяжелый рефрактерный RA, синдром Фелти, рассеянный склероз (MS), травматическое повреждение головного мозга (TBI), повреждение спинного мозга, ишемически-реперфузионное повреждение, преэклампсию, отсроченную функцию трансплантата при остром повреждении почек (DGF-AKI), острое повреждение почек, ассоциированное с сердечно-легочным шунтированием, гипоксически-ишемическую энцефалопатию, тромбоз, вызванный диализом, артериит Такаясу, рецидивирующий полихондрит, острую/профилактическую реакцию "трансплантат против хозяина", хроническую реакцию "трансплантат против хозяина", бета-талассемию, тромботическую микроангиопатию, ассоциированную с трансплантацией стволовых клеток, атрезию желчевыводящих путей, воспалительное заболевание печени, болезнь Бехчета, ишемический инсульт, внутримозговое кровоизлияние, склеродермию, склеродермический почечный криз, интерстициальную болезнь легких, ассоциированную со склеродермией (SSc-ILD), серповидноклеточное заболевание, аутосомно-доминантную поликистозную болезнь почек (ADPKD), периферическую нейропатию, вызванную химиотерапией (CIPN), диабетическую нейропатию, боковой амиотрофический склероз (ALS), диабетическую нефропатию, диабетическую ретинопатию, географическую атрофию, легочную артериальную гипертензию, рефрактерную тяжелую астму, хроническую обструктивную болезнь легких, идиопатический легочный фиброз (IPF), хроническую дисфункцию аллотрансплантата легкого, легочные патологии при кистозном фиброзе, гнойный гидраденит, неалкогольную жировую болезнь печени (NASH), анкилозирующий спондилит, тромботическую микроангиопатию, ассоциированную с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-TMA) (предупреждение), ишемическую болезнь сердца, атеросклероз,

остеопороз (предупреждение), остеоартрит, друзы с высоким риском, воспалительное заболевание кишечника, язвенный колит, интерстициальный цистит, активацию системы комплемента, вызванную диализом, гангренозную пиодермию, хроническую сердечную недостаточность, аутоиммунный миокардит, назальный полипоз, острый и хронический панкреатит, атеросклероз, эозинофильный эзофагит, эозинофильный гранулематоз, гиперэозинофильный синдром, заживление раны и тромботическую тромбоцитопеническую пурпуру (ТТП).

78. Способ по любому из пп. 67-77, где олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция составлены для введения один раз в сутки, один раз в неделю, один раз в месяц или один раз в год.

79. Способ по любому из пп. 67-78, где олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция составлены для внутривенного, подкожного, внутримышечного, перорального, назального, подъязычного, интратекального и интрадермального введения.

80. Способ по п. 79, где олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция составлены для подкожного введения.

81. Способ по любому из пп. 67-80, где олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция составлены для введения в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 150 мг/кг.

82. Способ снижения экспрессии *C3* в клетке, популяции клеток или у субъекта, при этом способ включает стадию:

i) приведения клетки или популяции клеток в контакт с олигонуклеотидом для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемой солью или фармацевтической композицией по п. 66, или

ii) введения субъекту олигонуклеотида для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции по п. 66.

83. Способ по п. 82, где снижение экспрессии *C3* предусматривает снижение количества или уровня mRNA *C3*, количества или уровня белка *C3* или и того и другого.

84. Способ по п. 83, где уровень mRNA *C3*, уровень белка *C3* или и то и другое снижают на от 10% до 100% относительно уровня mRNA *C3*, уровня белка *C3* или и того и другого в клетке субъекта, которому не вводят олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию по п. 66.

85. Способ по п. 83 или п. 84, где уровень mRNA *C3*, уровень белка *C3* или и то и другое снижают на от 50% до 99% относительно уровня mRNA *C3*, уровня белка *C3* или и того и другого в клетке субъекта, которому не вводят олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию по п. 66.

86. Способ по любому из пп. 82-85, где у субъекта имеется заболевание, нарушение или состояние, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути системы

комплемента.

87. Способ по п. 86, где заболевание, нарушение или состояние, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (аHUS), IgA-нефропатии, волчаночного нефрита, С3-гломерулопатии (С3G), дерматомиозита/аутоиммунного миозита, системного склероза, демиелинизирующей полинейропатии, пузырчатки, мембранозной нефропатии, фокально-сегментарного гломерулосклероза (FSGS), буллезного пемфигоида, приобретенного буллезного эпидермолиза (ЕВА), пемфигоида слизистой оболочки, ANCA-васкулита, уртикарного васкулита с гипокомплементемией, иммуннокомплексного васкулита мелких сосудов, кожного васкулита мелких сосудов, аутоиммунной некротизирующей миопатии, отторжения трансплантированного органа, такого как отторжение трансплантата почки, печени, сердца или легкого, включая антителоопосредованное отторжение (AMR), такое как хроническое AMR (сAMR), антифосфолипидного (аPL) синдрома, опосредованного Ab, гломерулонефрита, астмы, болезни плотных отложений (DDD), возрастной макулярной дегенерации (AMD), системной красной волчанки (SLE), ревматоидного артрита (RA), тяжелого рефрактерного RA, синдрома Фелти, рассеянного склероза (MS), травматического повреждения головного мозга (TBI), повреждения спинного мозга, ишемически-реперфузионного повреждения, преэклампсии, отсроченной функции трансплантата при остром повреждении почек (DGF-AKI), острого повреждения почек, ассоциированного с сердечно-легочным шунтированием, гипоксически-ишемической энцефалопатии, тромбоза, вызванного диализом, артериита Такаясу, рецидивирующего полихондрита, острой/профилактической реакции "трансплантат против хозяина", хронической реакции "трансплантат против хозяина", бета-талассемии, тромботической микроангиопатии, ассоциированной с трансплантацией стволовых клеток, атрезии желчевыводящих путей, воспалительного заболевания печени, болезни Бехчета, ишемического инсульта, внутримозгового кровоизлияния, склеродермии, склеродермического почечного криза, интерстициальной болезни легких, ассоциированной со склеродермией (SSc-ILD), серповидноклеточного заболевания, аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек (ADPKD), периферической нейропатии, вызванной химиотерапией (CIPN), диабетической нейропатии, бокового амиотрофического склероза (ALS), диабетической нефропатии, диабетической ретинопатии, географической атрофии, легочной артериальной гипертензии, рефрактерной тяжелой астмы, хронической обструктивной болезни легких, идиопатического легочного фиброза (IPF), хронической дисфункции аллотрансплантата легкого, легочных патологий при кистозном фиброзе, гнойного гидраденита, неалкогольной жировой болезни печени (NASH), анкилозирующего спондилита, тромботической микроангиопатии, ассоциированной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-TMA) (предупреждение), ишемической болезни сердца, атеросклероза, остеопороза (предупреждение), остеоартрита, друз с высоким риском, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, интерстициального цистита,

активации системы комплемента, вызванной диализом, гангренозной пиодермии, хронической сердечной недостаточности, аутоиммунного миокардита, назального полипоза, острого и хронического панкреатита, атеросклероза, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гранулематоза, гиперэозинофильного синдрома, заживления раны и тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП).

88. Набор, содержащий олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-66 или его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию по п. 66.

89. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция по п. 66 для применения в профилактике или лечении заболевания, нарушения или состояния, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути системы комплемента, у субъекта, нуждающегося в этом.

90. Олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция по п. 89 для применения в профилактике или лечении у субъекта, нуждающегося в этом, пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), IgA-нефропатии, волчаночного нефрита, С3-гломерулопатии (С3G), дерматомиозита/аутоиммунного миозита, системного склероза, демиелинизирующей полинейропатии, пузырчатки, мембранозной нефропатии, фокально-сегментарного гломерулосклероза (FSGS), буллезного пемфигоида, приобретенного буллезного эпидермолиза (EBA), пемфигоида слизистой оболочки, ANCA-васкулита, уртикарного васкулита с гипокомплементемией, иммунокомплексного васкулита мелких сосудов, кожного васкулита мелких сосудов, аутоиммунной некротизирующей миопатии, отторжения трансплантированного органа, такого как отторжение трансплантата почки, печени, сердца или легкого, включая антителоопосредованное отторжение (AMR), антифосфолипидного (aPL) синдрома, опосредованного Ab, гломерулонефрита, астмы, болезни плотных отложений (DDD), возрастной макулярной дегенерации (AMD), системной красной волчанки (SLE), ревматоидного артрита (RA), тяжелого рефрактерного RA, синдрома Фелти, рассеянного склероза (MS), травматического повреждения головного мозга (TBI), повреждения спинного мозга, ишемически-реперфузионного повреждения, преэклампсии, отсроченной функции трансплантата при остром повреждении почек (DGF-AKI), острого повреждения почек, ассоциированного с сердечно-легочным шунтированием, гипоксически-ишемической энцефалопатии, тромбоза, вызванного диализом, артериита Такаясу, рецидивирующего полихондрита, острой/профилактической реакции "трансплантат против хозяина", хронической реакции "трансплантат против хозяина", бета-талассемии, тромботической микроангиопатии, ассоциированной с трансплантацией стволовых клеток, атрезии желчевыводящих путей, воспалительного заболевания печени, болезни Бехчета, ишемического инсульта, внутримозгового кровоизлияния, склеродермии, склеродермического почечного криза, интерстициальной болезни легких, ассоциированной со склеродермией (SSc-ILD), серповидноклеточного заболевания, аутосомно-доминантной

поликистозной болезни почек (ADPKD), периферической нейропатии, вызванной химиотерапией (CIPN), диабетической нейропатии, бокового амиотрофического склероза (ALS), диабетической нефропатии, диабетической ретинопатии, географической атрофии, легочной артериальной гипертензии, рефрактерной тяжелой астмы, хронической обструктивной болезни легких, идиопатического легочного фиброза (IPF), хронической дисфункции аллотрансплантата легкого, легочных патологий при кистозном фиброзе, гнойного гидраденита, неалкогольной жировой болезни печени (NASH), анкилозирующего спондилита, тромботической микроангиопатии, ассоциированной с трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (HSCT-TMA) (предупреждение), ишемической болезни сердца, атеросклероза, остеопороза (предупреждение), остеоартрита, друз с высоким риском, воспалительного заболевания кишечника, язвенного колита, интерстициального цистита, активации системы комплемента, вызванной диализом, гангренозной пиодермии, хронической сердечной недостаточности, аутоиммунного миокардита, назального полипоза, острого и хронического панкреатита, атеросклероза, эозинофильного эзофагита, эозинофильного гранулематоза, гиперэозинофильного синдрома, заживления раны и тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП).

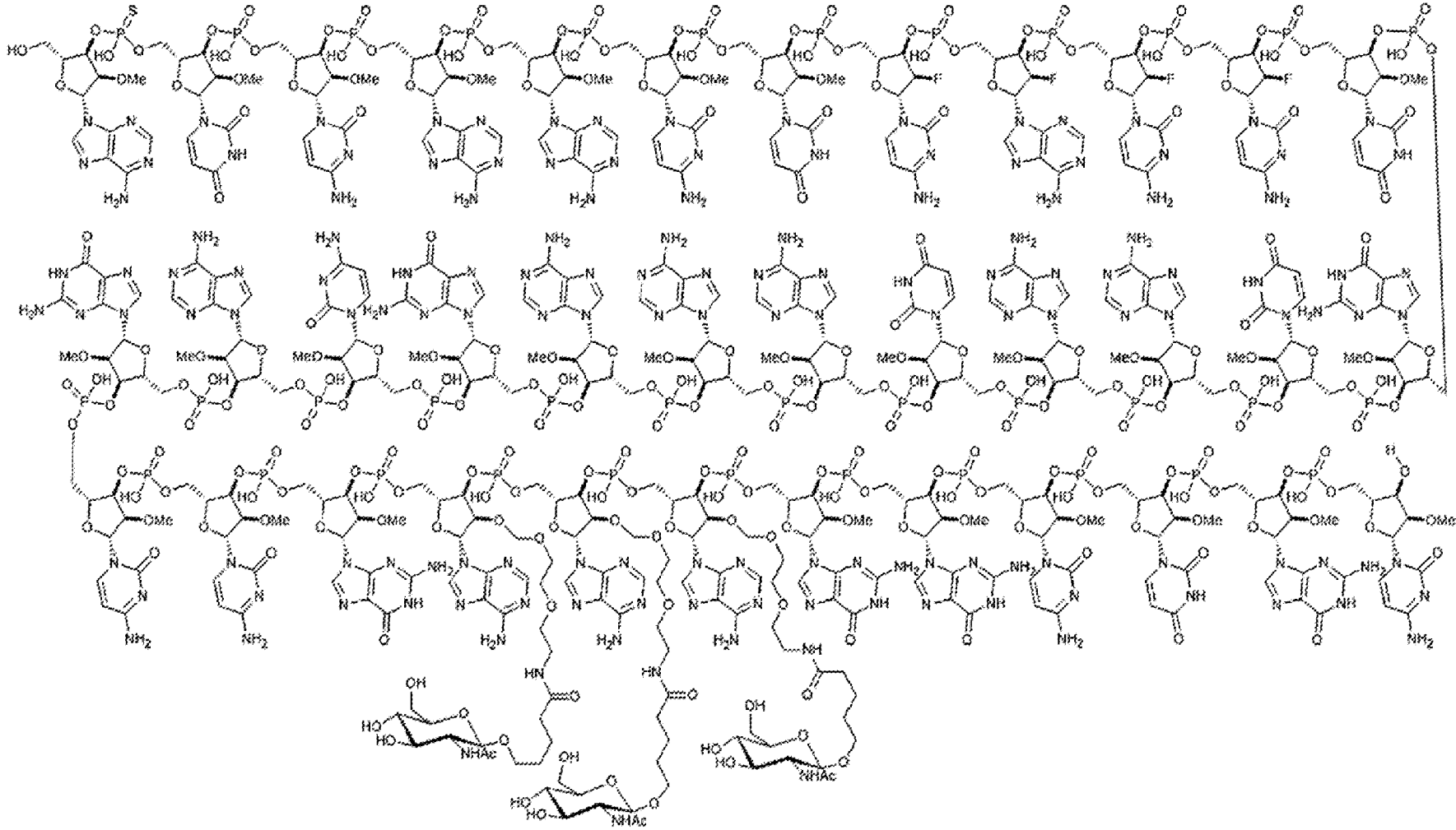
91. Олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция для применения по п. 89 или п. 90, где олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция вводятся подкожно.

92. РНК-олигонуклеотид по любому из пп. 1-66, где РНК-олигонуклеотид предусматривает фармацевтически приемлемую соль.

93. РНК-олигонуклеотид по п. 92, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

