

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491775** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.18

(22) Дата подачи заявки
2023.01.20

(51) Int. Cl. *A61K 31/713* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ФАКТОРА В СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

(31) **63/301,454; 63/328,629**

(32) **2022.01.20; 2022.04.07**

(33) **US**

(86) **PCT/US2023/011200**

(87) **WO 2023/141247 2023.07.27**

(88) **2023.08.31**

(71) Заявитель:
**АСТРАЗЕНЕКА АЙРЛЭНД
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:

**Лазаро Мелисса, Макнайт Сьюзан
Фаас, Дудек Хенрик Т., Парк Джихе,
Браун Боб Дейл, Лай Чэнцзюн, Ким
СонКвон, Бизли Кэтлин Николь (US)**

(74) Представитель:

**Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) В данном документе описаны олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi), содержащие смысловую и антисмысловую нити, для нацеливания на мРНК фактора В системы комплемента (CFB). Олигонуклеотид для RNAi можно применять для подавления экспрессии, уровней и/или активности CFB 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 активации системы комплемента.

A1

202491775

202491775

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ФАКТОРА В СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка подается вместе с перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием 50694-092WO3_Sequence_Listing_1_19_23_ST26.xml, созданного 19 января 2023 года, размер которого составляет 394,2 килобайта. 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 активируется на низком уровне посредством процесса, называемого "холостой активацией", и который может быть усилен бактериальными патогенами или поверхностями поврежденных тканей, и лектинового пути, который инициируется остатками маннозы, обнаруживаемыми у определенных микроорганизмов, включая определенные бактерии, грибы и вирусы. Неконтролируемая активация или недостаточная регуляция пути активации системы комплемента может привести к системному воспалению, повреждению клеток и угрозе для тканей. Таким образом, было установлено, что путь активации системы комплемента вовлечен в патогенез ряда различных заболеваний. Подавление или модулирование активности пути активации системы комплемента признано 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 активации системы комплемента, представляет значительную неудовлетворенную потребность.

Фактор В системы комплемента (CFB) представляет собой компонент пути активации

комплемента, который инициирует каскад альтернативного пути активации системы комплемента. CFB расщепляется на фрагменты Va и Vb. Фрагмент Vb ассоциирует с C3b, и вместе они образуют C3-конвертазу, которая является неотъемлемой частью активации альтернативного пути активации системы комплемента. Было установлено, что нарушение регуляции или чрезмерная активация CFB связаны с некоторыми заболеваниями, включая пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), рассеянный склероз и ревматоидный артрит.

Существует потребность в композициях и способах, которые можно применять для подавления или сайленсинга CFB у субъекта с заболеванием, ассоциированным с активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

В первом аспекте настоящего изобретения предусмотрены олигонуклеотиды для RNAi или их фармацевтически приемлемая соль (например, их натриевая соль) для снижения экспрессии фактора В системы комплемента (CFB), при этом олигонуклеотид содержит смысловую нить и антисмысловую нить. Смысловая нить и антисмысловая нить олигонуклеотида образуют дуплексную область. Антисмысловая нить олигонуклеотида содержит область комплементарности по отношению к последовательности-мишени мРНК CFB, например, SEQ ID NO: 13 или 14, и область комплементарности имеет длину по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов (например, имеет длину по меньшей мере 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 смежных нуклеотидов). В одном варианте осуществления смысловая нить имеет длину 15-50 нуклеотидов (например, имеет длину 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 или 50 нуклеотидов). В одном варианте осуществления смысловая нить имеет длину 18-36 нуклеотидов (например, имеет длину 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 нуклеотидов). В одном варианте осуществления антисмысловая нить имеет длину 15-30 нуклеотидов (например, имеет длину 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов).

В одном варианте осуществления антисмысловая нить олигонуклеотида имеет длину 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 смысловая нить имеет длину 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 область комплементарности имеет длину по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, необязательно имеет длину по меньшей мере 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления 3'-конец смысловой нити олигонуклеотида содержит структуру стебель-петля, представленную в виде S1-L-S2, в которой S1 комплементарен S2, и в которой L образует петлю между S1 и S2, имеющую длину 3-5 нуклеотидов (например, 3, 4 или 5 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления L представляет собой трипетлю или тетрапетлю. В одном варианте осуществления L представляет собой тетрапетлю. В одном варианте осуществления тетрапетля содержит последовательность нуклеиновой кислоты 5'-GAAA-3'.

В некоторых вариантах осуществления S1 и S2 структуры стебель-петля имеют длину 1-10 нуклеотидов (например, имеют длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов). S1 и S2 могут иметь одну и ту же длину. В некоторых вариантах осуществления S1 и S2 имеют длину 1 нуклеотид, 2 нуклеотида, 3 нуклеотида, 4 нуклеотида, 5 нуклеотидов, 6 нуклеотидов, 7 нуклеотидов, 8 нуклеотидов, 9 нуклеотидов или 10 нуклеотидов. В одном варианте осуществления S1 и S2 имеют длину 6 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления область структуры стебель-петля 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 последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления область структуры стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты с по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с последовательностью нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления структура стебель-петля содержит последовательность 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3' (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления структура стебель-петля содержит нуклеиновую кислоту с заменами, вставками или делециями нуклеиновой кислоты в количестве вплоть до 1, 2 или 3 относительно последовательности под SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить олигонуклеотида содержит последовательность 3'-выступающего конца длиной один или несколько нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит 3'-выступающий конец из по меньшей мере 2 связанных нуклеотидов. В одном варианте осуществления последовательность 3'-выступающего конца имеет длину 2 нуклеотида, как, например, последовательность представляет собой GG. В некоторых вариантах осуществления смысловая нить содержит 5'-выступающий конец из по меньшей мере 2 связанных нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит от 20 до 50 модифицированных нуклеотидов (например, 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 или 50 модифицированных нуклеотидов). 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 одном варианте осуществления все нуклеотиды олигонуклеотида являются модифицированными.