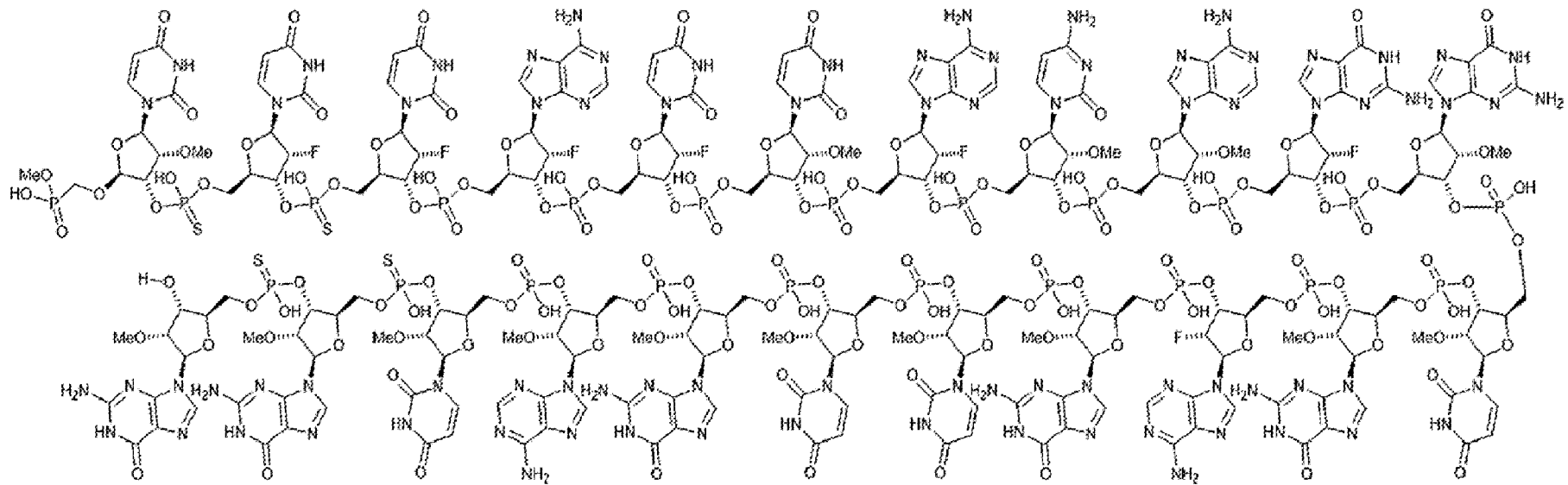
По доверенности

Фиг. 1А

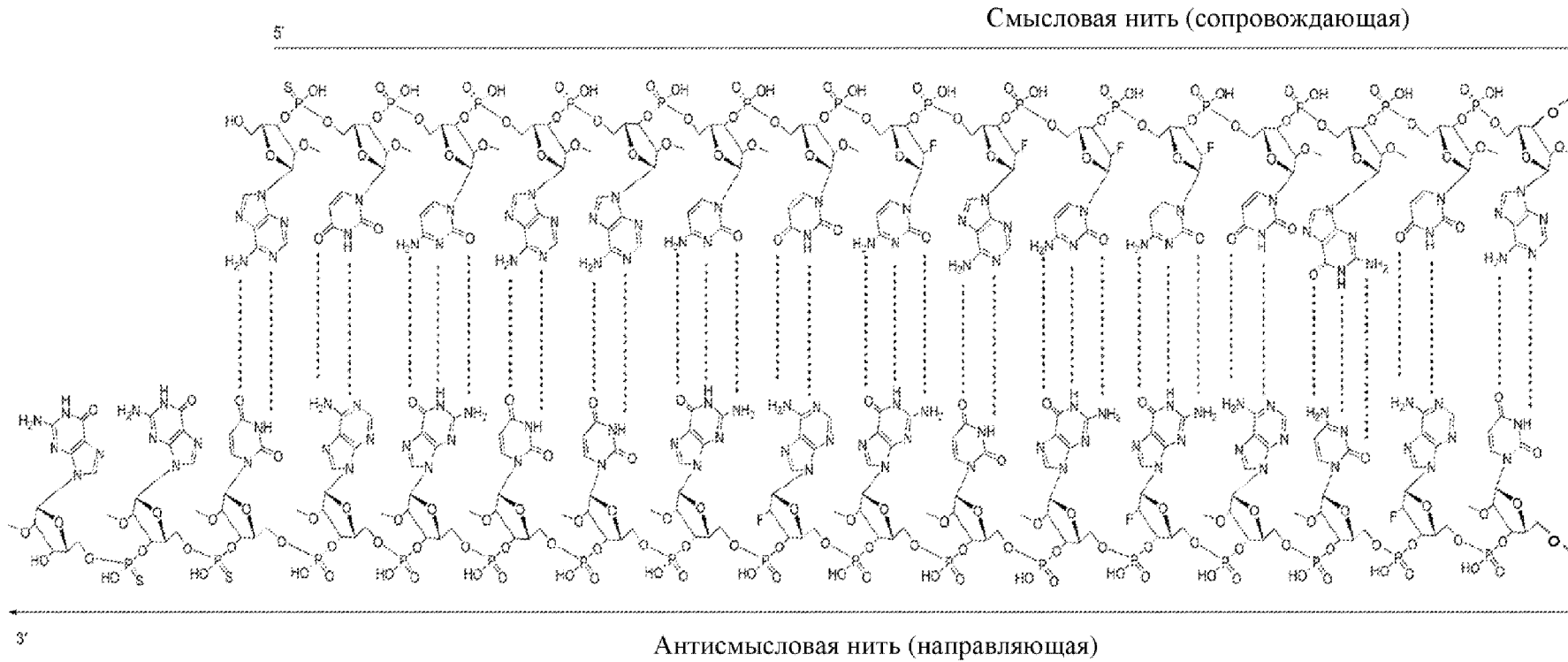




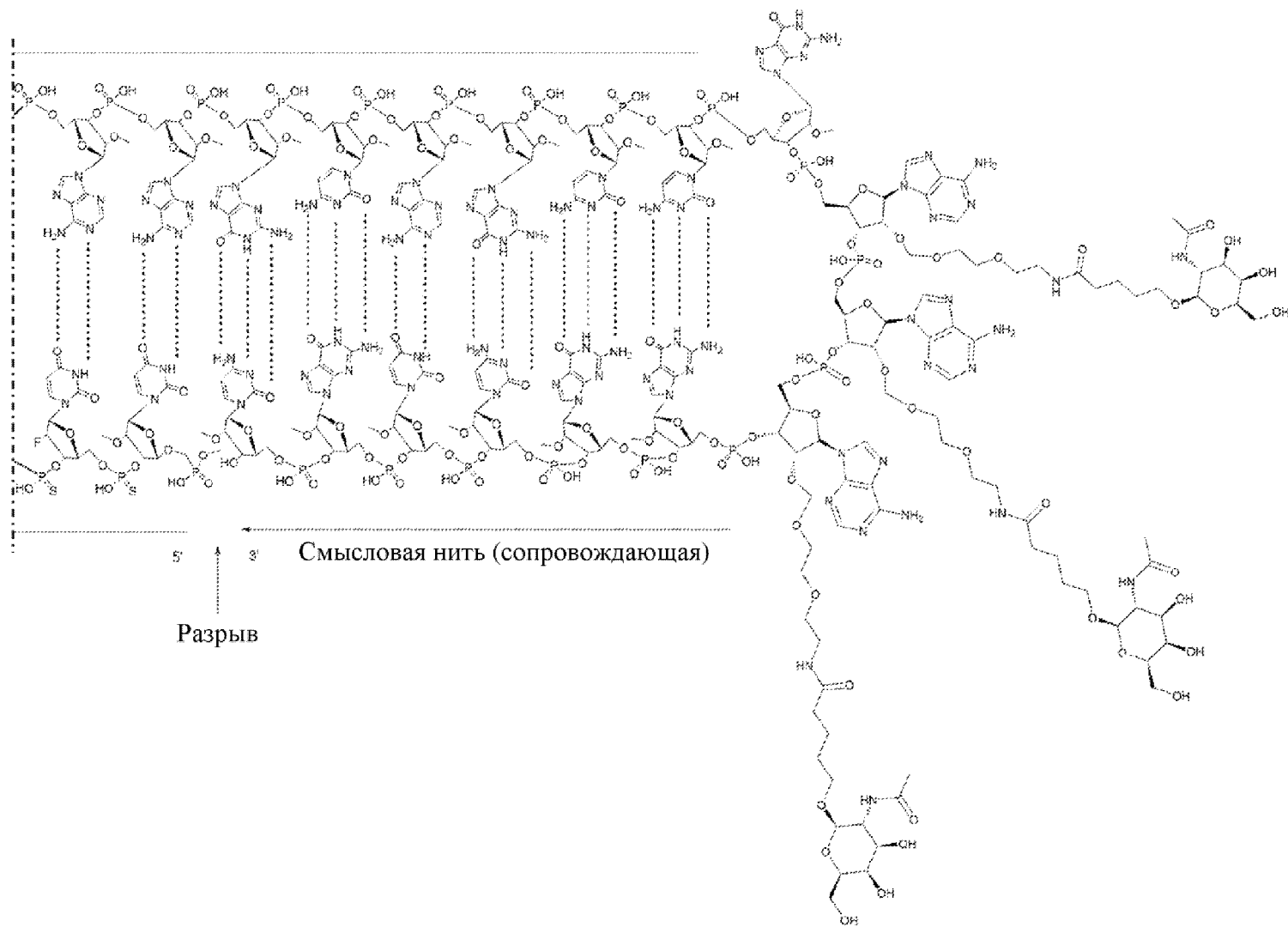
Фиг. 1В



Фиг. 1С-1



Фиг. 1С-2



**Фиг. 1D**

Соединение А, смысловая

нить (SEQ ID NO: 1)

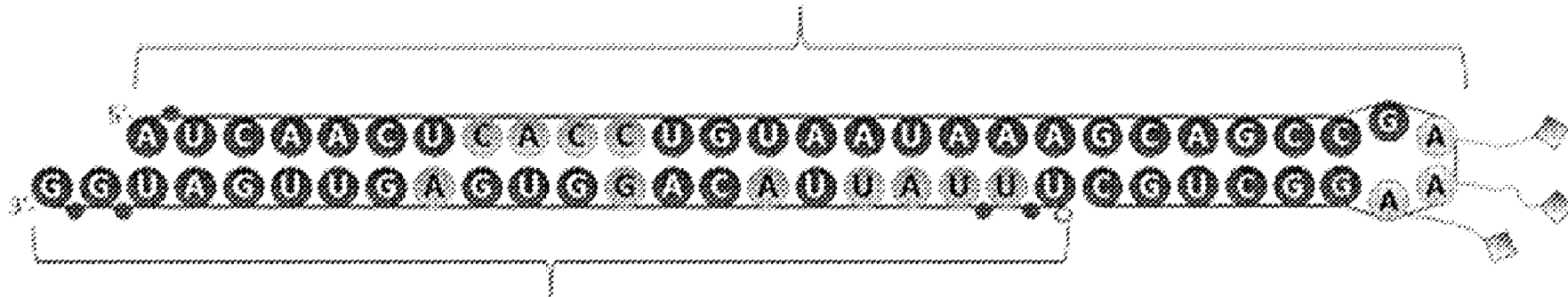
5' - AUCAACUCACCCUGUAAUAAAGCAGCCGAAAGGCUGC - 3'

Антисмысловая нить (SEQ ID NO: 3)

5' - UUUUUUACAGGUGAGUUGAUGG - 3'

Фиг. 1Е

Сопровождающая нить с  
четвертной петлей



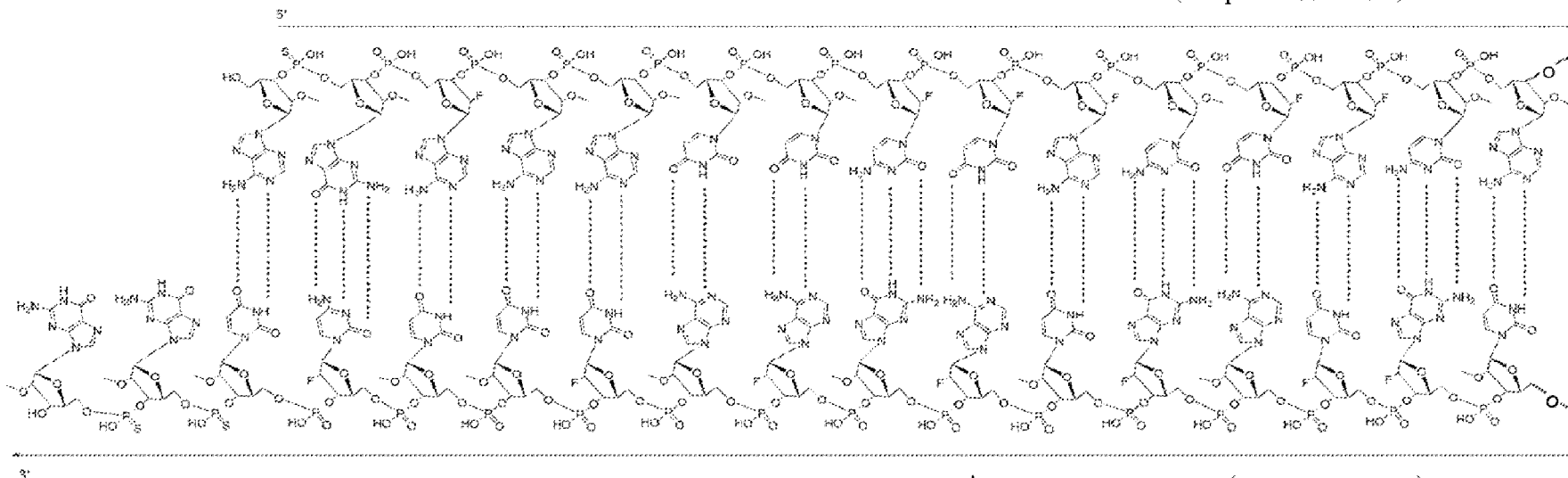
Направляющая  
нить

Условные обозначения

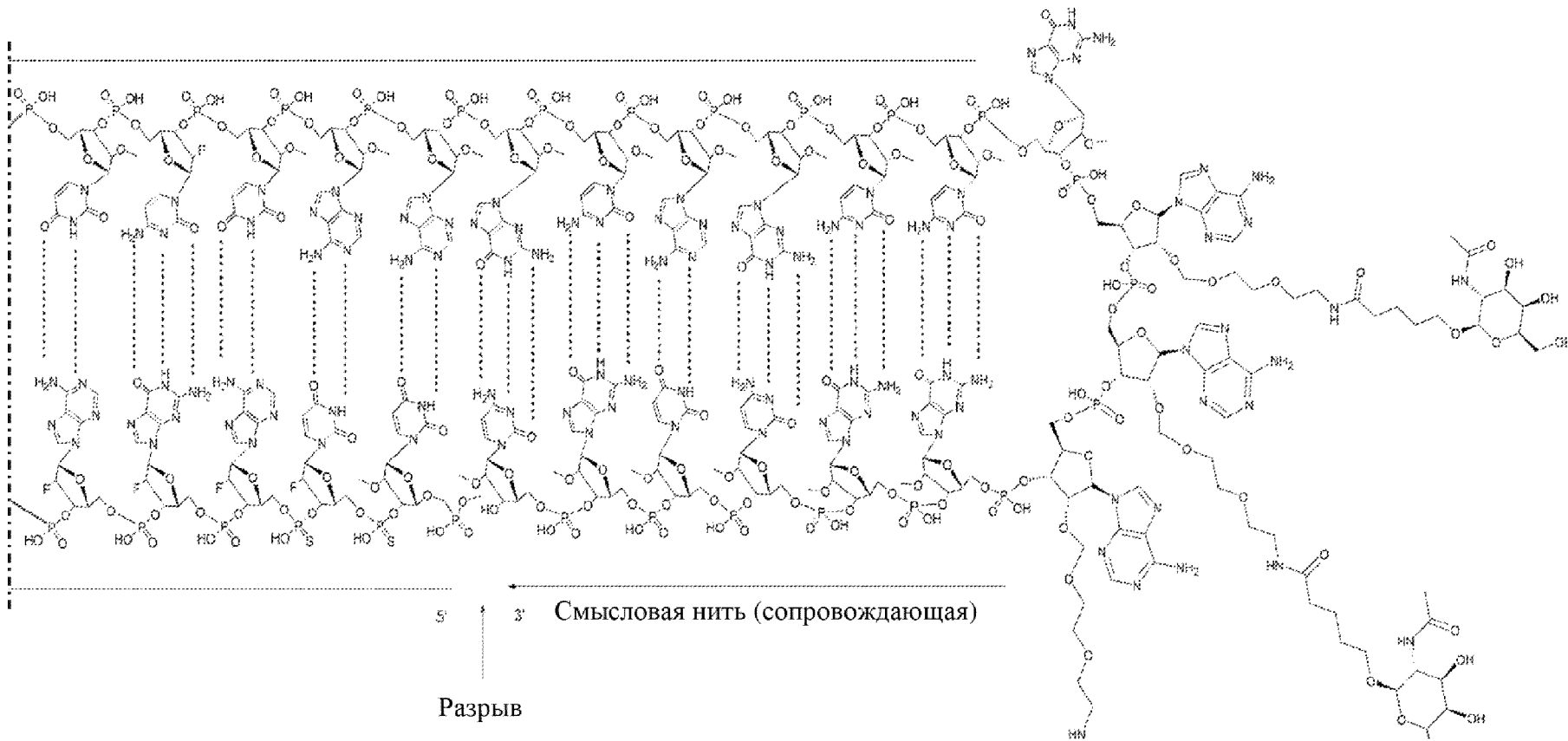


Фиг. 2А-1

Смысловая нить (сопровождающая)



Фиг. 2А-2



**Фиг. 2В**

Соединение В

Смысловая нить (SEQ ID NO: 4)

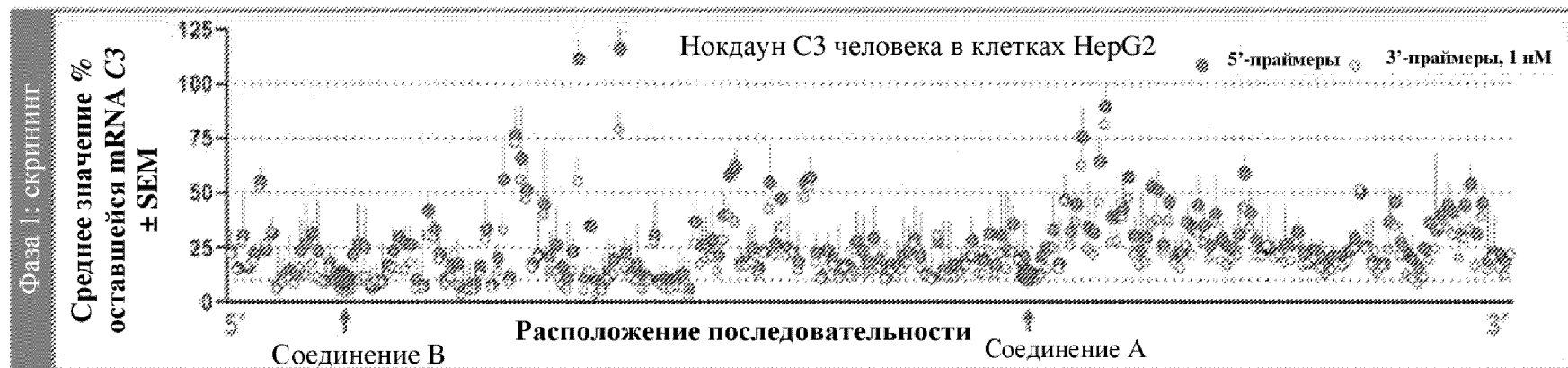
5' - AGAAAUUCUACUACAUCUAAGCAGCCGAAAGGCUGC- 3'

Антисмысловая нить (SEQ ID NO: 6)

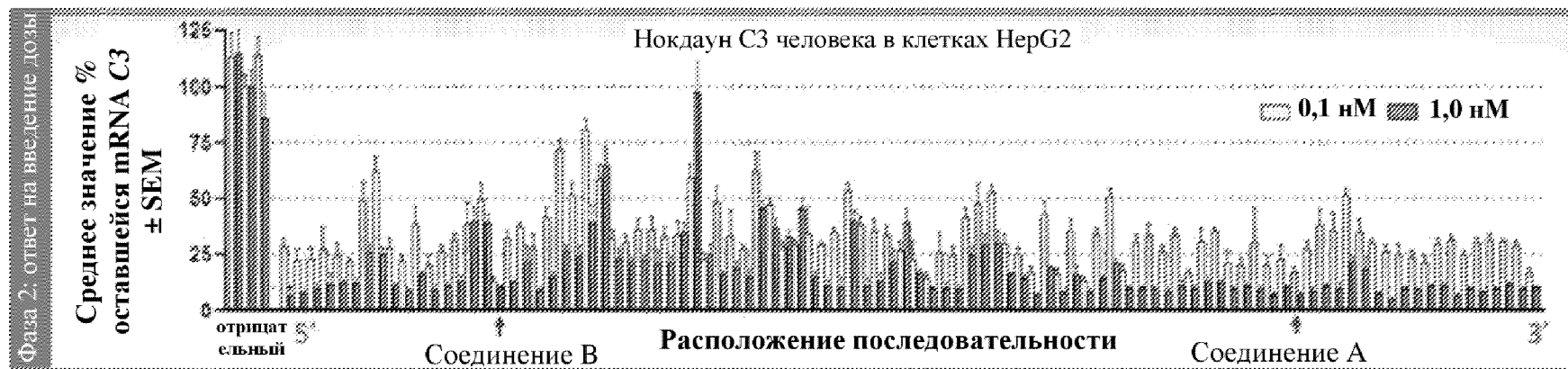
5' - UUAGAUGUAGUAGAAUUUCUGG- 3'