Модифицированный нуклеотид может содержать 2'-модификацию. В некоторых вариантах осуществления 2'-модификация представляет собой модификацию, выбранную из 2'-аминоэтила, 2'-фтора, 2'-О-метила, 2'-О-метоксиэтила и 2'-дезоксид-2'-фтор-β-d-арабинонуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления 2'-модификация представляет собой 2'-фтор или 2'-О-метил, при этом необязательно 2'-фтор-модификация представляет собой 2'-фтордезоксирибонуклеозид, и/или 2'-О-метил-модификация представляет собой 2'-О-метилрибонуклеозид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержит от 40 до 50 (например, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50) 2'-О-метил-модификаций, при этом необязательно олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержит от 40 до 50 (например, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50) 2'-О-метилрибонуклеозидов.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и по меньшей мере один из нуклеотидов 1, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, как, например, в случае 2'-О-метилрибонуклеозида. В некоторых вариантах осуществления от 10 до 29 (например, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29) из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и от 10 до 16 (например, 11, 12, 13, 14,

15 или 16) из нуклеотидов 1, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, как, например, в случае 2'-О-метилрибонуклеозида. В одном варианте осуществления все из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и все из нуклеотидов 1, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, как, например, в случае 2'-О-метилрибонуклеозида. В другом варианте осуществления все из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и все из нуклеотидов 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, как, например, в случае 2'-О-метилрибонуклеозида.

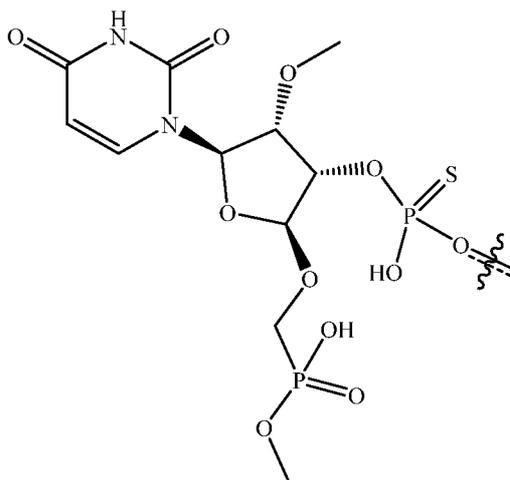
В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержит от 5 до 15 (например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15) 2'-фтор-модифицированных нуклеотидов, как, например, 2'-фтордезоксирибонуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и по меньшей мере один из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, как, например, в случае 2'-фтордезоксирибонуклеозида. В некоторых вариантах осуществления от 2 до 4 (например, 2, 3 и 4) из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и от 2 до 7 (например, 2, 3, 4, 5, 6 и 7) из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, как, например, в случае 2'-фтордезоксирибонуклеозида. В одном варианте осуществления все из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и все из нуклеотидов 2, 3, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, как, например, в случае 2'-фтордезоксирибонуклеозида. В другом варианте осуществления все из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и все из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеотида, как, например, в случае 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

В одном варианте осуществления смысловая нить имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 37, а антисмысловая нить имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 38. В другом варианте осуществления смысловая нить имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 66, а антисмысловая нить имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 67.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержит по меньшей мере одну модифицированную

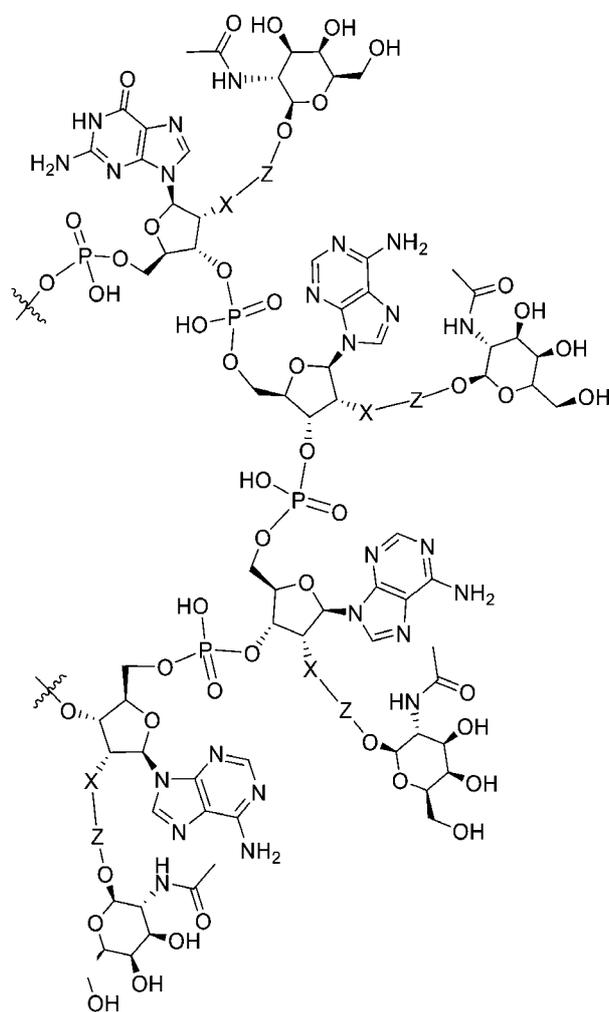
межнуклеотидную связь. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь представляет собой фосфотиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль содержит фосфотиоатную связь между нуклеотидами 1 и 2 смысловой нити и нуклеотидами 1 и 2, 2 и 3, 20 и 21 и 21 и 22 антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления межнуклеотидная связь между смысловой нитью и антисмысловой нитью отсутствует.