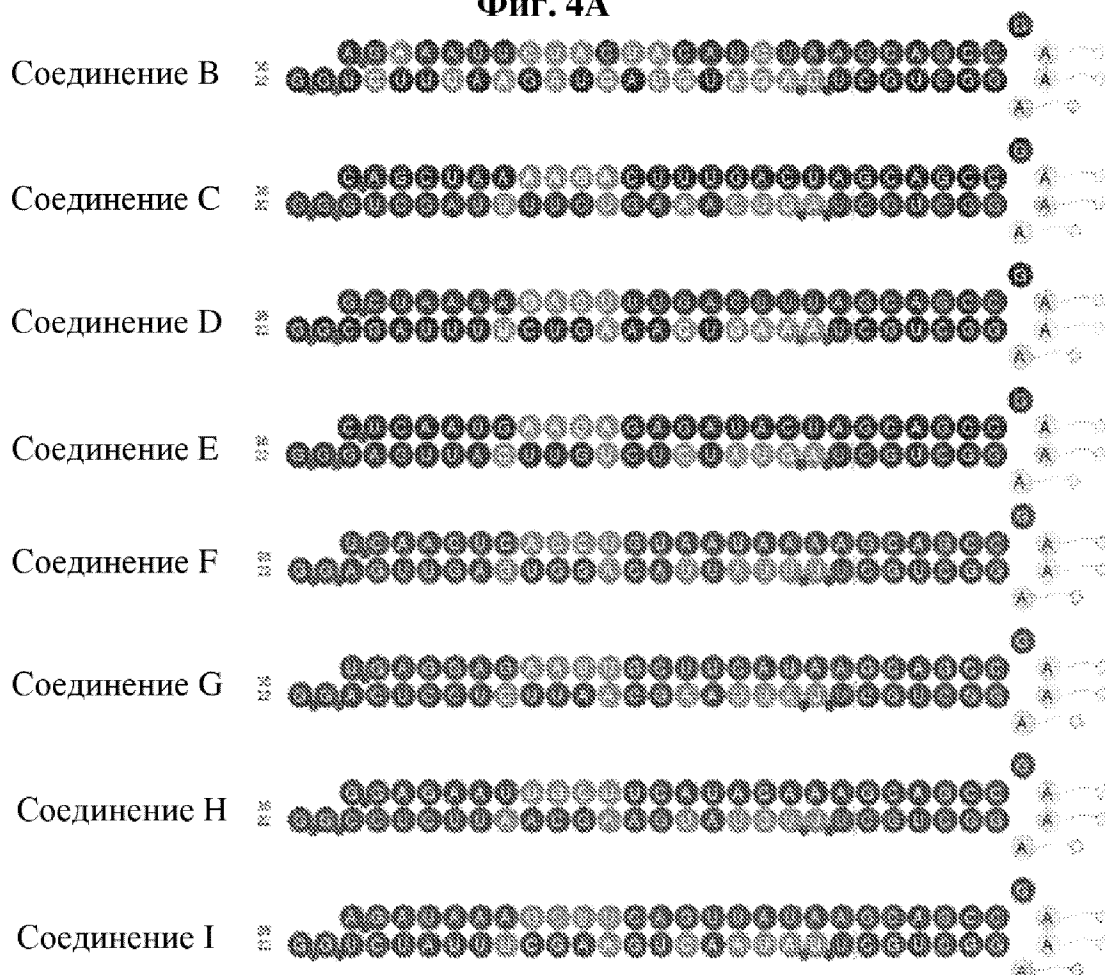
Фиг. 3А



Фиг. 3В

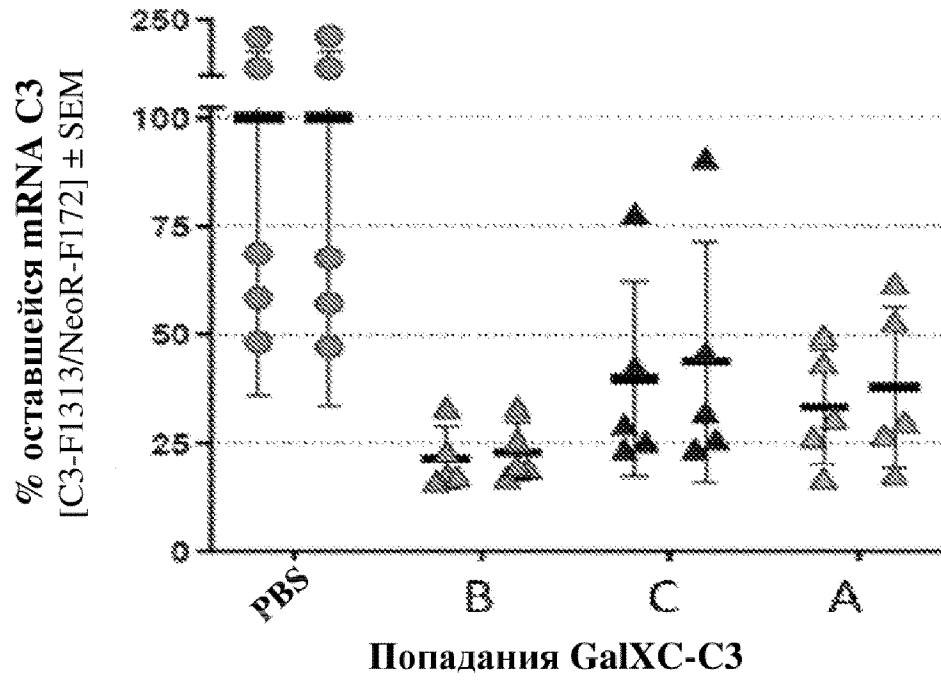


Фиг. 4А

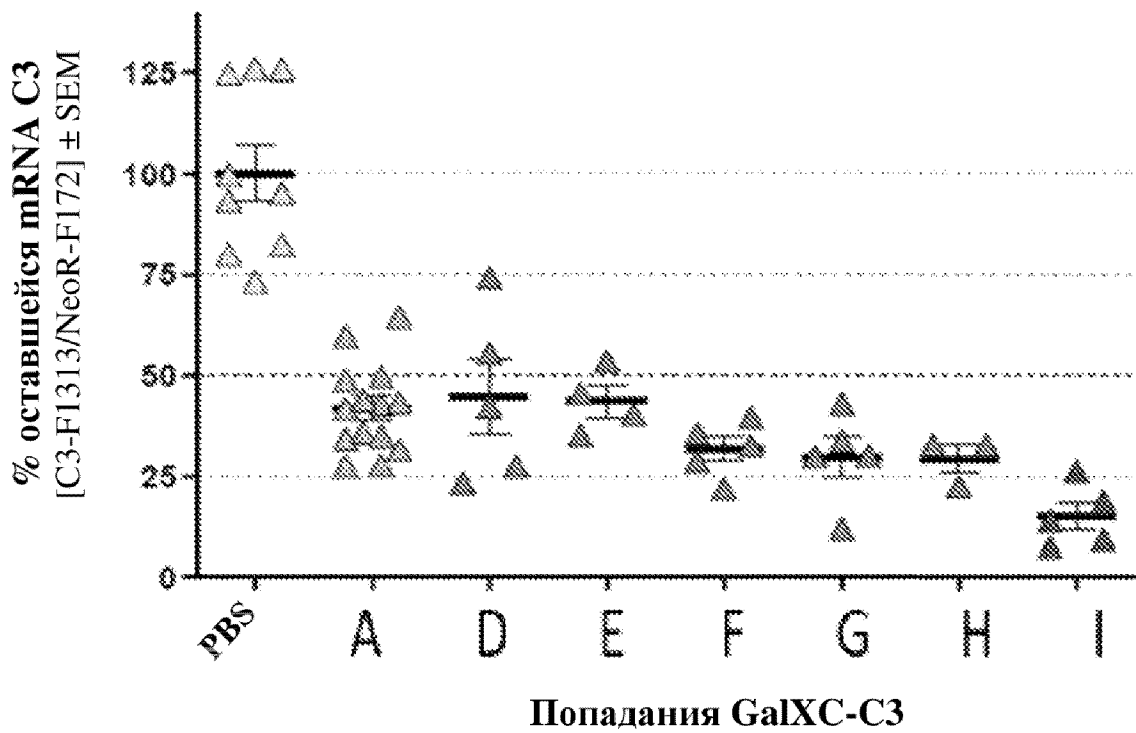


Код	Сокращение	Название
	[ademA-GalNAc]	2'-Аминодиэтоксиметаноладенин-GalNAc
	[fA]	2'-Фторадеозин
	[fAs]	2'-Фторадеозинфосфотиоат
	[fC]	2'-Фторцитидин
	[fG]	2'-Фторгуанозин
	[fU]	2'-Фторуридин
	[fUs]	2'-Фторуридинфосфотиоат
	[mA]	2'-О-Метиладенозин
	[mAs]	2'-О-Метиладенозинфосфотиоат
	[mC]	2'-О-Метилцитидин
	[mCs]	2'-О-Метилцитидинфосфотиоат
	[MeФосфонат-40-mUs]	5'-Метоксифосфонат-4'-окси-2'-О-метилуридинфосфотиоат
	[mG]	2'-О-Метилгуанозин
	[mGs]	2'-О-Метилгуанозинфосфотиоат
	[mU]	2'-О-Метилуридин
	[mUs]	2'-О-Метилуридинфосфотиоат