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



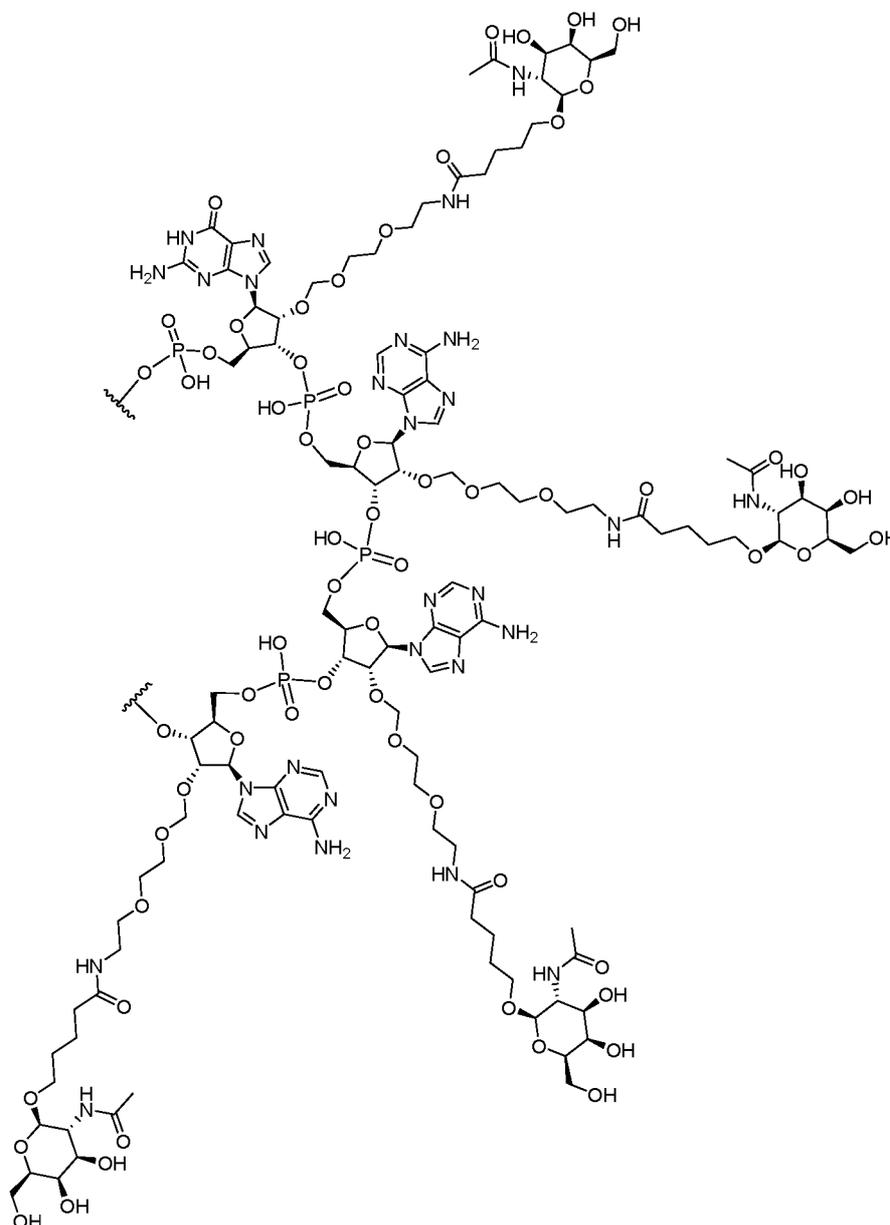
В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один нуклеотид олигонуклеотида конъюгирован с одним или несколькими нацеливающими лигандами. В некоторых вариантах осуществления каждый нацеливающий лиганд содержит углевод, аминокислоту, холестерин, полипептид или липид. В некоторых вариантах осуществления каждый нацеливающий лиганд содержит N-ацетилгалактозаминный фрагмент (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 содержит от одного до пяти (например, 1, 2, 3, 4 и 5) 2'-*O*-N-ацетилгалактозаминных фрагментов (GalNAc), конъюгированных со смысловой нитью. В одном варианте осуществления вплоть до 4 нуклеотидов L структуры стебель-петля конъюгированы с моновалентным фрагментом GalNAc. В одном варианте

осуществления 3 нуклеотида L структуры стебель-петля конъюгированы с моновалентным фрагментом GalNAc. В некоторых вариантах осуществления один или несколько из нуклеотидов в положениях нуклеотидов 28-30 в смысловой нити конъюгированы с моновалентным фрагментом GalNAc. В одном варианте осуществления каждый из нуклеотидов в положениях 28-30 любой из SEQ ID NO: 1, 4, 17, 19, 21, 23, 25, 27 и 29 (и ее вариантов с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по отношению к ней) конъюгирован с моновалентным фрагментом GalNAc. В одном варианте осуществления нуклеотиды в положениях 28-30 любой из SEQ ID NO: 1, 4, 17, 19, 21, 23, 25, 27 и 29 (и ее вариантов с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по отношению к ней) содержат структуру:



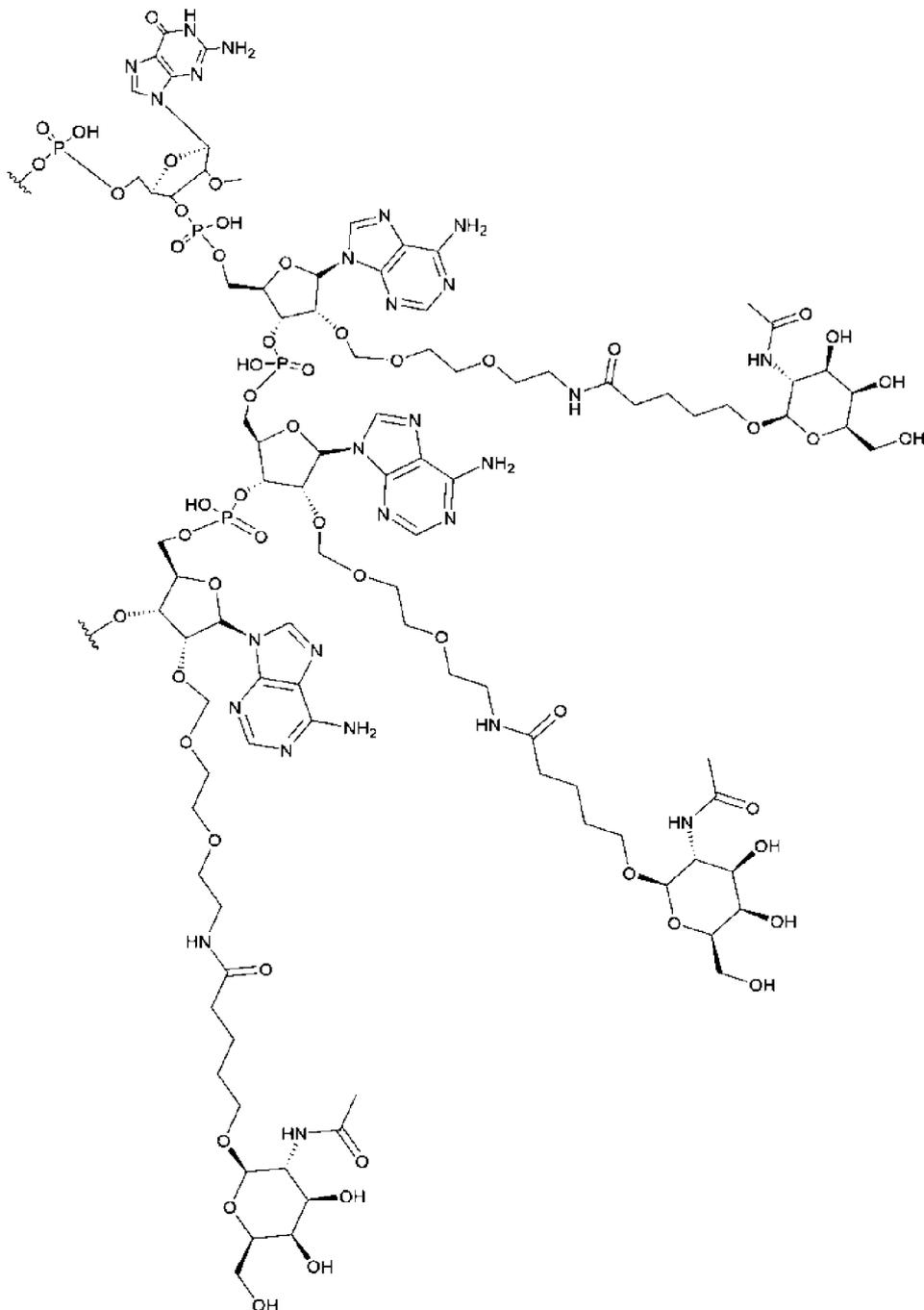
в которой Z представляет собой связь, функциональную группу для реакции клик-химии или линкер длиной от 1 до 20 включительно последовательных ковалентно связанных атомов, выбранные из группы, состоящей из замещенного и незамещенного алкилена, замещенного и незамещенного алкенилена, замещенного и незамещенного 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 одном варианте осуществления нуклеотиды в положениях 28-30 любой из SEQ ID NO: 1, 4, 17, 19, 21, 23, 25, 27 и 29 (и ее вариантов с по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по отношению к ней) содержат структуру:



В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi в данном документе или его фармацевтически приемлемая соль содержит смысловую нить, имеющую тетрапетлю, где три (3) фрагмента GalNAc конъюгированы с нуклеотидами, составляющими тетрапетлю, 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, имеющую тетрапетлю, содержащую GalNAc-конъюгированные нуклеотиды, где тетрапетля содержит

следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления смысловая нить олигонуклеотида для RNAi или его фармацевтически приемлемой соли содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся 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, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся 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 содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 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 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 SEQ ID NO: 1 и 3 соответственно и SEQ ID NO: 4 и 6 соответственно.

В одном варианте осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся 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, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся 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. В другом варианте осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся 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: 4, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся 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: 6. В одном варианте осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 1, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 3. В другом варианте осуществления смысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по

меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 4, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 95% (например, по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%) идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 6. В другом варианте 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 другом варианте 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 одном варианте осуществления смысловая нить имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 37, и антисмысловая нить имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 38. В одном варианте осуществления смысловая нить имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 66, и антисмысловая нить имеет последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 67.