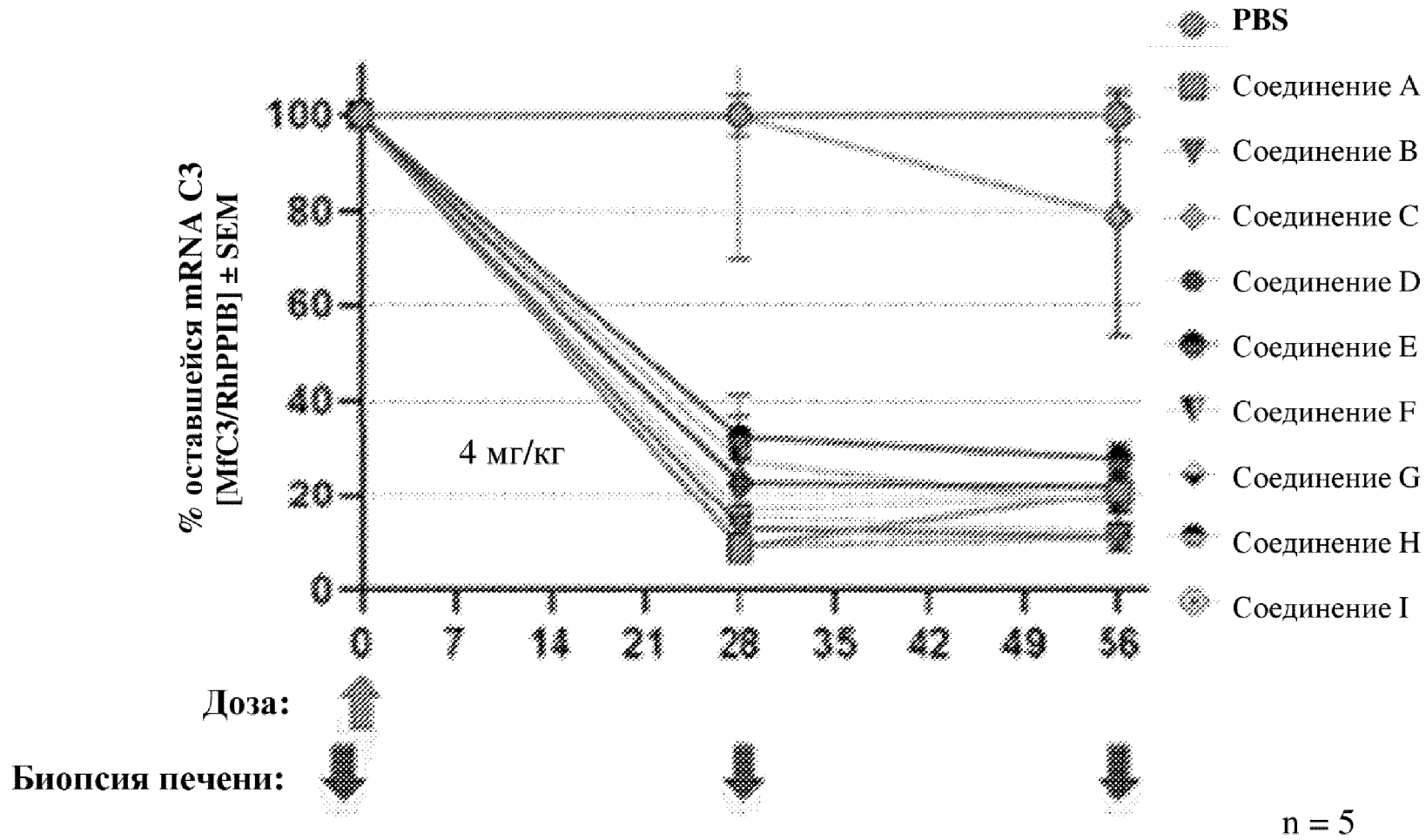
Фиг. 4В



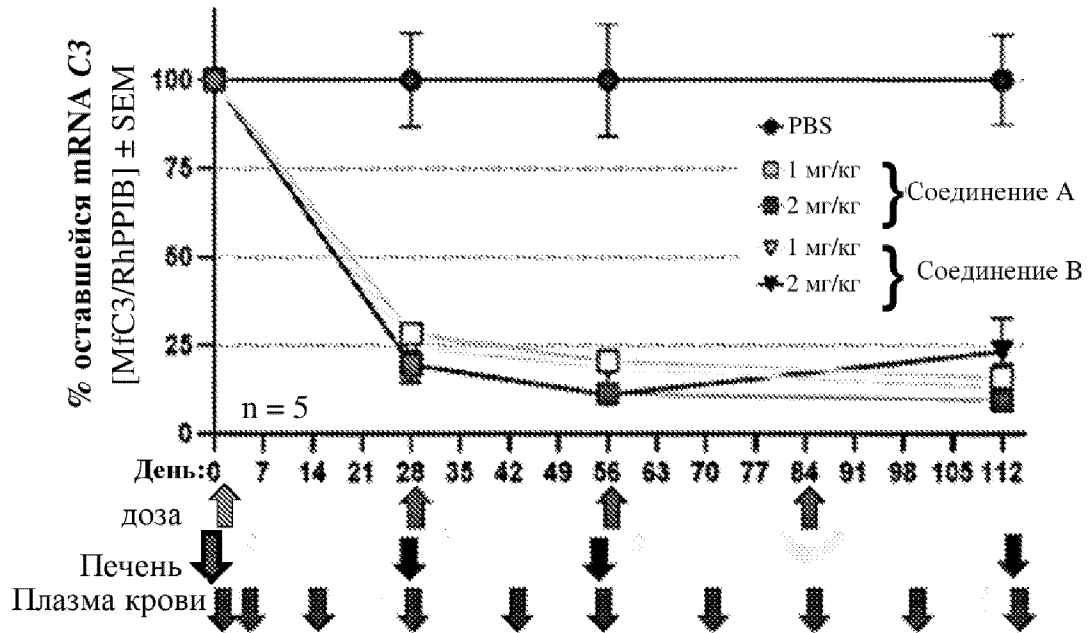
Фиг. 4С



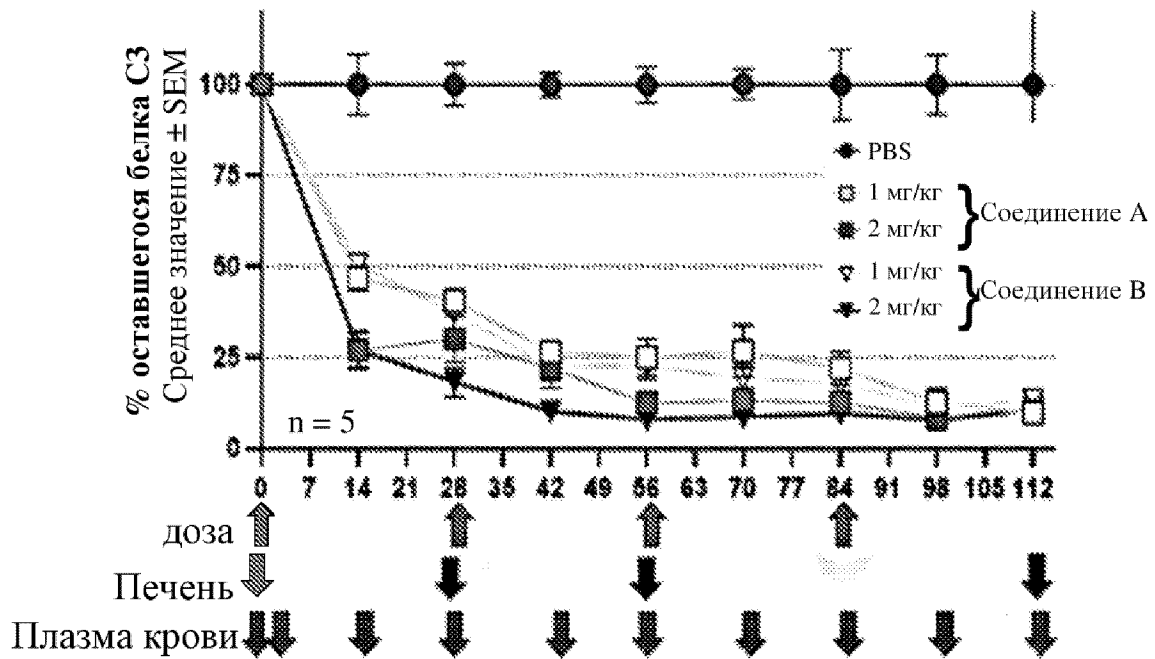
Фиг. 5



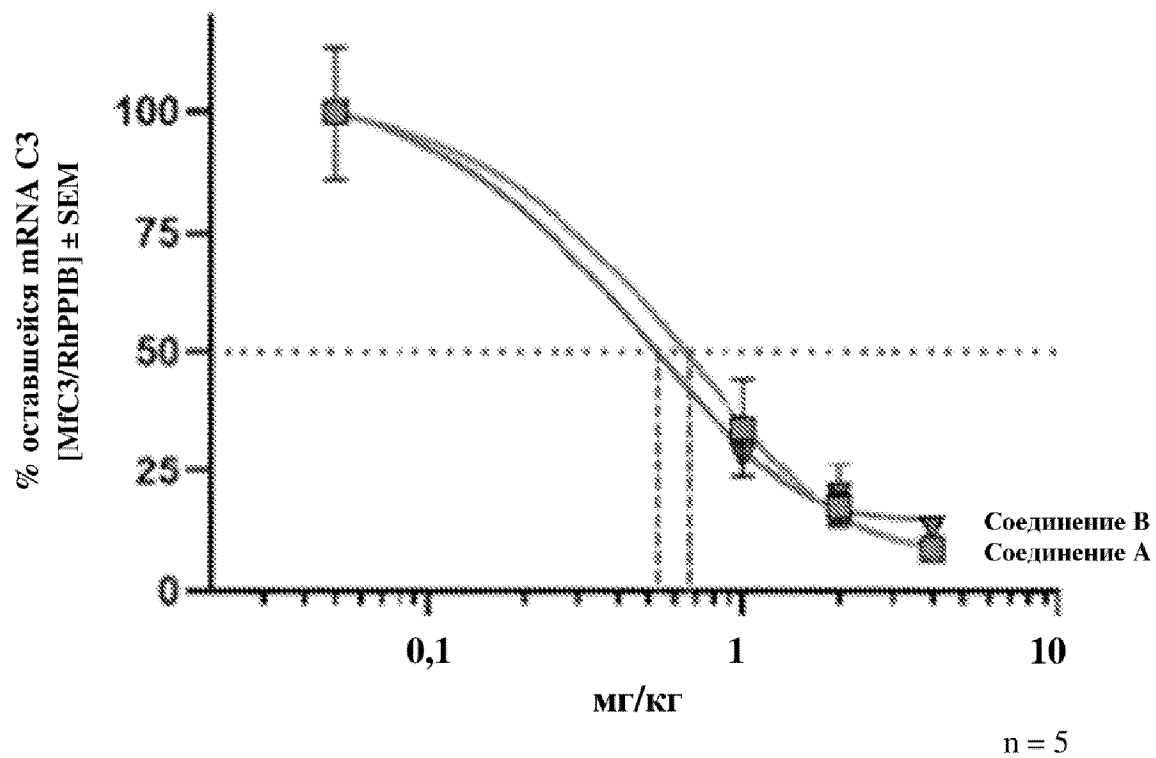
Фиг. 6А



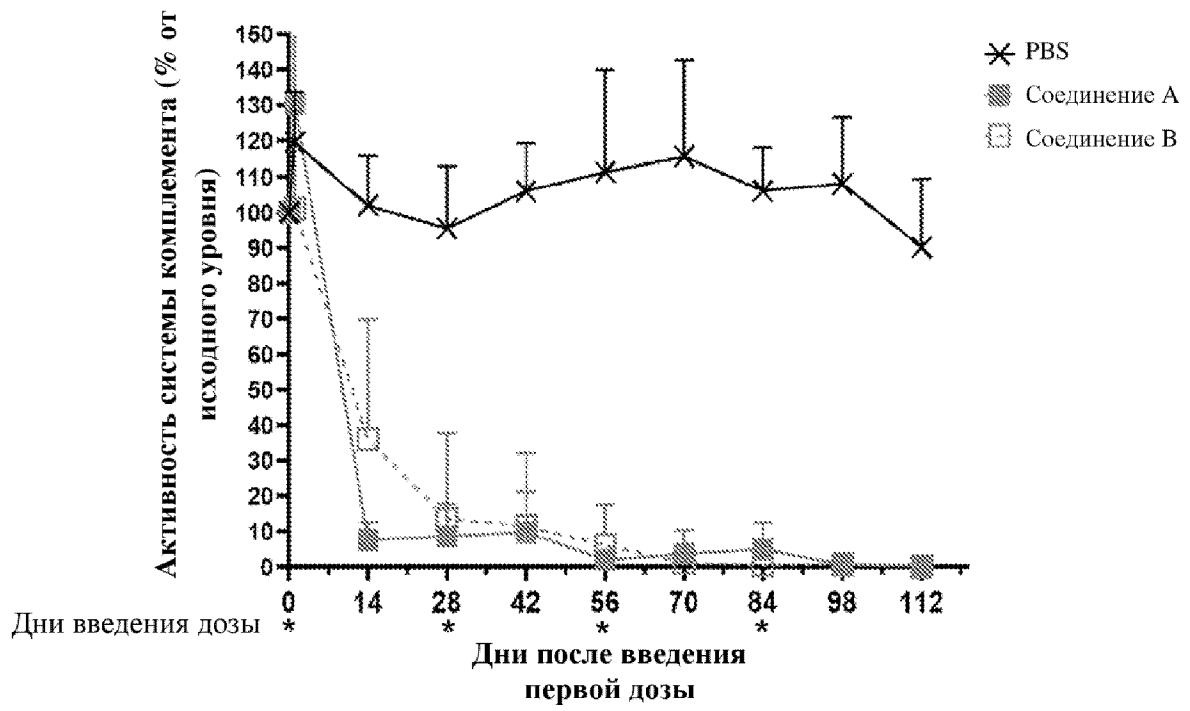
Фиг. 6В



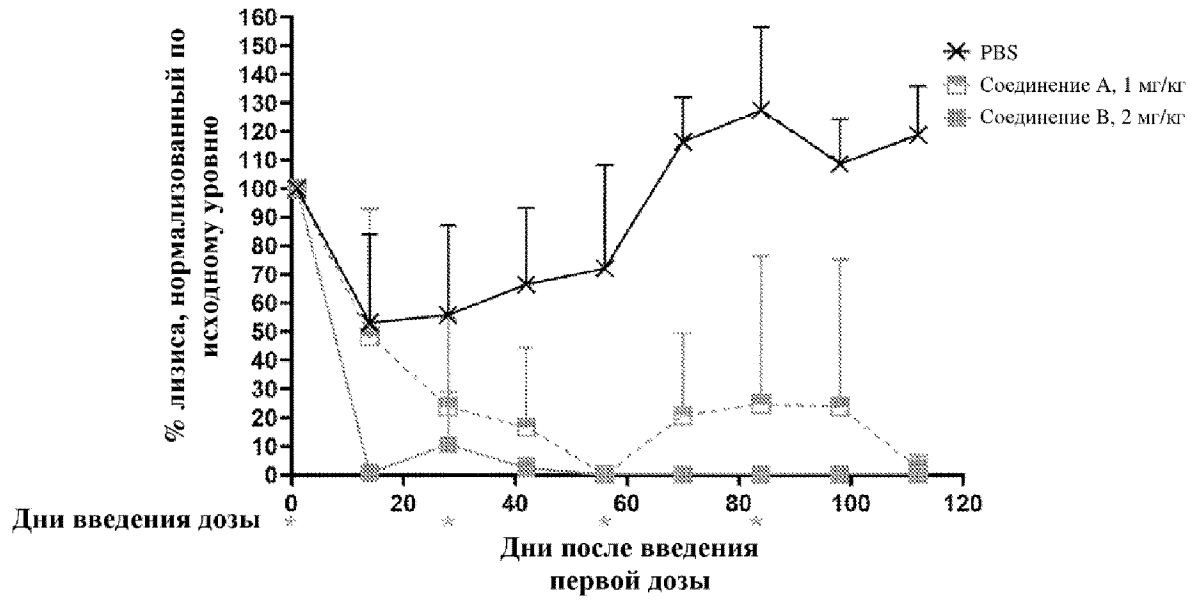
Фиг. 7



Фиг. 8

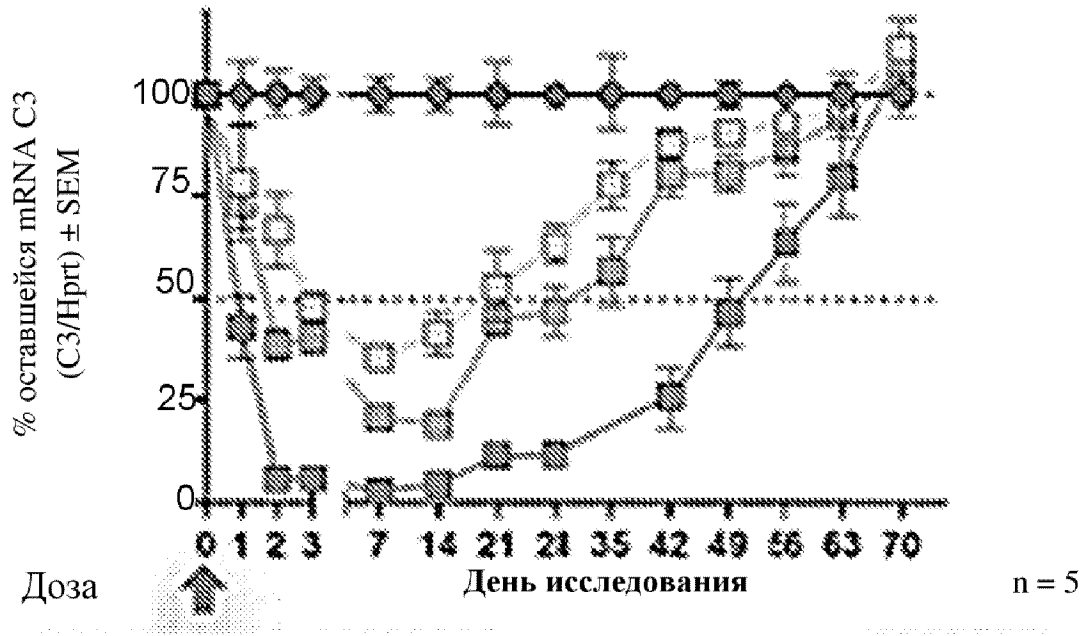


Фиг. 9

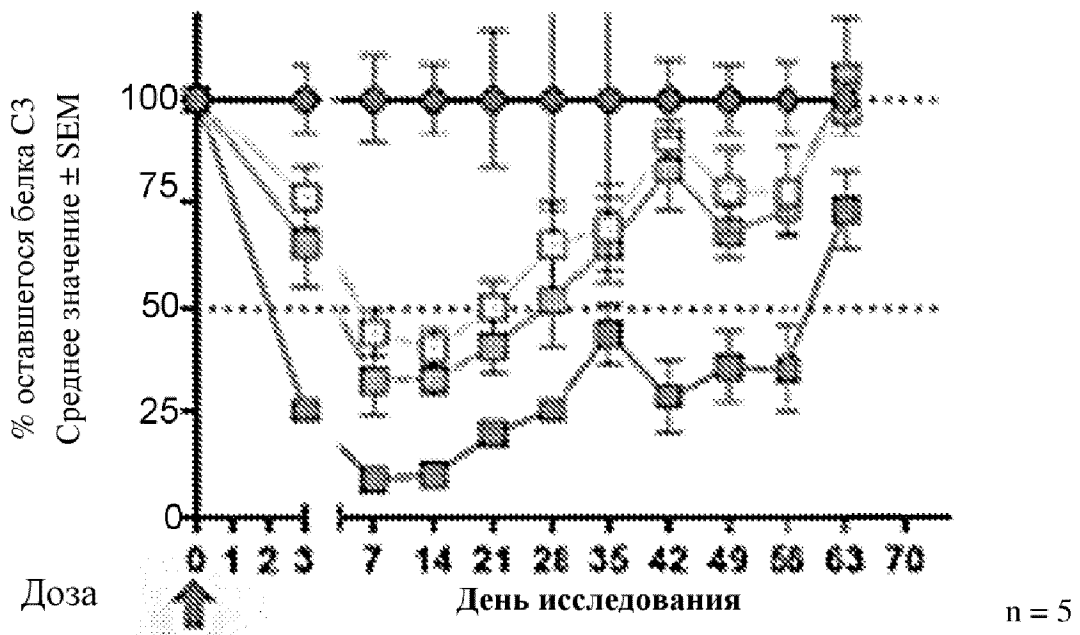




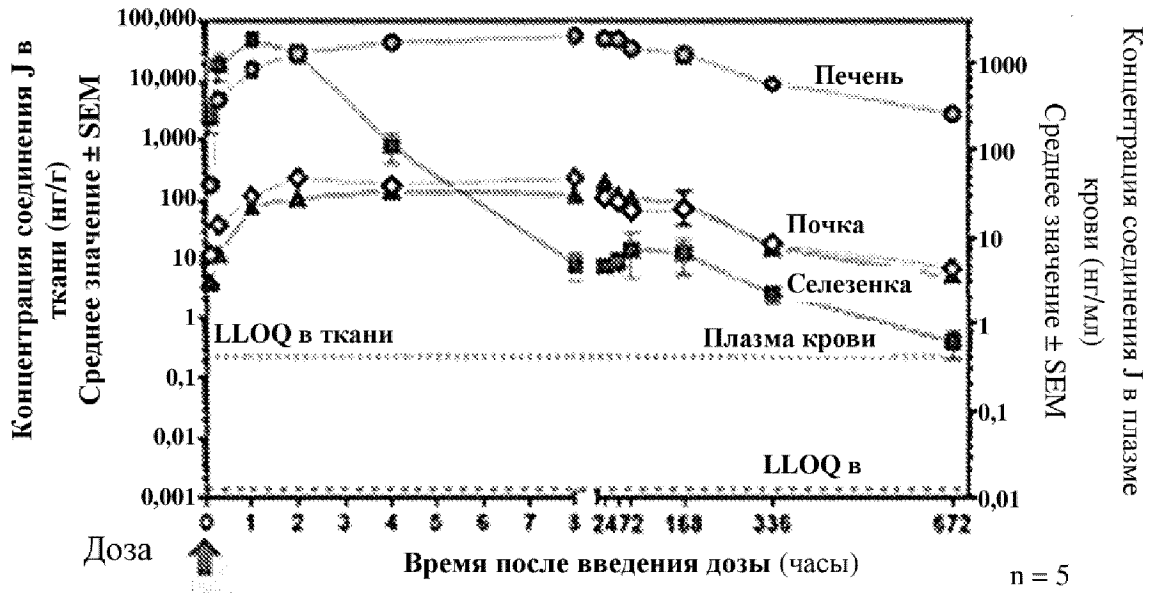
Фиг. 10А



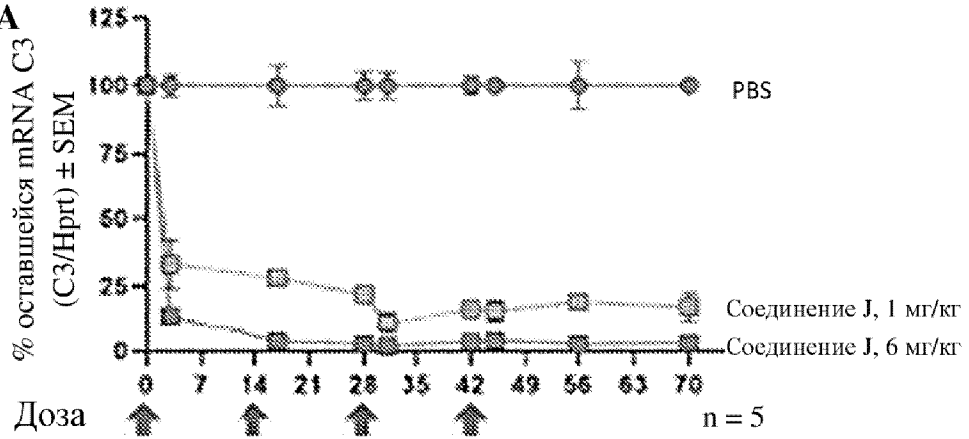
Фиг. 10В



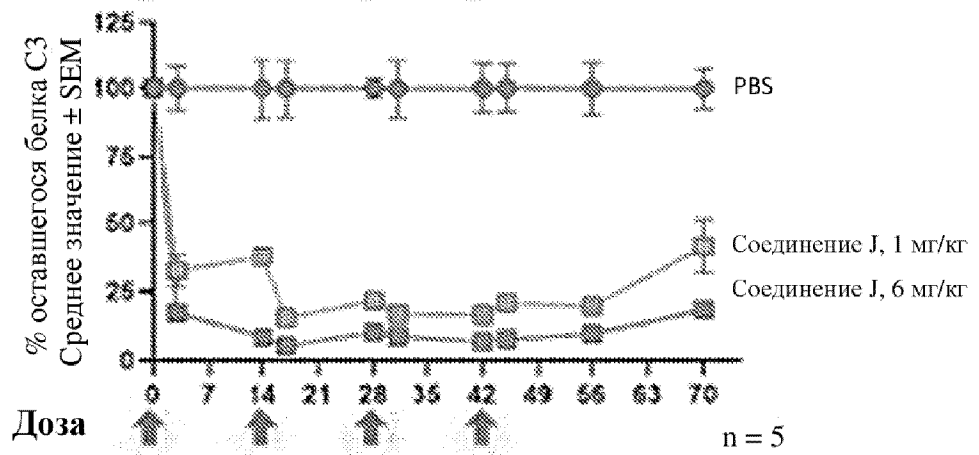