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

Во втором аспекте настоящего изобретения предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая любой из РНК-олигонуклеотидов или его фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

В третьем аспекте настоящего изобретения предусмотрен вектор, кодирующий одну или обе из смысловой и антисмысловой нитей олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемой соли, описанных в данном документе.

В четвертом аспекте настоящего изобретения предусмотрена клетка, содержащая вектор, кодирующий все или часть из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемой соли, описанных в данном документе.

В пятом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ лечения субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, ассоциированным с активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции CFB), включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества любого одного или нескольких из олигонуклеотидов для RNAi или их фармацевтически приемлемой соли, описанных в данном документе, или фармацевтической композиции, содержащей их, вектора, кодирующего их, или клетки,

содержащей олигонуклеотид(олигонуклеотиды) или вектор(векторы), описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi разрушает мРНК-транскрипт CFB в клетке субъекта. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CFB в клетке субъекта снижена. В некоторых вариантах осуществления экспрессия CFB в клетке субъекта снижена на от 10% до 100% (например, от 10% до 90%, от 10% до 70%, от 10% до 50%, от 10% до 30%, от 20% до 100%, от 40% до 100%, от 60% до 100% и от 80% до 100%) относительно уровня экспрессии CFB в клетке субъекта, которому не вводят олигонуклеотид для RNAi, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления уровень и/или активность CFB у субъекта снижены. В некоторых вариантах осуществления уровень и/или активность CFB снижены на от 10% до 100% (например, от 10% до 90%, от 10% до 70%, от 10% до 50%, от 10% до 30%, от 20% до 100%, от 40% до 100%, от 60% до 100% и от 80% до 100%) относительно уровня и/или активности CFB у субъекта, которому не вводят олигонуклеотид для RNAi, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления уровень и/или активность CFB снижены на от 50% до 100% (например, от 50% до 90%, от 50% до 80%, от 50% до 70%, от 50% до 60%, от 60% до 100%, от 70% до 100%, от 80% до 100% и от 90% до 100%) относительно уровня и/или активности CFB у субъекта, которому не вводят олигонуклеотид для RNAi, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления введение олигонуклеотида для RNAi, фармацевтической композиции, вектора или клетки, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом, приводит к снижению количества CFB, циркулирующего в крови субъекта, по сравнению с субъектом, которому не вводят олигонуклеотид для RNAi, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе (субъектом, не получающим лечение). Количество CFB в крови субъекта, получающего лечение, может быть снижено до менее чем 1000 мкг/мл, 900 мкг/мл, 800 мкг/мл, 700 мкг/мл, 600 мкг/мл, 500 мкг/мл, 400 мкг/мл, 300 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл или 50 мкг/мл или меньше. Например, введение олигонуклеотида для RNAi, фармацевтической композиции, вектора или клетки, описанных в данном документе, может приводить к снижению количества CFB в крови субъекта, получающего лечение, до диапазона 50-1000 мкг/мл (например, диапазона 50-900 мкг/мл, 50-800 мкг/мл, 50-700 мкг/мл, 50-600 мкг/мл, 50-500 мкг/мл, 50-400 мкг/мл, 50-300 мкг/мл или 50-200 мкг/мл) или до менее чем 50 мкг/мл.

В одном варианте осуществления пятого аспекта субъект является млекопитающим, как, например, человеком.

В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль, фармацевтическая композиция, вектор или клетка составлены для введения один раз в день, 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 одном варианте осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль, фармацевтическая композиция, вектор или клетка составлены для подкожного введения. В одном варианте осуществления олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль, фармацевтическая композиция, вектор или клетка составлены для введения в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 150 мг/кг (например, от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг, от 1 мг/кг до 150 мг/кг, от 50 мг/кг до 150 мг/кг и от 100 мг/кг до 150 мг/кг).

В шестом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ снижения экспрессии *CFB* в клетке, популяции клеток или у субъекта путем приведения клетки, популяции клеток или субъекта в контакт с олигонуклеотидом(олигонуклеотидами) (например, олигонуклеотидом для RNAi) по настоящему изобретению или фармацевтической композицией, содержащей олигонуклеотид(олигонуклеотиды), вектором, кодирующим олигонуклеотид(олигонуклеотиды), или клеткой, содержащей вектор, описанными в данном документе. Субъекту можно вводить олигонуклеотид(олигонуклеотиды) (например, олигонуклеотид(олигонуклеотиды) для RNAi) по настоящему изобретению или фармацевтическую композицию, содержащую олигонуклеотид(олигонуклеотиды), вектор, кодирующий олигонуклеотиды, или клетку, содержащую вектор, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии *CFB* включает снижение количества или уровня мРНК *CFB*, количества или уровня белка *CFB* или и того и другого. В некоторых вариантах осуществления уровень мРНК *CFB*, уровень белка *CFB* или и того и другого снижается на от 10% до 100% (например, от 10% до 80%, от 10% до 60%, от 10% до 40%, от 10% до 20%, от 20% до 100%, от 40% до 100%, от 60% до 100% и от 80% до 100%) относительно уровня мРНК *CFB*, уровня белка *CFB* или и того и другого в клетке субъекта, которому не вводят олигонуклеотид(олигонуклеотиды) (например, олигонуклеотид(олигонуклеотиды) для RNAi), фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе. В некоторых вариантах