Фиг. 11



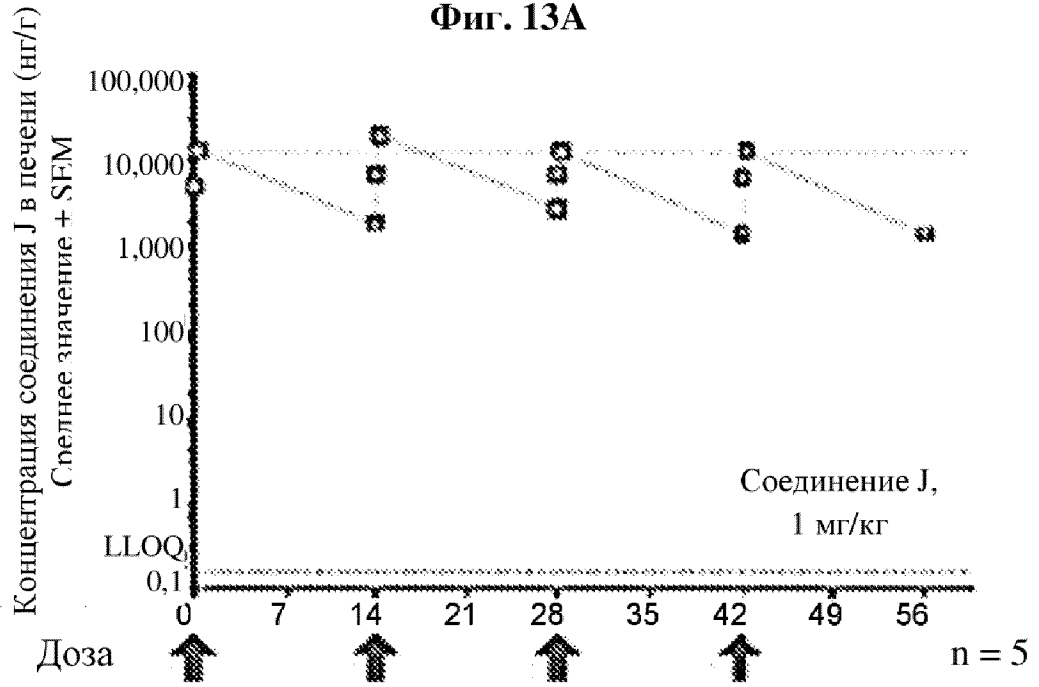
Фиг. 12А



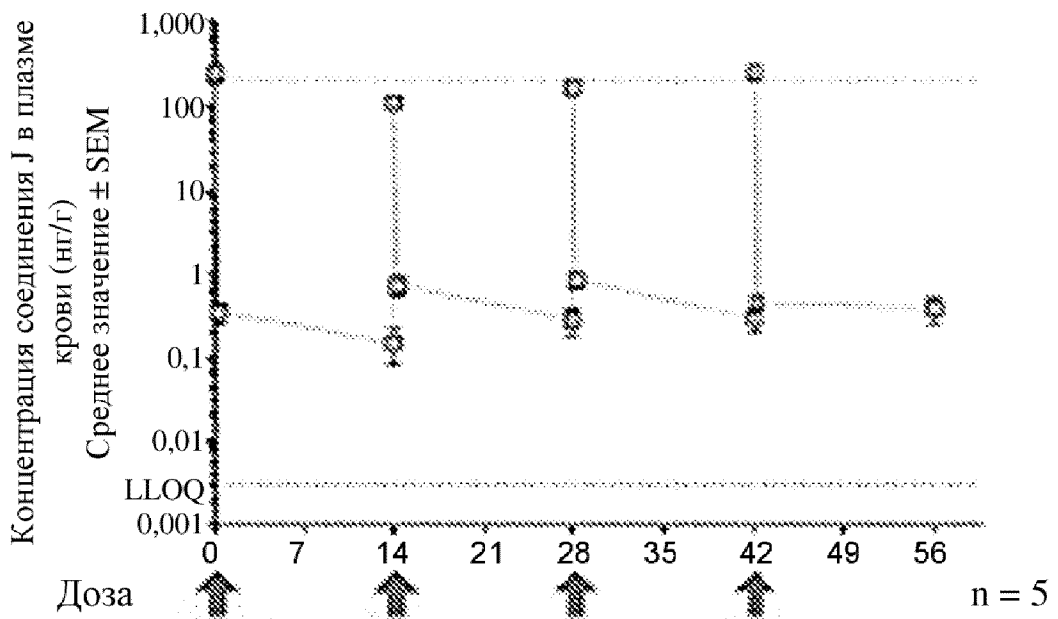
Фиг. 12В



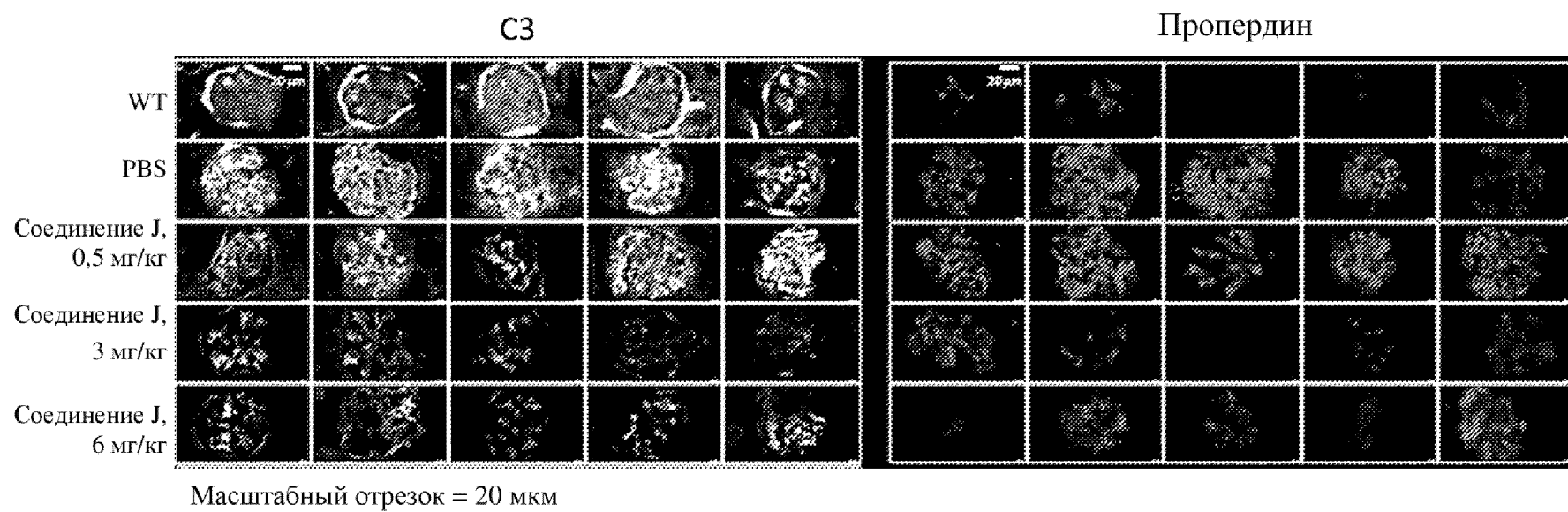
Фиг. 13А



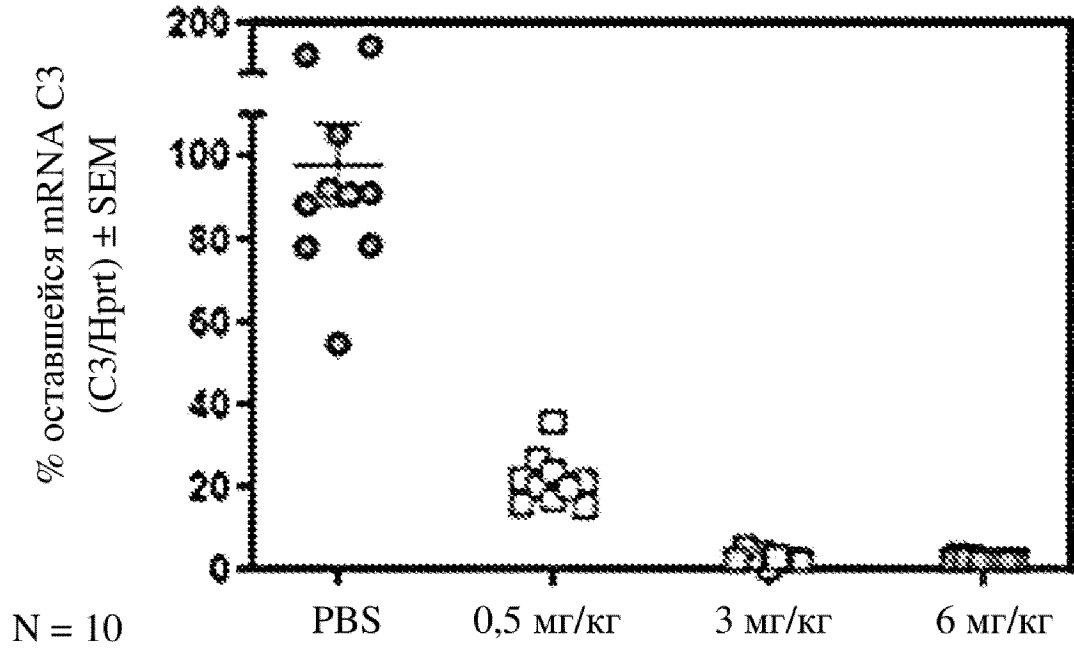
Фиг. 13В



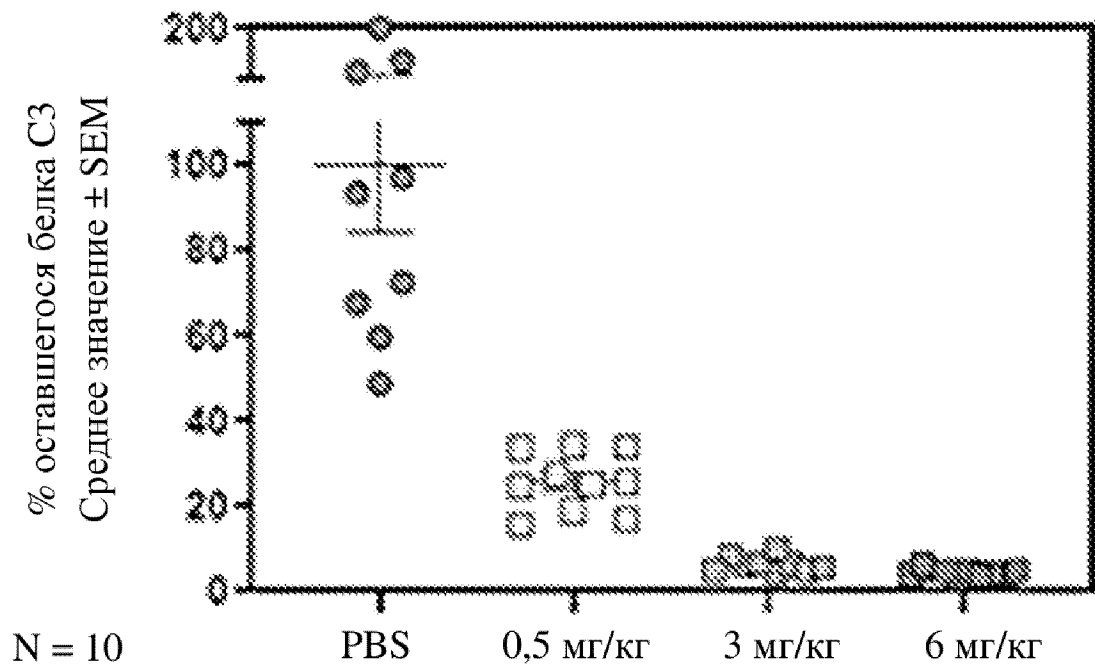
Фиг. 14



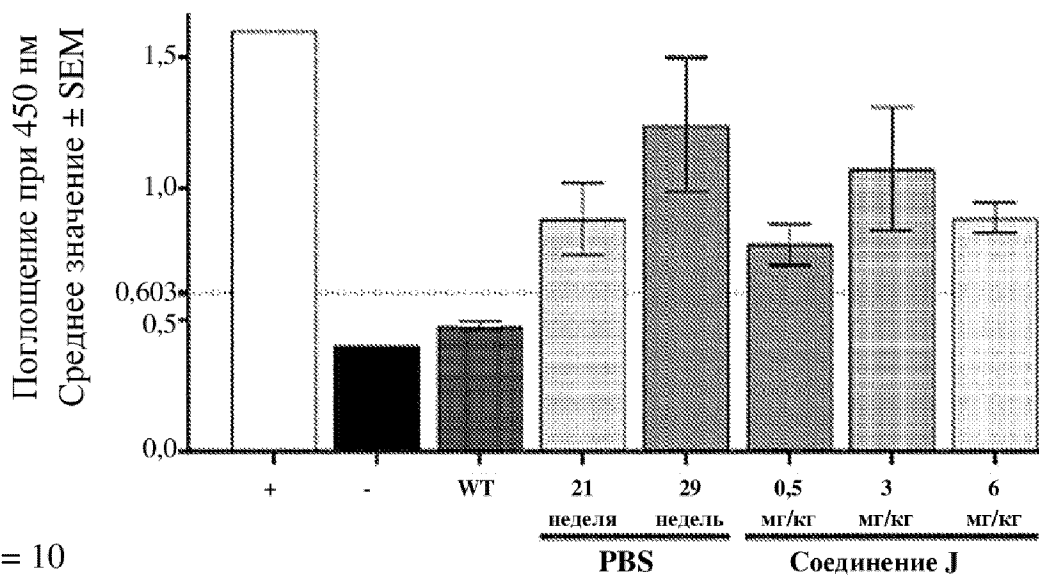
Фиг. 15А



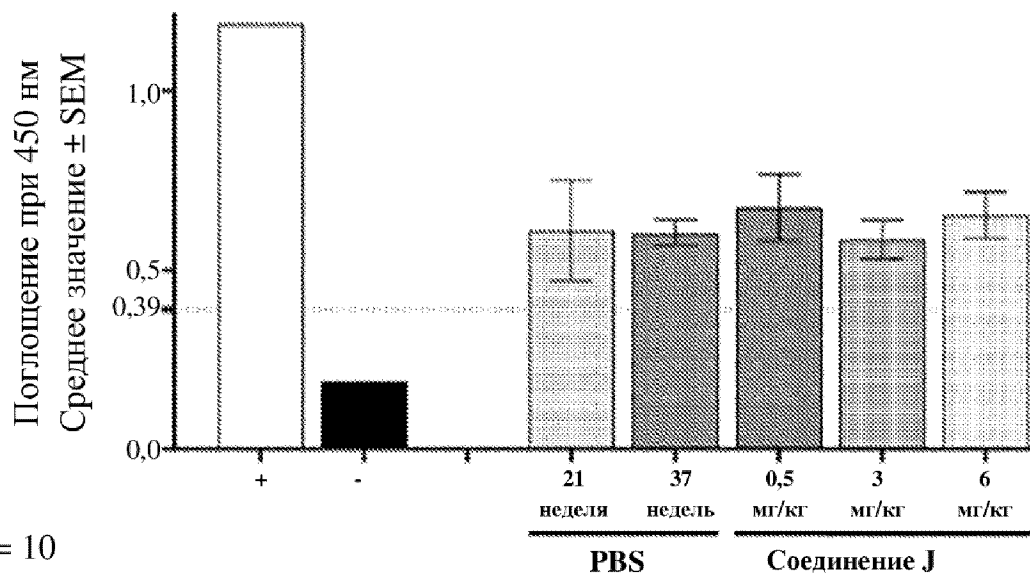
Фиг. 15В



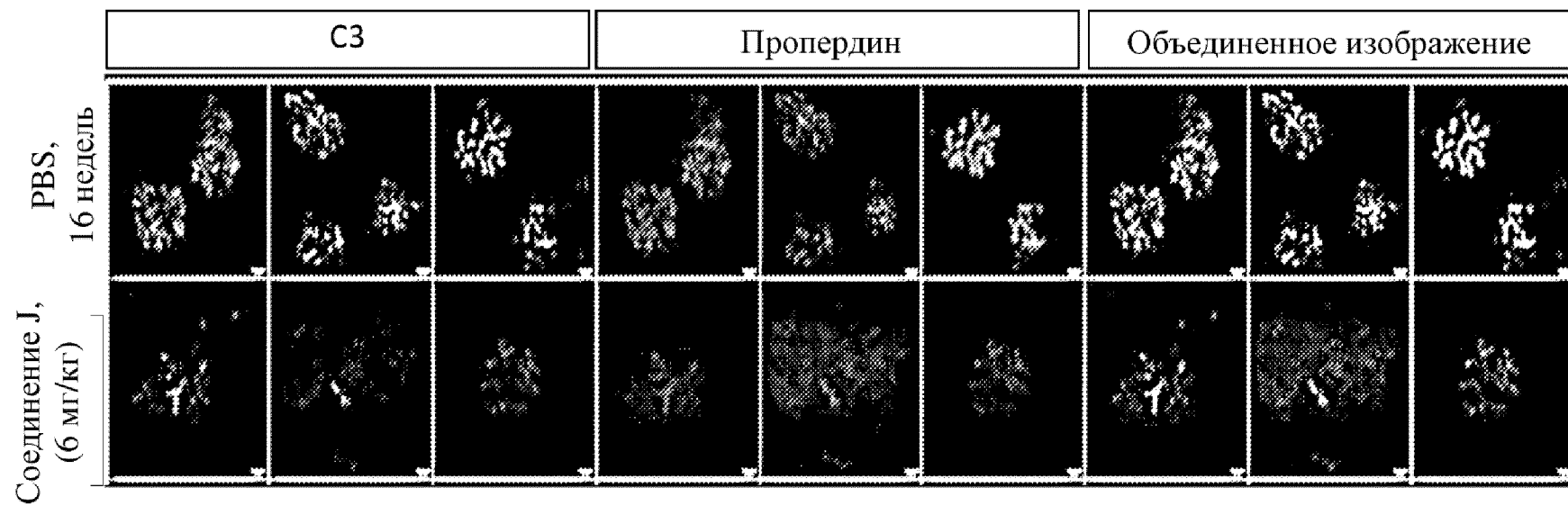
Фиг. 16А



Фиг. 16В

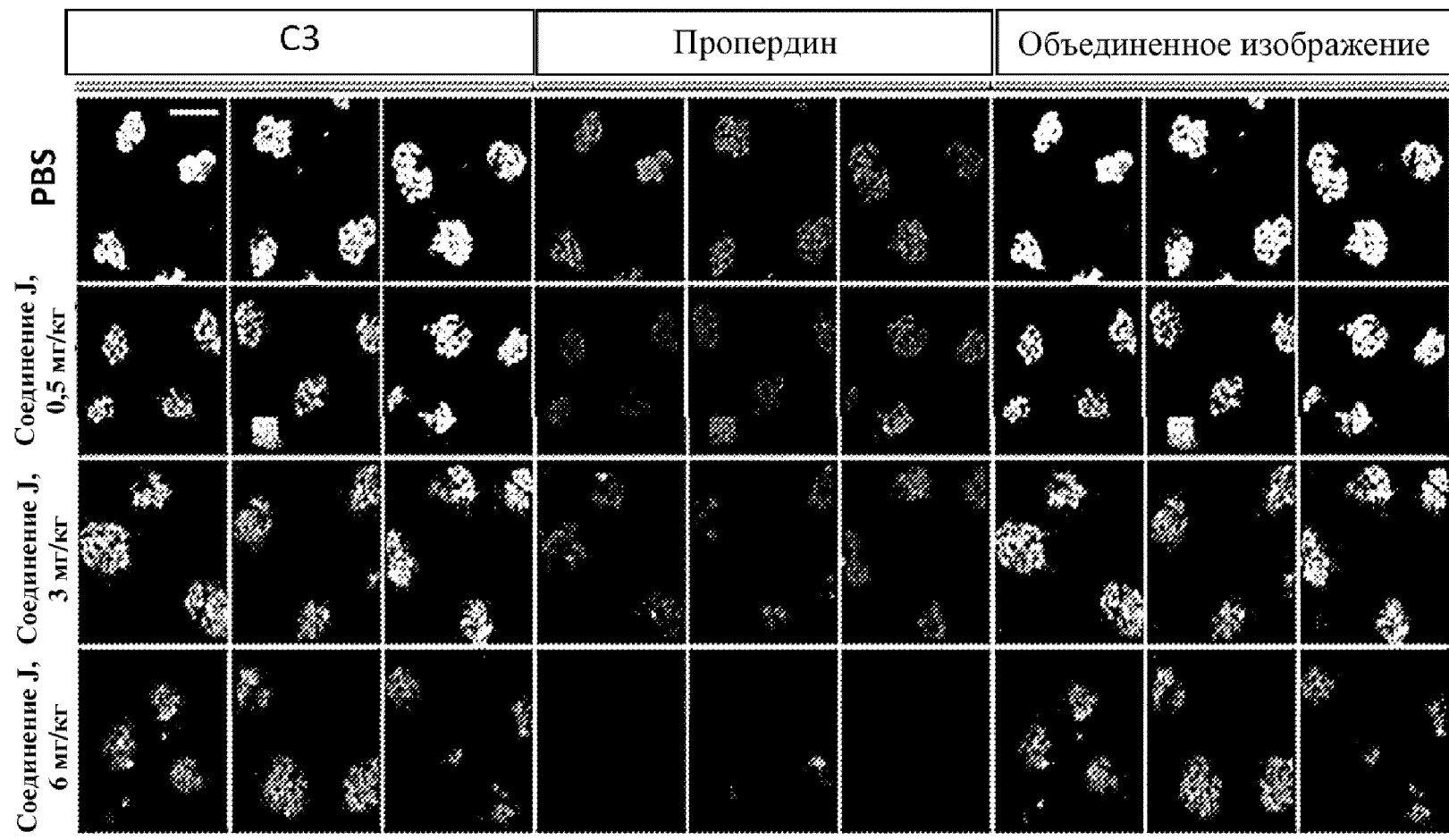


Фиг. 17

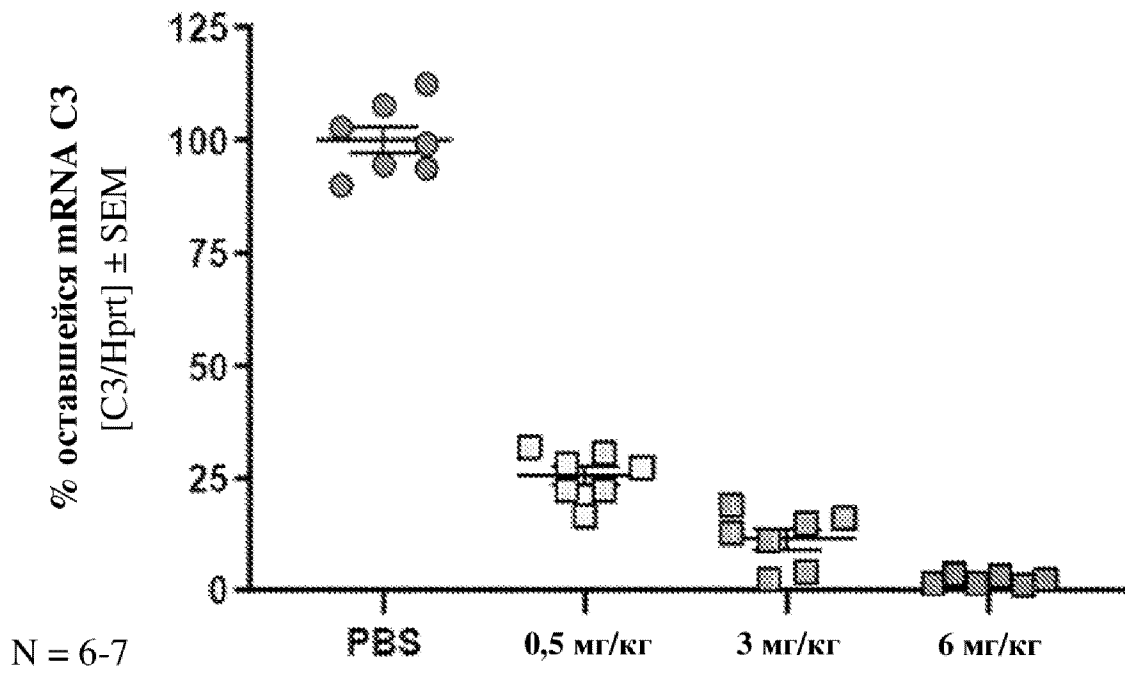