осуществления уровень мРНК *CFB*, уровень белка *CFB* или и того и другого снижается на от 50% до 100% (например, от 50% до 90%, от 50% до 80%, от 50% до 70%, от 50% до 60%, от 60% до 100%, от 70% до 100%, от 80% до 100% и от 90% до 100%) относительно уровня мРНК *CFB*, уровня белка *CFB* или и того и другого в клетке субъекта, которому не вводят олигонуклеотид для *RNAi*, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления введение олигонуклеотида для *RNAi*, фармацевтической композиции, вектора или клетки, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом, приводит к снижению количества *CFB*, циркулирующего в крови субъекта, по сравнению с субъектом, которому не вводят олигонуклеотид для *RNAi*, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе (субъектом, не получающим лечение). Количество *CFB* в крови субъекта, получающего лечение, может быть снижено до менее чем 1000 мкг/мл, 900 мкг/мл, 800 мкг/мл, 700 мкг/мл, 600 мкг/мл, 500 мкг/мл, 400 мкг/мл, 300 мкг/мл, 200 мкг/мл, 100 мкг/мл или 50 мкг/мл или меньше. Например, введение олигонуклеотида для *RNAi*, фармацевтической композиции, вектора или клетки, описанных в данном документе, может приводить к снижению количества *CFB* в крови субъекта, получающего лечение, до диапазона 50-1000 мкг/мл (например, диапазона 50-900 мкг/мл, 50-800 мкг/мл, 50-700 мкг/мл, 50-600 мкг/мл, 50-500 мкг/мл, 50-400 мкг/мл, 50-300 мкг/мл или 50-200 мкг/мл) или до менее чем 50 мкг/мл.

В седьмом аспекте настоящего изобретения предусмотрен набор, содержащий олигонуклеотид(олигонуклеотиды) (например, олигонуклеотид(олигонуклеотиды) для *RNAi*), фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит фармацевтическую композицию, которая содержит олигонуклеотид для *RNAi* или его фармацевтически приемлемую соль — средство, которое снижает уровень и/или активность *CFB* в клетке или у субъекта, как описано в данном документе, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель. В некоторых вариантах осуществления набор содержит вектор, кодирующий любой из олигонуклеотидов для *RNAi*, фармацевтические композиции, векторы или клетки, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит листок-вкладыш с инструкциями по осуществлению любого из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит фармацевтическую композицию, содержащую средство на основе олигонуклеотида для *RNAi*, фармацевтическую композицию, вектор или клетку, описанные в данном документе, которые снижают уровень и/или активность *CFB* в клетке или у субъекта; дополнительное терапевтическое

средство и листок-вкладыш с инструкциями по осуществлению любого из способов, описанных в данном документе.

В восьмом аспекте в настоящем изобретении описывается применение олигонуклеотида(олигонуклеотидов) (например, олигонуклеотида(олигонуклеотидов) для RNAi), фармацевтической композиции, вектора или клетки, описанных в данном документе, для применения в профилактике или лечении заболевания, нарушения или состояния, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции CFB), у субъекта, нуждающегося в этом.

В любом из пятого, шестого или восьмого аспектов у субъекта идентифицировано наличие заболевания, нарушения или состояния, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции CFB). В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой пароксизмальную ночную гемоглобинурию (PNH), С3-гломерулопатию (С3G), иммуноглобулин-А-нефропатию (IgAN), мембранозную нефропатию (MN), включая первичную MN, индуцированный *E. coli* или типичный гемолитико-уремический синдром (HUS), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), возрастную дегенерацию желтого пятна, географическую атрофию, диабетическую ретинопатию, увеит, средний увеит, увеит при болезни Бехчета, пигментный ретинит, отек желтого пятна, мультифокальный хориоидит, синдром Фогта-Коянаги-Харады, дробьевидную ретинохориоидопатию, симпатическую офтальмию, глазной рубцующий пемфигоид (ОСР), глазную пузырчатку, неартеритную ишемическую невропатию глазного нерва, послеоперационное воспаление, окклюзию вен сетчатки, неврологические нарушения, рассеянный склероз, инсульт, синдром Гийена-Барре, травматическое повреждение головного мозга, болезнь Паркинсона, осложнения гемодиализа, сверхострое отторжение аллотрансплантата, отторжение ксенотрансплантата, токсичность, индуцированную интерлейкином-2 (IL-2) в ходе терапии с IL-2, воспалительные нарушения, воспаление при аутоиммунных заболеваниях, болезнь Крона, респираторный дистресс-синдром взрослых, миокардит, постишемические реперфузионные состояния, инфаркт миокарда, баллонную ангиопластику, постперфузионный синдром при сердечно-легочном шунтировании или почечном шунтировании, атеросклероз, гемодиализ, ишемию почек, реперфузию брыжеечной артерии после реконструкции аорты, инфекционное заболевание или сепсис, формы болезни иммунных комплексов и аутоиммунные заболевания, ревматоидный артрит, системную красную волчанку (SLE), SLE-нефрит, пролиферативный нефрит, фиброз

печени, гемолитическую анемию, тяжелую миастению, регенерацию тканей, нейрорегенерацию, одышку, кровохарканье, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), астму, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), эмфизему, формы легочной эмболии и инфаркта, пневмонию, фиброгенные пылевые заболевания, фиброз легких, аллергию, бронхоспазм, гиперчувствительный пневмонит, паразитарные заболевания, синдром Гудпасчера, легочный васкулит, слабоиммунный васкулит, воспаление, ассоциированное с иммунными комплексами, антифосфолипидный синдром, гломерулонефрит, ожирение, артрит, аутоиммунное заболевание сердца, воспалительное заболевание кишечника, ишемически-реперфузионные повреждения, синдром Барракера-Симонса, гемодиализ, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), криоглобулинемию, псориаз, трансплантацию, заболевания центральной нервной системы, такие как болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные состояния, болезнь плотных отложений, пузырьчатые кожные заболевания, мембранопролиферативный гломерулонефрит II типа (MPGN II), хроническую реакцию "трансплантат против хозяина", синдром Фелти, гангренозную пиодермию (PG), гнойный гидраденит (HS), легочную артериальную гипертензию, первичный синдром Шегрена, первичный билиарный холангит, аутосомно-доминантный поликистоз почек и заболевание, ассоциированное с антителами к миелин-олигодендроцитарному гликопротеину (MOGAD). В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой ревматоидный артрит.

В некоторых вариантах осуществления РНК-олигонуклеотид, описанный в данном документе, включает в себя фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой или включает в себя ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, 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, валерат, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин или этиламин или представляет собой соль щелочного или щелочноземельного металла. В некоторых вариантах осуществления соль щелочного или щелочноземельного металла выбрана из группы, состоящей из натриевой, литиевой, калиевой, кальциевой, магниевой и аммониевой (например, четвертичной

аммониевой и тетраметиламмониевой) соли. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Файл настоящего патента или заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии настоящего патента или публикации заявки на патент с цветным(цветными) графическим(графическими) материалом(материалами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимого сбора.

На **фиг. 1А** показана химическая структура смысловой нити соединения А (SEQ ID NO: 66).

На **фиг. 1В** показана химическая структура антисмысловой нити соединения А (SEQ ID NO: 67).

На **фиг. 1С** показана последовательность нуклеиновой кислоты смысловой (SEQ ID NO: 1) и антисмысловой (SEQ ID NO: 3) нитей соединения А.

На **фиг. 2А** показана химическая структура смысловой нити соединения В (SEQ ID NO: 37).

На **фиг. 2В** показана химическая структура антисмысловой нити соединения В (SEQ ID NO: 38).

На **фиг. 2С** показана последовательность нуклеиновой кислоты смысловой (SEQ ID NO: 4) и антисмысловой (SEQ ID NO: 6) нитей соединения В.

На **фиг. 2D** показан схематический рисунок смысловой и антисмысловой нитей соединения В.

На **фиг. 2E-1** и **фиг. 2E-2** показана химическая структура соединения В в качестве олигонуклеотида для RNAi (SEQ ID NO: 37 и 38).

На **фиг. 3А** представлен график, на котором показано процентное количество мРНК *CFB*, оставшейся после обработки клеток HuH-7 *in vitro* различными олигонуклеотидами в количестве 1 нМ. Конкретно идентифицирован эффект нокдауна *CFB*, которому способствуют соединения А и В.

На **фиг. 3В** представлен график, на котором показано процентное количество мРНК *CFB*, оставшейся после обработки клеток HuH-7 *in vitro* различными олигонуклеотидами в количестве 0,03 нМ, 0,1 нМ и 1 нМ. Конкретно идентифицирован эффект нокдауна *CFB*, которому способствует соединение В.

На **фиг. 4А** представлен график, на котором показано количество мРНК *CFB*, оставшейся у мышей через 4 дня после подкожного введения однократной дозы 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг или 3,0 мг/кг соединения А или соединения С.

На **фиг. 4В** представлен график, на котором показано количество мРНК *CFB*, оставшейся у мышей через 4 дня после подкожного введения однократной дозы 0,3 мг/кг соединения А или соединения D.

На **фиг. 4С** представлен график, на котором показано количество мРНК *CFB*, оставшейся у мышей через 4 дня после подкожного введения однократной дозы 0,5 мг/кг соединения А, В, Е, F, G, H или I.

На **фиг. 5** представлен график, на котором показано измерение процентного количества мРНК *CFB* в печени яванских макаков перед введением дозы и через 28 дней и 56 дней после обработки однократной дозой 4 мг/кг соединений А-I по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля.

На **фиг. 6А** представлен график, на котором показано измерение процентного количества мРНК *CFB* 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.

На **фиг. 6В** представлен график, на котором показано измерение процентного количества *CFB* 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.

На **фиг. 7** представлен график, на котором показана примерная ED_{50} соединения А и соединения В, измеренная в виде количества мРНК *CFB* в печени яванских макаков через 28 дней после однократной дозы соединения А или соединения В при 2 мг/кг.

На **фиг. 8** представлен график, на котором показано процентное значение 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, измеренное посредством функционального анализа на основе ELISA WIESLAB®. PBS вводили по той же многодозовой схеме, что и в контрольной группе.

На **фиг. 9** представлен график, на котором показано процентное значение лизиса в сыворотке крови яванских макаков после обработки с помощью 1 мг/кг или 2 мг/кг соединения В в дни 0, 28, 56 и 84, измеренное посредством способа гемолиза эритроцитов кролика. PBS вводили по той же многодозовой схеме, что и в контрольной группе.

На **фиг. 10А** представлен график, на котором показано измерение посредством RT-qPCR процентного количества мРНК *CFB* в печени мышей CD-1 после введения однократной подкожной дозы 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг и 3 мг/кг соединения J по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля. Уровни печеночного нокдауна отслеживали в течение 63 дней, и умерщвляли по 5 мышей в каждый момент времени для измерений.