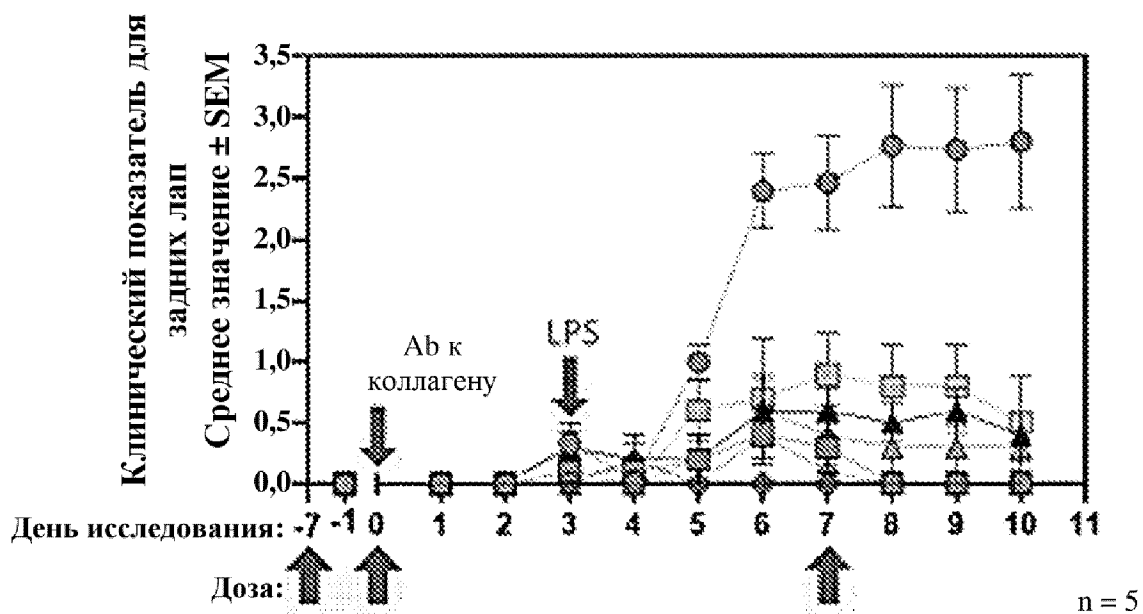
Фиг. 18



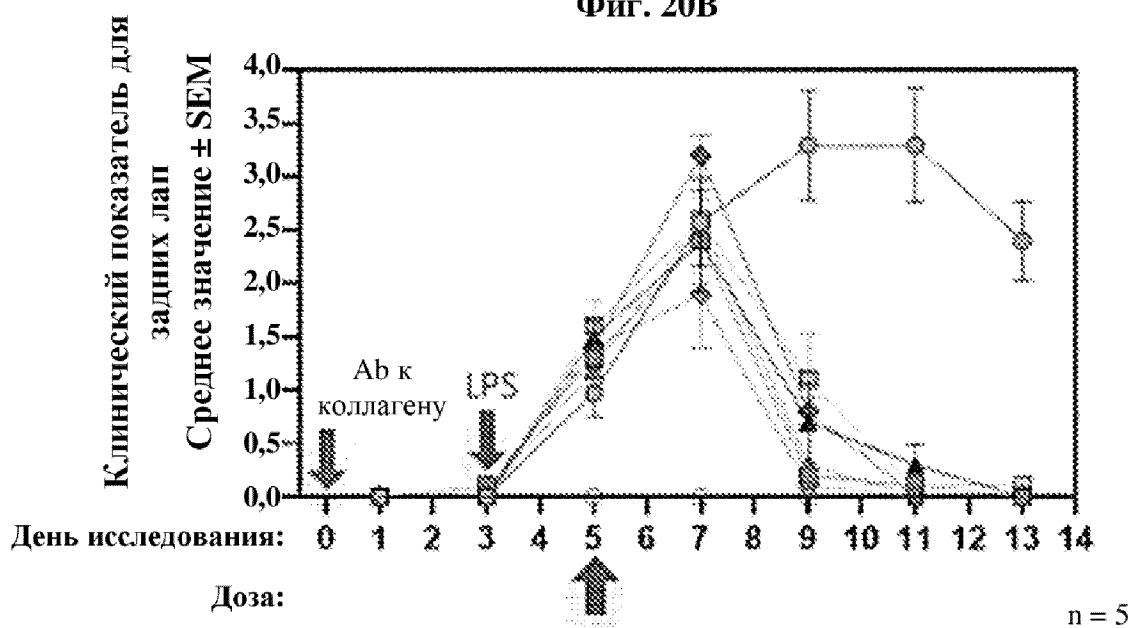
Фиг. 19



Фиг. 20А

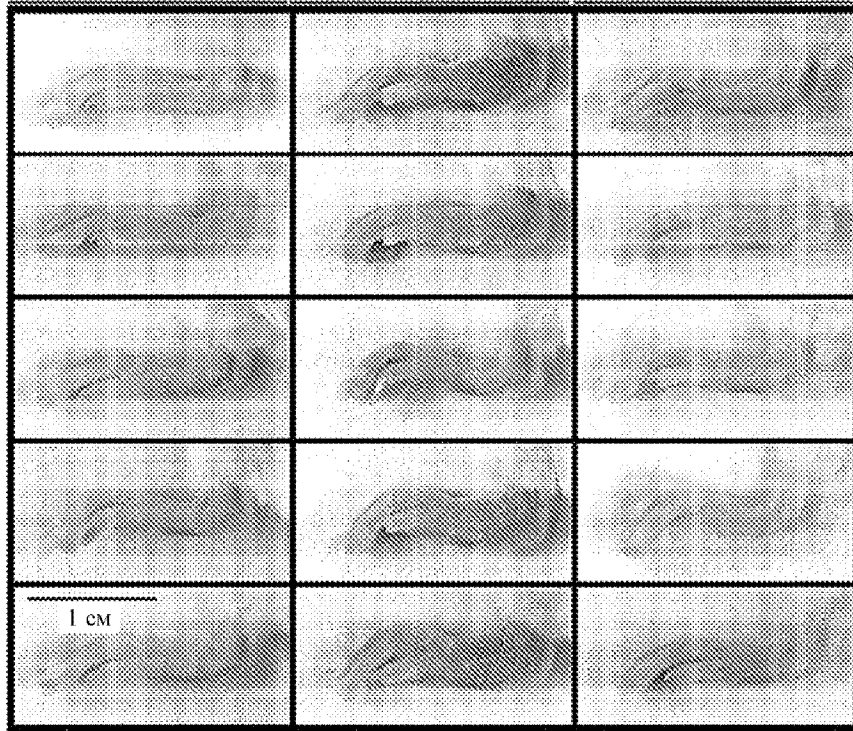


Фиг. 20В



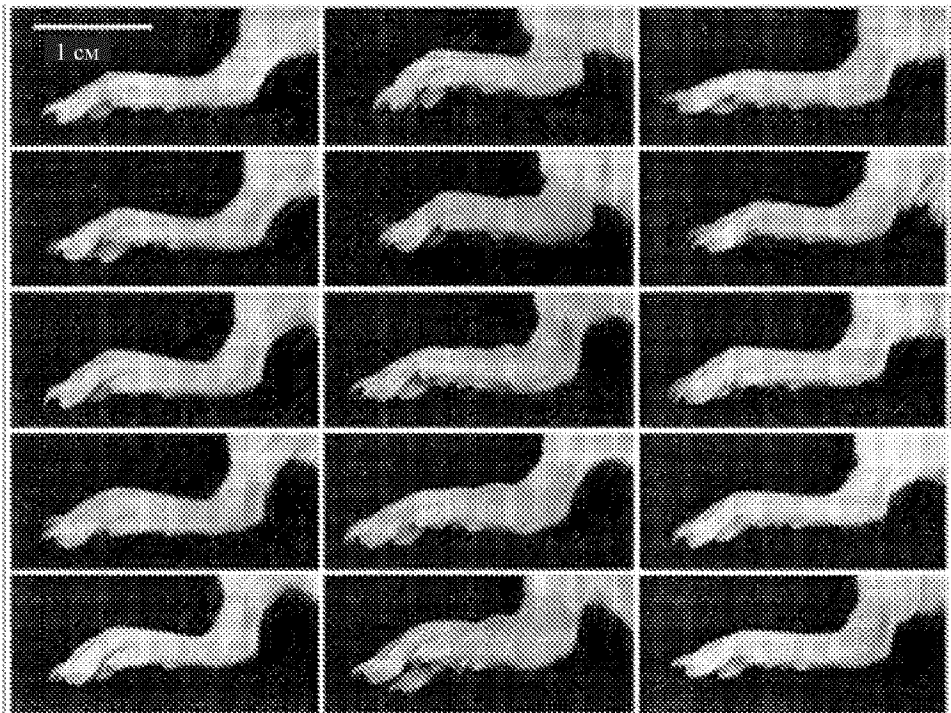
29/43

Фиг. 21А



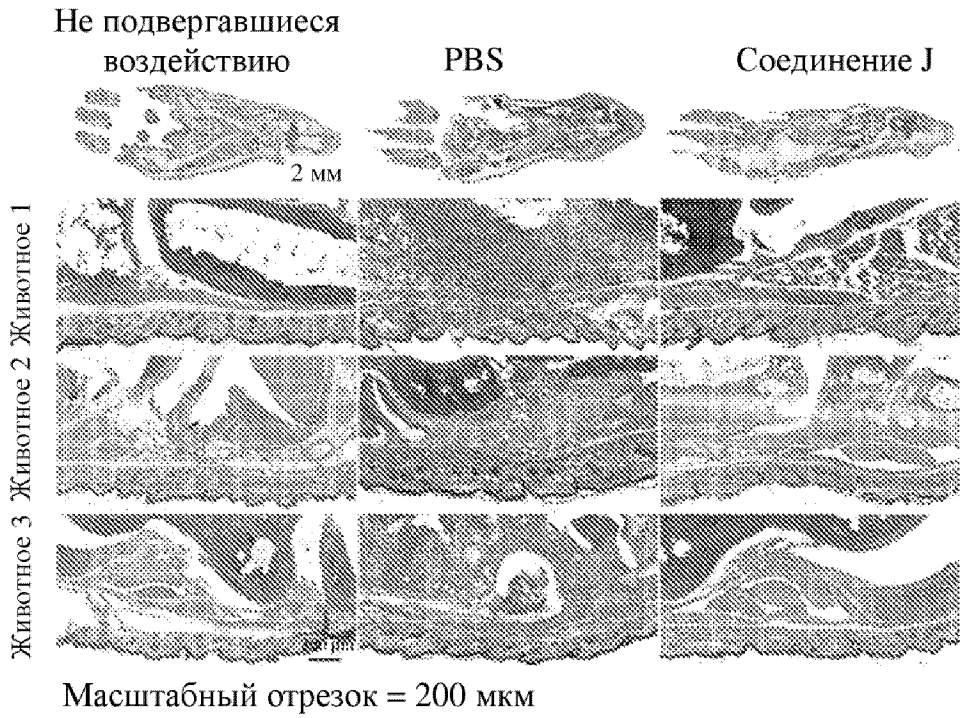
Масштабный отрезок = 1 см

Фиг. 21В

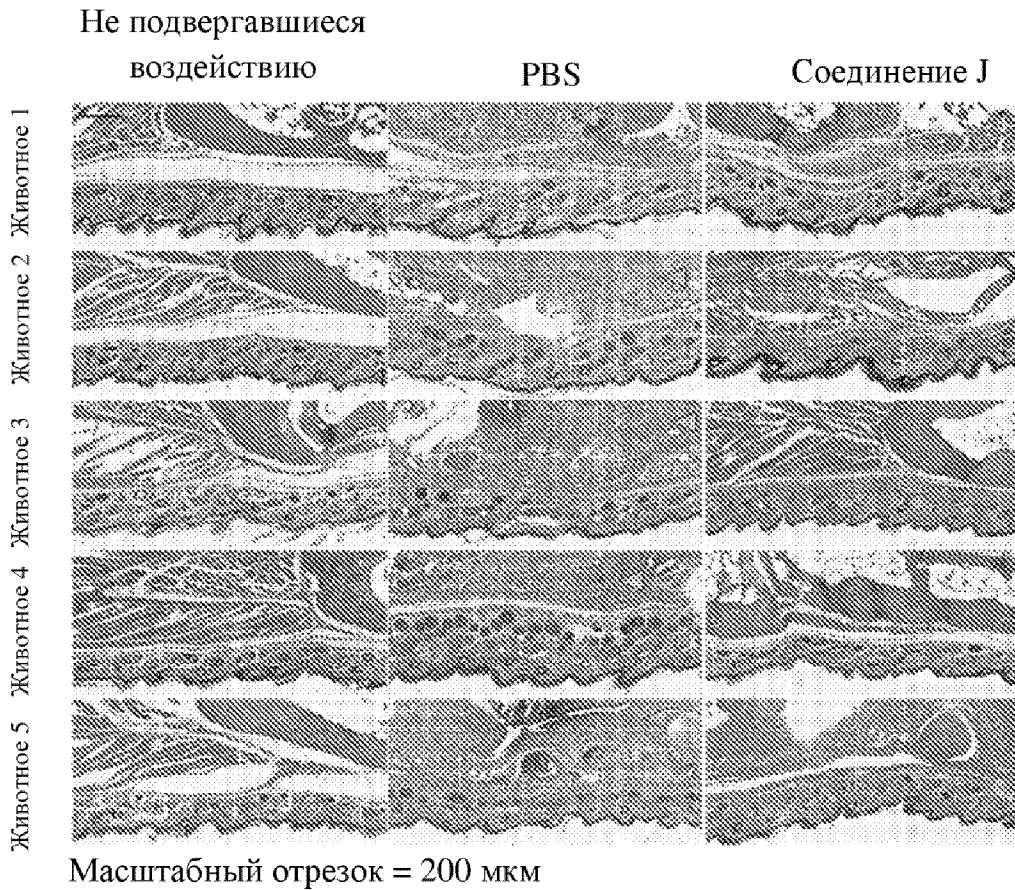


Масштабный отрезок = 1 см

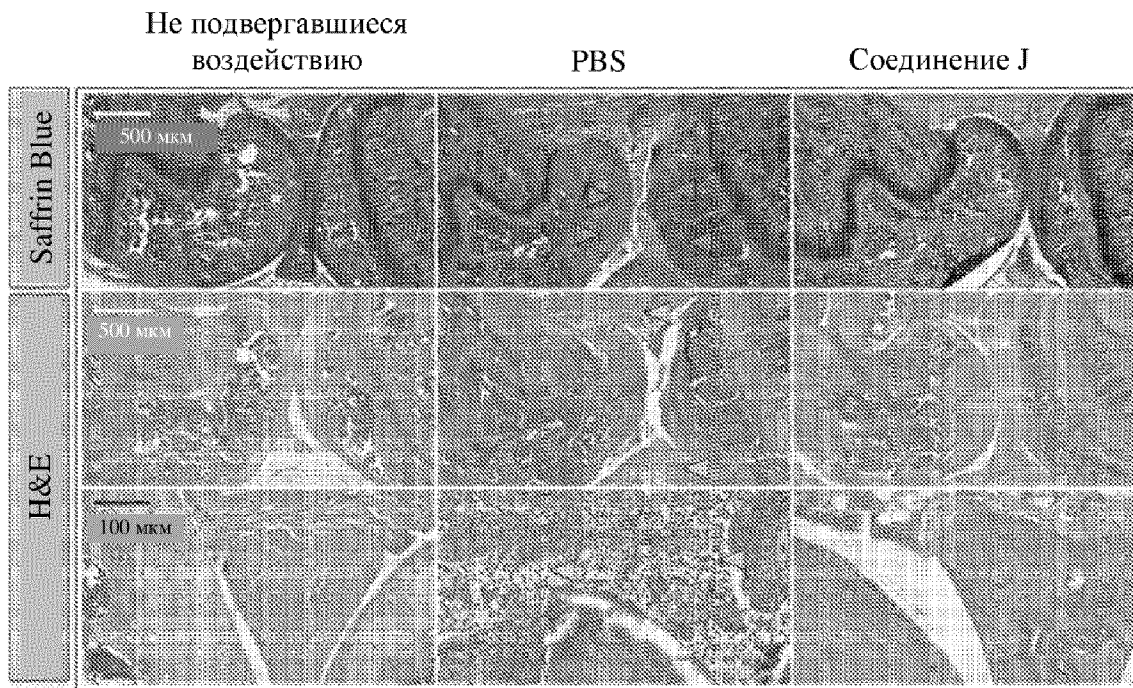
Фиг. 22А



Фиг. 22В



Фиг. 23

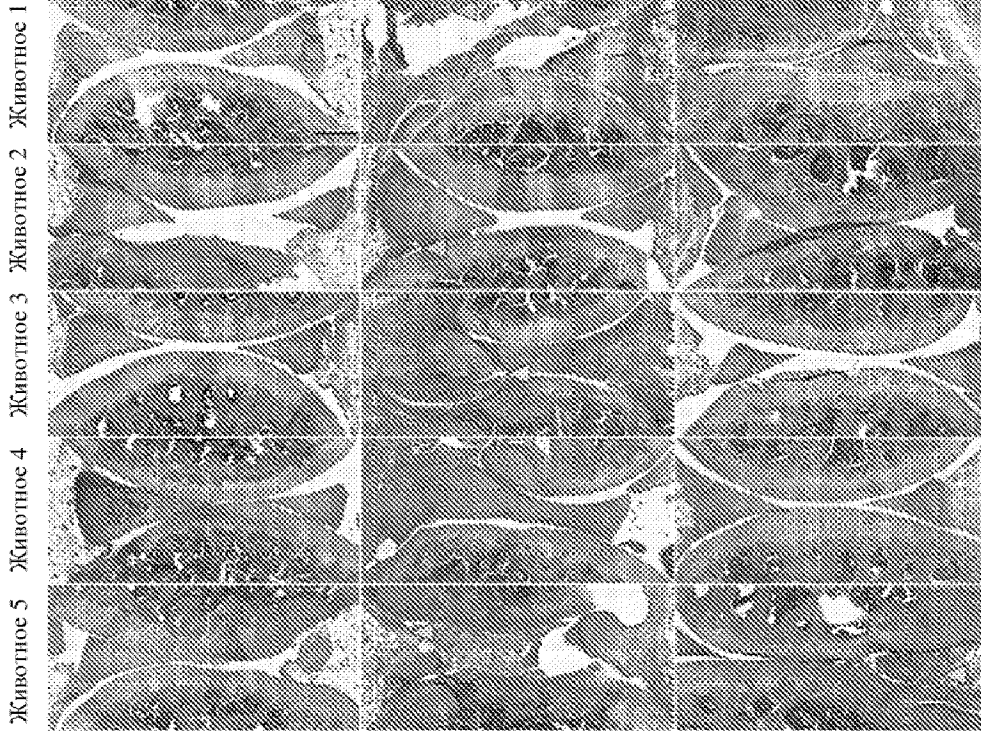


Масштабный отрезок = 500 мкм (белый) или 100 мкм (черный)

Не подвергавшиеся  
воздействию

**Фиг. 24А**  
PBS

Соединение J

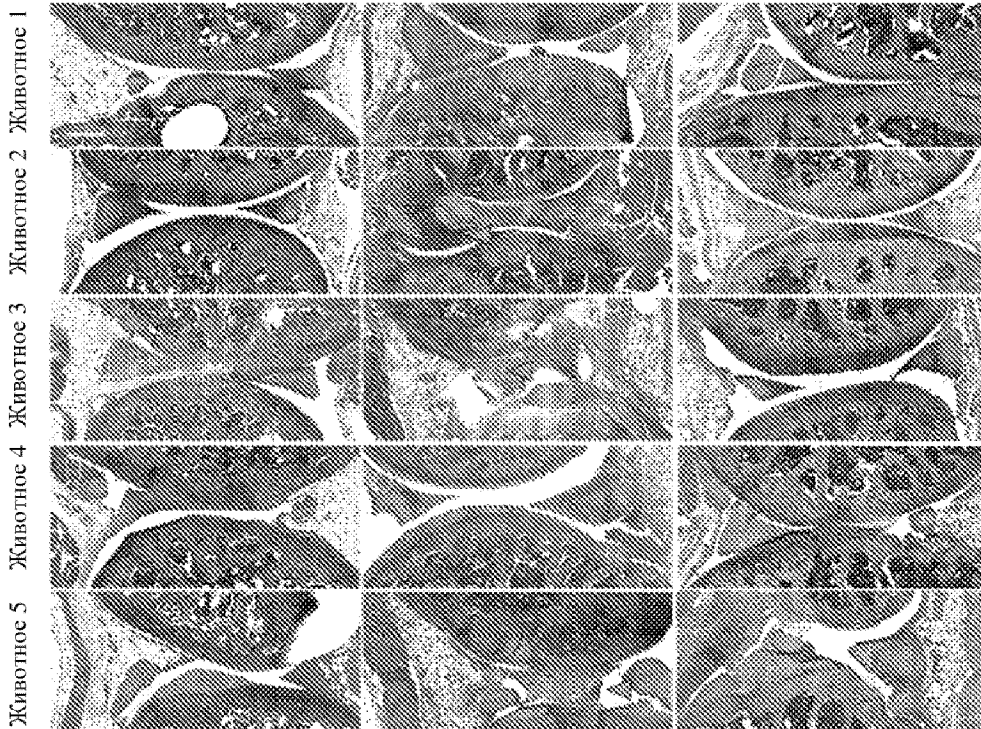


Масштабный отрезок = 200 мкм

Не подвергавшиеся  
воздействию

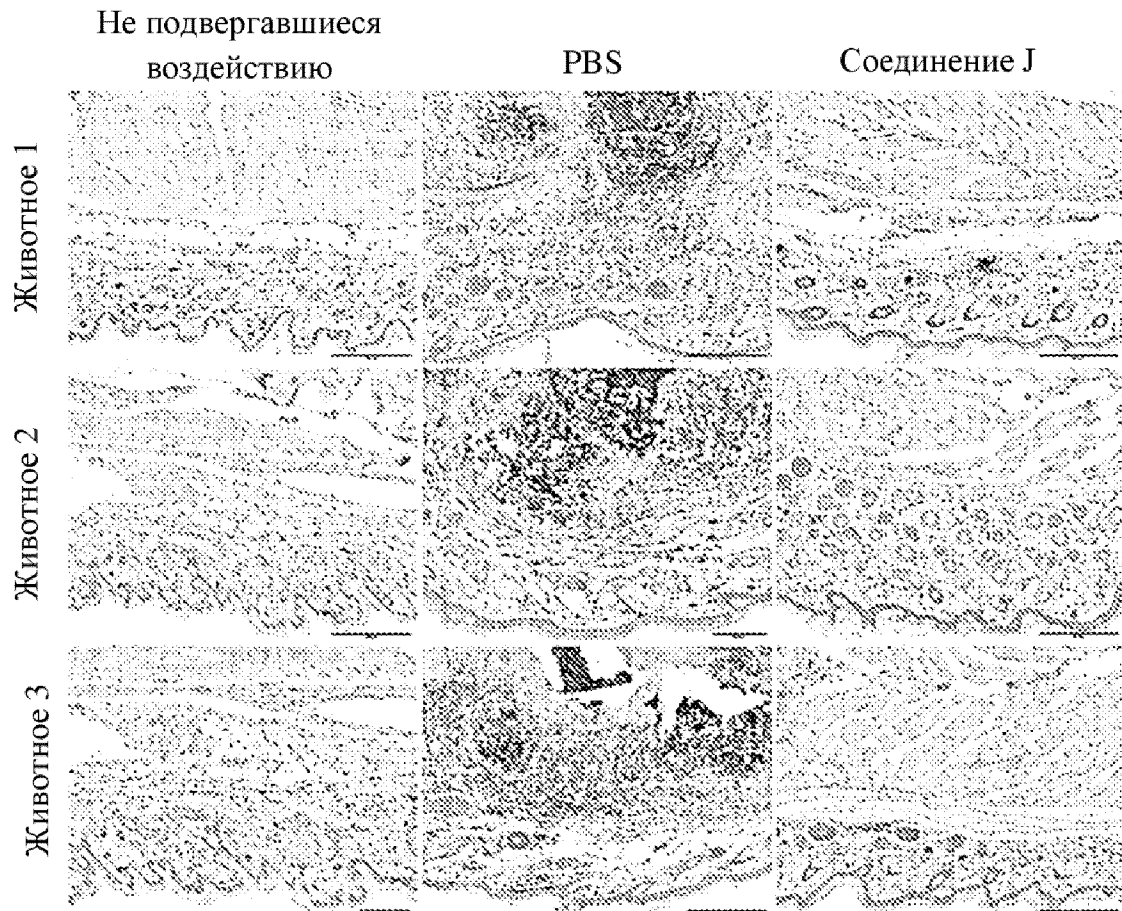
**Фиг. 24В**  
PBS

Соединение J



Масштабный отрезок = 200 мкм

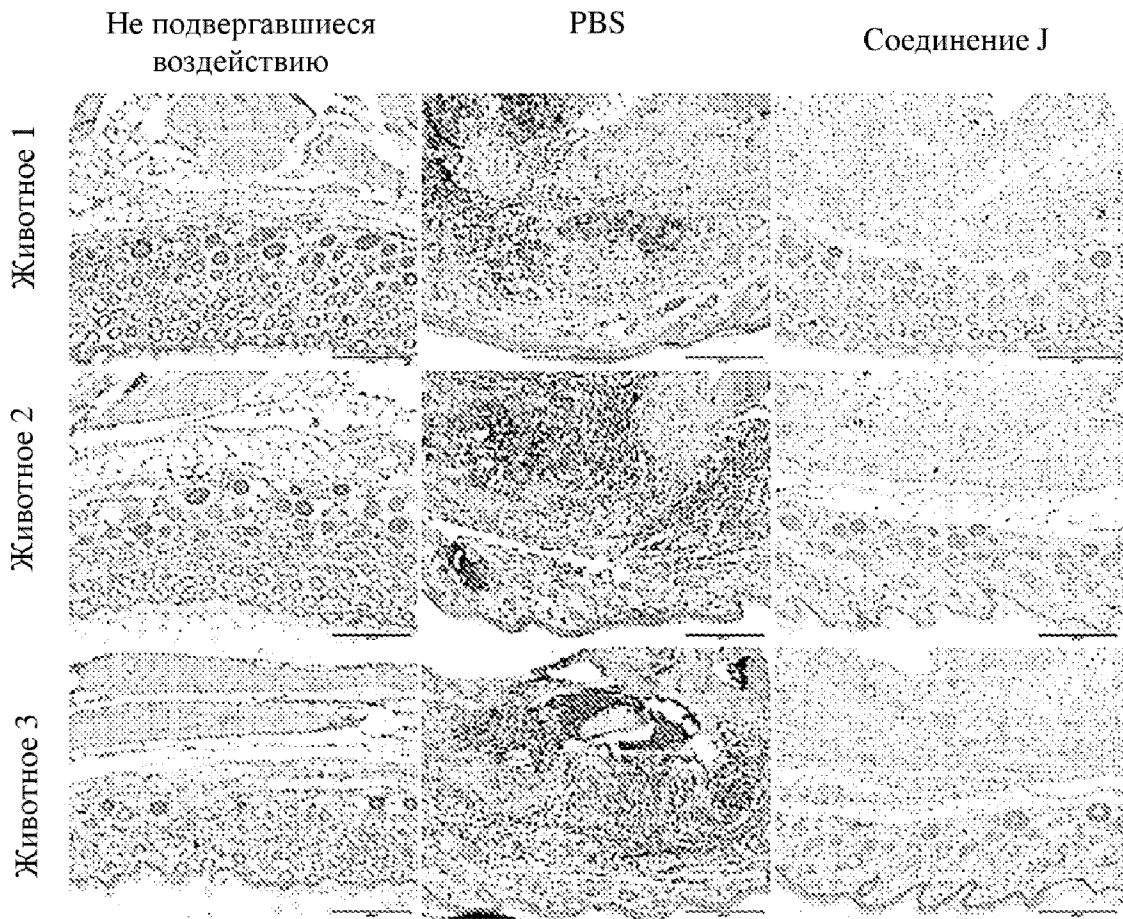
Фиг. 25



Масштабный отрезок = 200 мкм

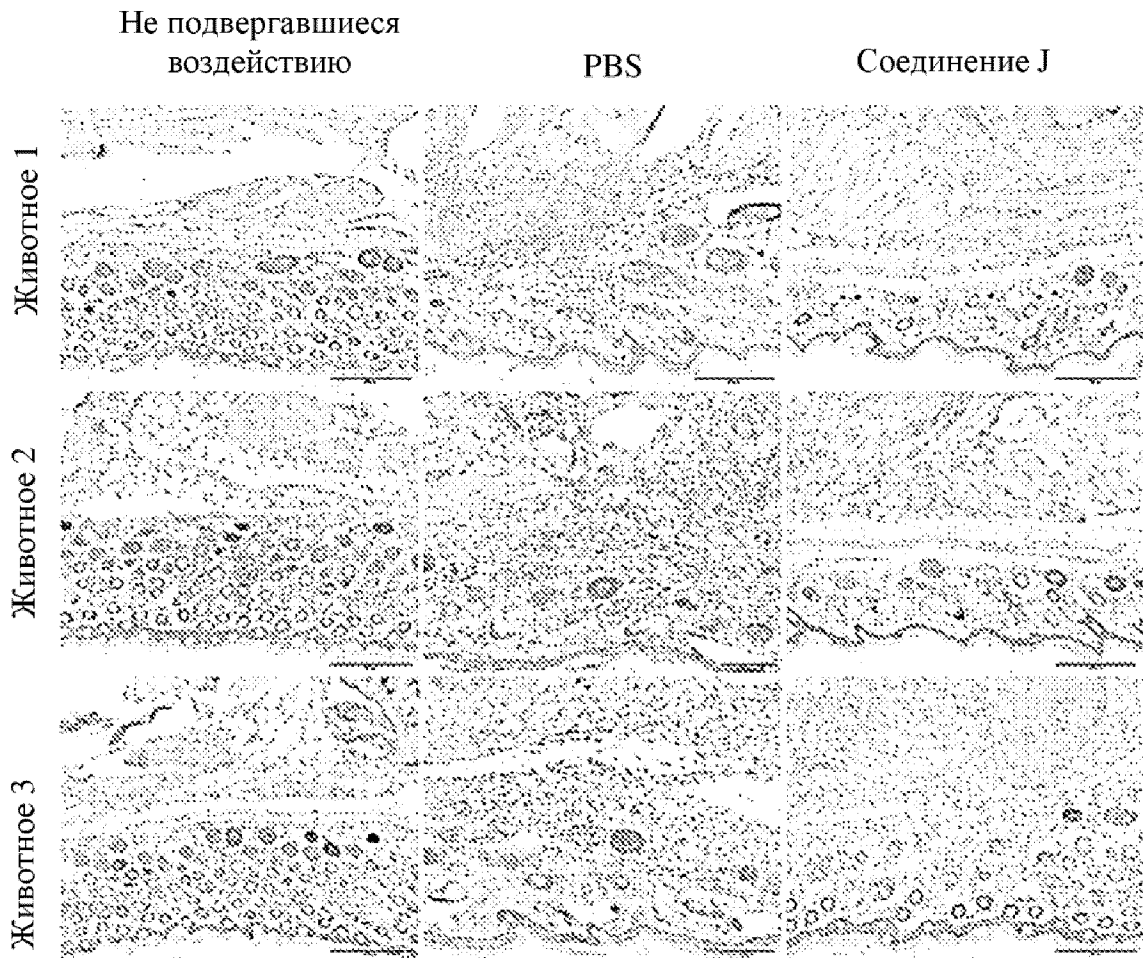


Фиг. 26



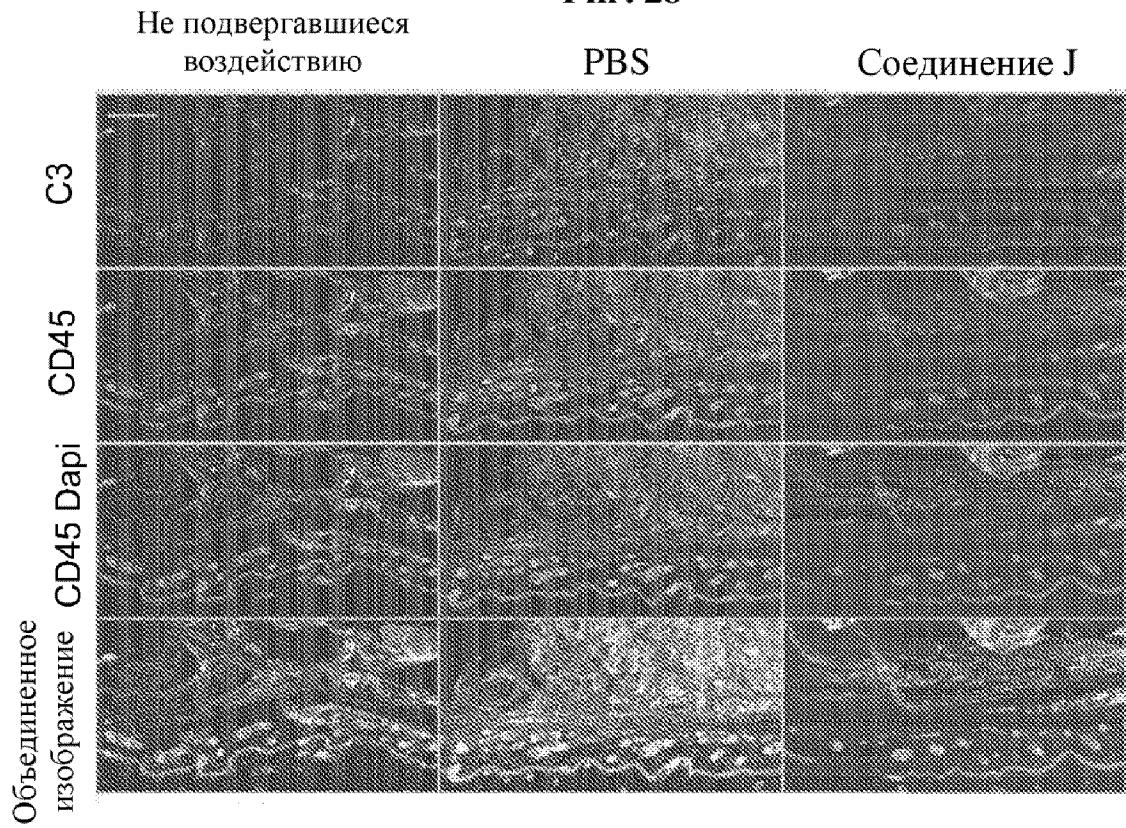
Масштабный отрезок = 200 мкм

Фиг. 27



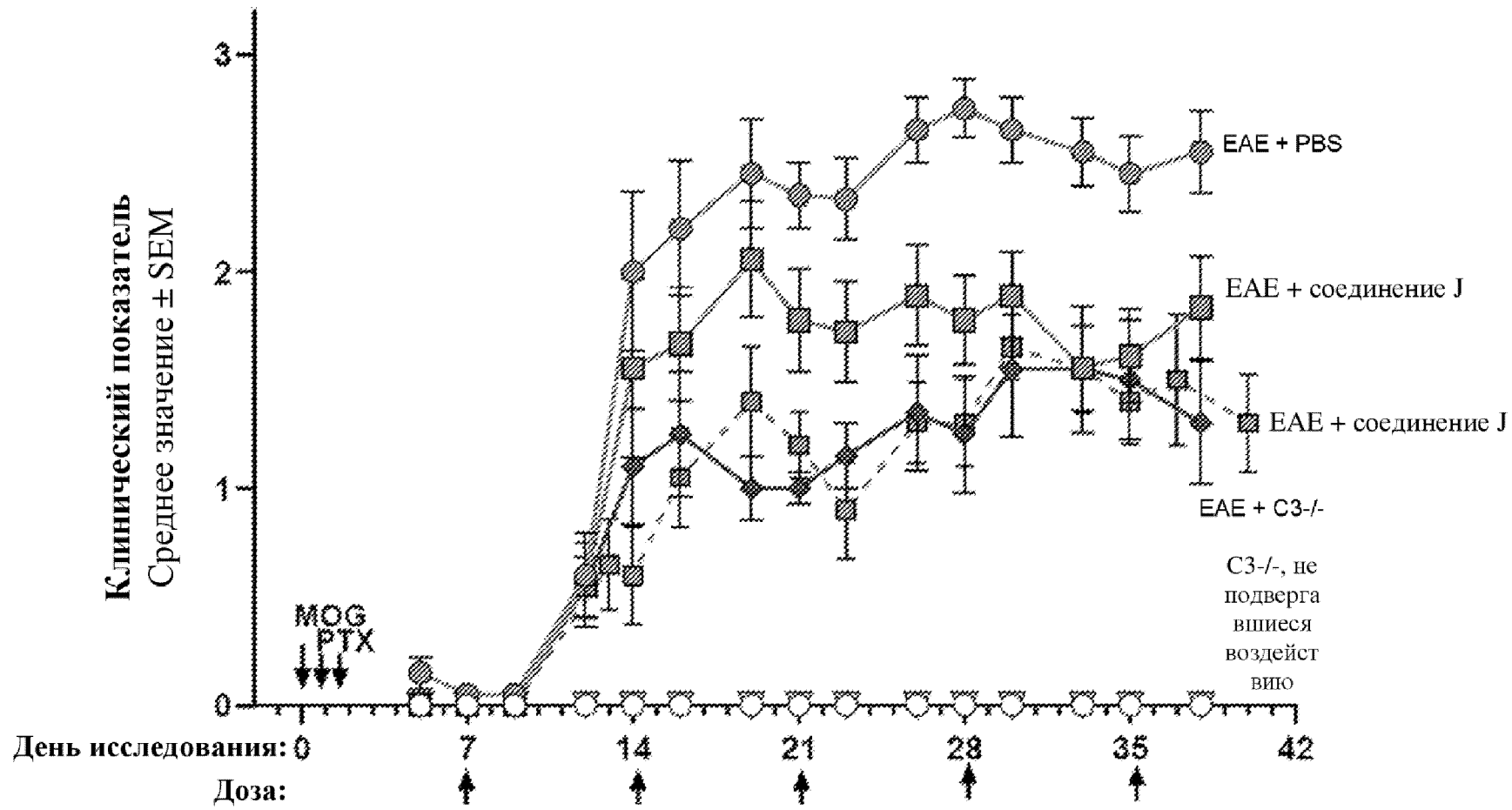
Масштабный отрезок = 200

Фиг. 28

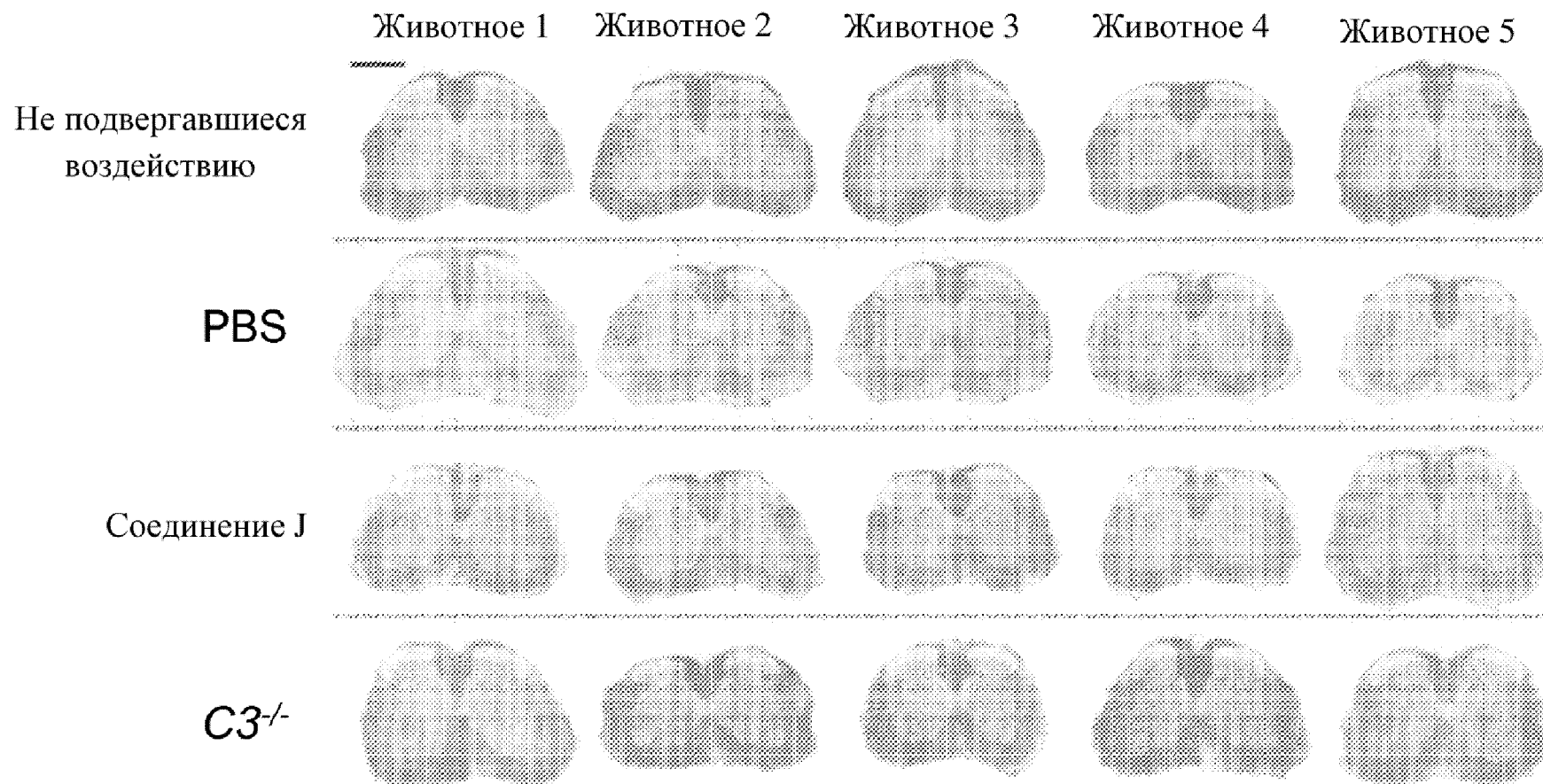


Масштабный отрезок = 200 мкм

Фиг. 29



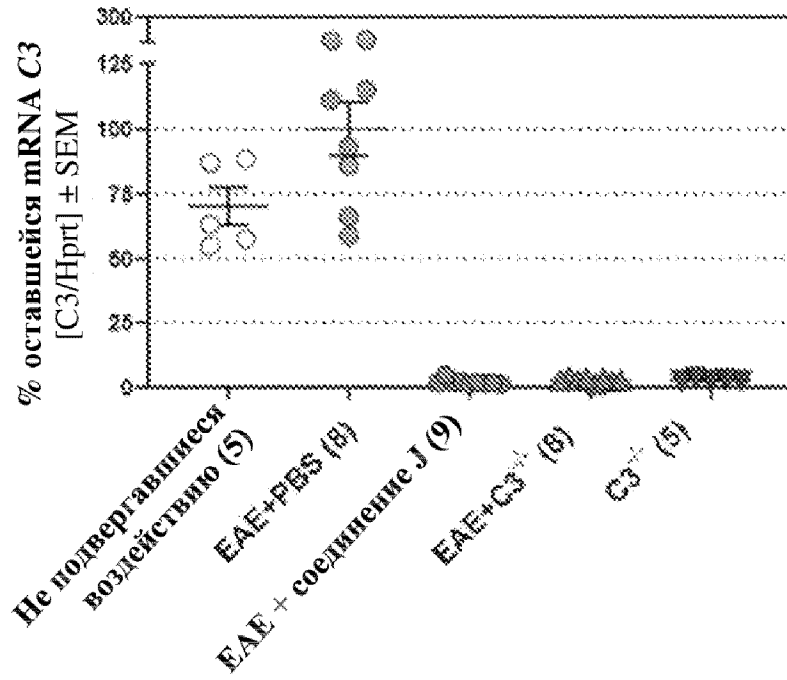
Фиг. 30



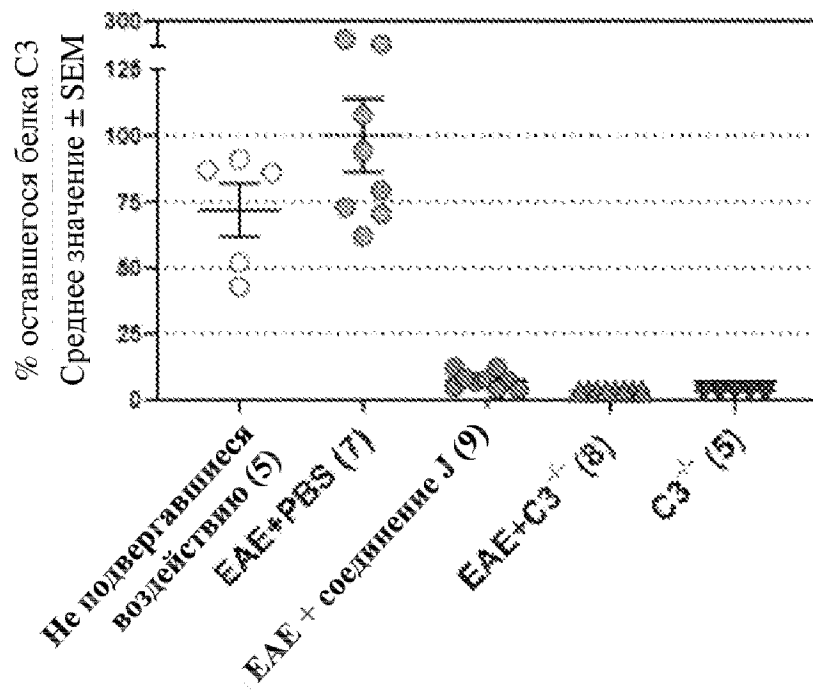
38/43

Масштабный отрезок = 500 мкм

Фиг. 31А

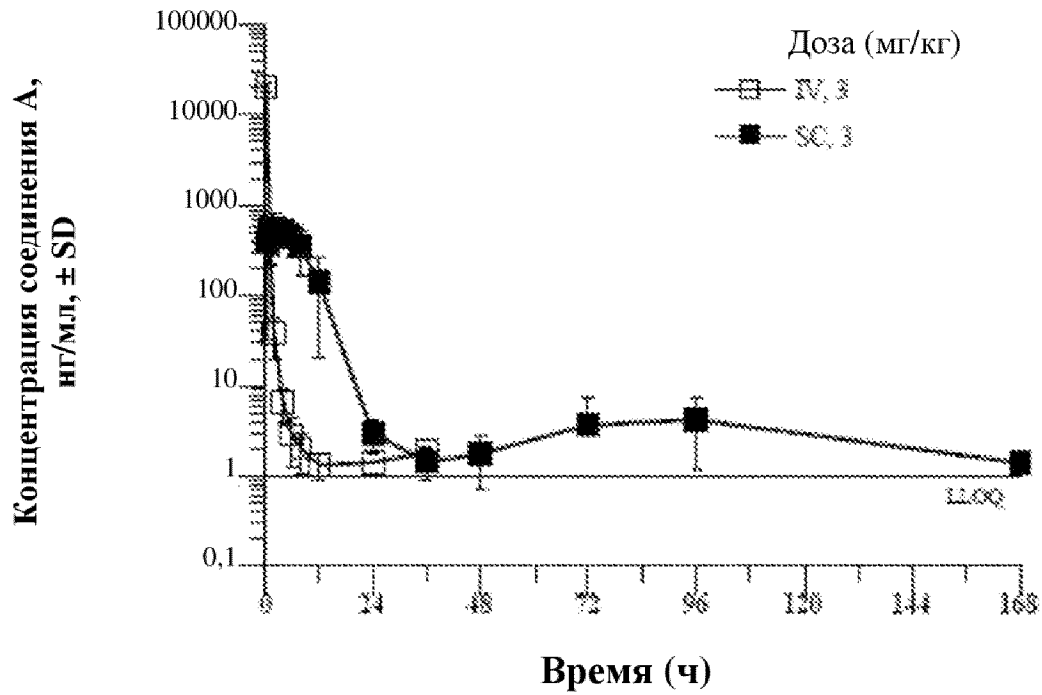


Фиг. 31В

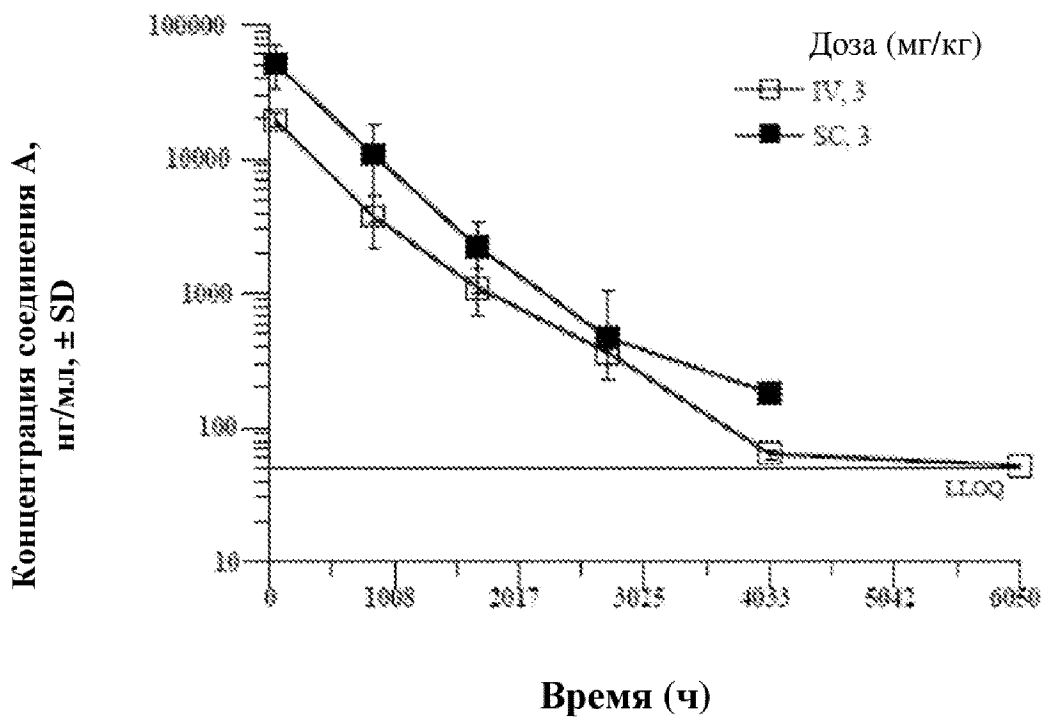


40/43

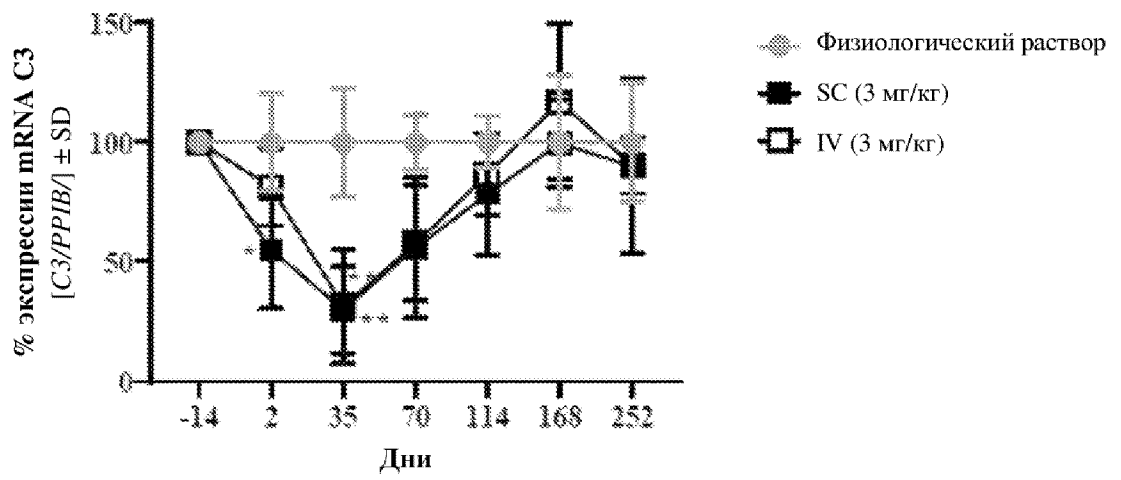
Фиг. 32А



Фиг. 32В



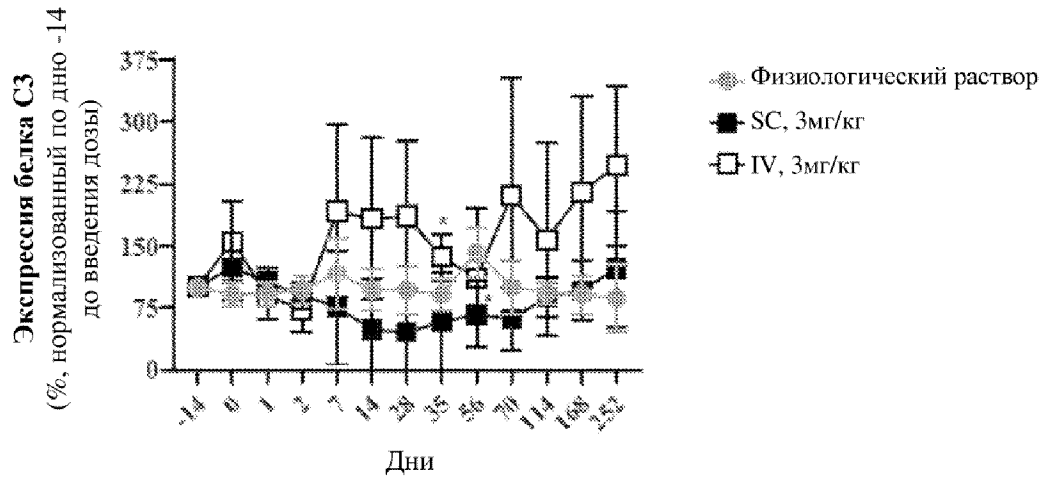
Фиг. 33



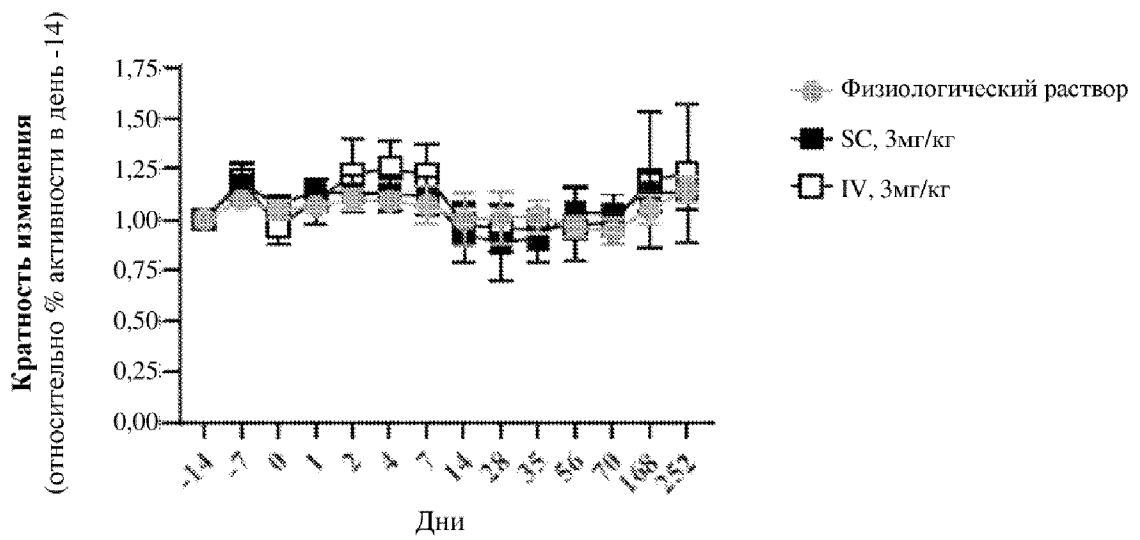
\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$



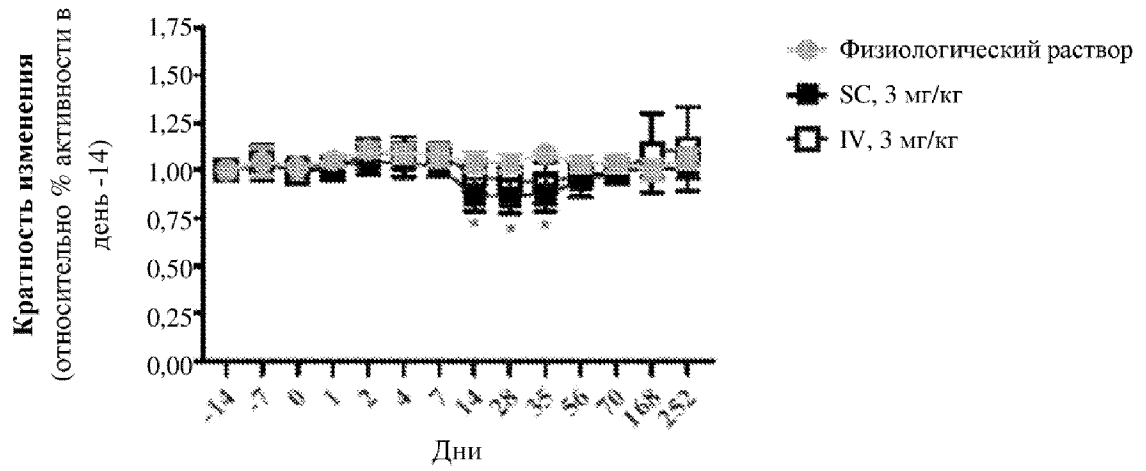
Фиг. 34

\*  $p < 0,05$ 

Фиг. 35

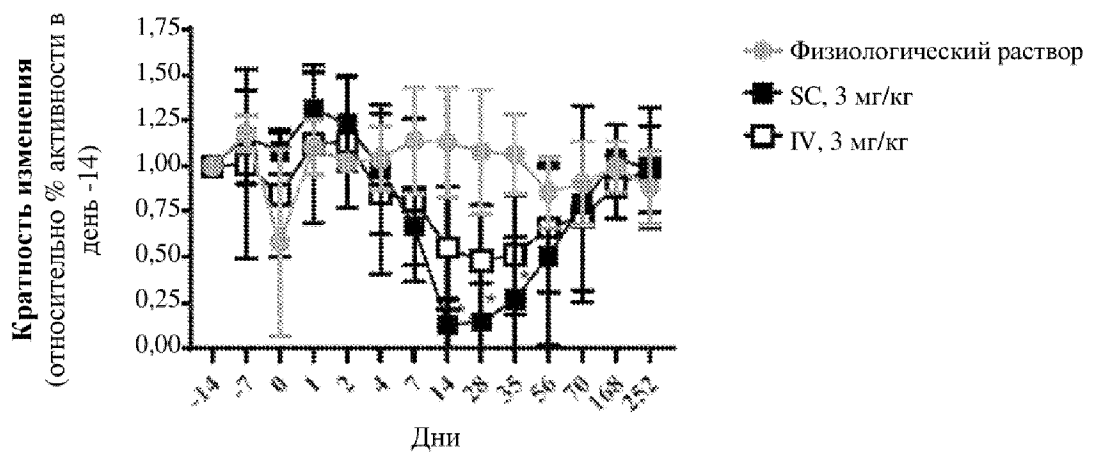


Фиг. 36



\* p &lt; 0.05

Фиг. 37



\* p &lt; 0,05