На **фиг. 10B** представлен график, на котором показано качественное измерение посредством иммуноблоттинга процентного количества циркулирующего белка CFB в сыворотке крови мышей CD-1 на протяжении 42-дневного периода после введения однократной подкожной дозы соединения J, составляющей 0,25 мг/кг (второй слева столбец), 0,5 мг/кг (третий слева столбец) и 3 мг/кг (крайний правый столбец) по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля (крайний левый столбец).

На **фиг. 11** представлен график, на котором показано измерение посредством qPCR структур стебель-петля величины воздействия siRNA в плазме крови, ткани селезенки, печени и почки мышей CD-1, которым вводили однократную подкожную дозу 3 мг/кг соединения J. Период времени измерения составлял 672 часа. Умерщвляли по пять мышей в каждый момент времени для измерений.

На **фиг. 12A** представлен график, на котором показано измерение посредством RT-qPCR процентного количества мРНК CFB в печени мышей CD-1 в течение периода 70 дней после введения 4 доз по 0,5 мг/кг (только 56 дней) или 3 мг/кг соединения J в дни 0, 14, 28 и 42 по сравнению с PBS, который вводили в качестве контроля.

На **фиг. 12B** представлен график, на котором показано качественное измерение посредством иммуноблоттинга белка CFB в сыворотке крови у мышей CD-1 в течение периода 70 дней после введения 4 доз по 0,5 мг/кг или 3 мг/кг соединения J в дни 0, 14, 28 и 42. Уровни CFB рассчитывали в виде процентной доли относительно уровней CFB в сыворотке крови, измеренных в контрольной группе, которой вводили PBS (n = 5/момент времени).

На **фиг. 13A** представлен график, на котором показано измерение посредством qPCR структур стебель-петля концентрации соединения J в ткани печени мышей CD-1, которым вводили 4 дозы по 0,5 мг/кг соединения J в дни 0, 14, 28 и 42.

На **фиг. 13B** представлен график, на котором показано измерение посредством qPCR структур стебель-петля концентрации соединения J в плазме крови мышей CD-1, которым вводили 4 дозы по 0,5 мг/кг соединения J в дни 0, 14, 28 и 42.

На **фиг. 14A** представлен график, на котором показан клинический балл 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 проводили профилактическую обработку с помощью 3 доз по 0,5 мг/кг или дозы 3 мг/кг соединения J в дни -7, 0 и 7. Животных с CAIA, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контрольной группы.

На **фиг. 14B** представлен график, на котором показан клинический балл 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 проводили терапевтическую обработку с помощью однократной дозы 0,5 мг/кг или 3 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных с CAIA, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контрольной группы.

На **фиг. 15A** представлены изображения воспаления задних лап в день 11 в мышинной модели CAIA, в которой артрит индуцировали антителом к коллагену, введенным в день 0, и бустером LPS в день 3, а затем проводили профилактическую обработку с помощью 3 доз по 3 мг/кг соединения J в дни -7, 0 и 7. Животных с CAIA, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контрольной группы.

На **фиг. 15B** представлены изображения воспаления задних лап в день 13 в мышинной модели CAIA, в которой артрит индуцировали антителом к коллагену, введенным в день 0, и бустером LPS в день 3, а затем проводили профилактическую обработку с помощью однократной дозы 3 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных с CAIA, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контрольной группы.

На **фиг. 16** представлены изображения окрашивания H&E, демонстрирующие снижение инфильтрации мононуклеарными клетками в задних лапах после профилактической обработки с помощью 3 доз по 3 мг/кг соединения J в дни -7, 0 и 7. Животных с CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей воспаления соответственно.

На **фиг. 17** представлены изображения окрашивания сафранином O, демонстрирующие предупреждение эрозии хрящевой ткани и образования паннуса, и окрашивания H&E, демонстрирующие снижение инфильтрации мононуклеарными клетками в коленном суставе в мышинной модели индуцированного артрита CAIA после профилактической обработки животных с помощью 3 доз по 3 мг/кг соединения J в дни -7, 0 и 7. Животных с CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

На **фиг. 18** представлены изображения окрашивания сафранином O, демонстрирующие предупреждение эрозии хрящевой ткани и образования паннуса в коленном суставе в мышинной модели индуцированного артрита CAIA после профилактической обработки животных с помощью 3 доз по 3 мг/кг соединения J в дни -7, 0 и 7. Животных с CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

На **фиг. 19** представлены изображения окрашивания лимфоцитов (CD45+) в задних лапах животных с индуцированным артритом CAIA, демонстрирующие снижение инфильтрации иммунными клетками после терапевтической обработки с помощью однократной дозы 3 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных с CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

На **фиг. 20** представлены изображения окрашивания нейтрофилов и макрофагов (CD11b+) в задних лапах животных с индуцированным артритом CAIA, демонстрирующие снижение инфильтрации иммунными клетками после терапевтической обработки с помощью однократной дозы 3 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных с CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

На **фиг. 21** представлены изображения окрашивания макрофагов (F4/80+) в задних лапах животных с индуцированным артритом CAIA, демонстрирующие снижение инфильтрации иммунными клетками после терапевтической обработки с помощью однократной дозы 3 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания. Животных с CAIA, не подвергавшихся воздействию и обработанных с помощью PBS, использовали в качестве отрицательных и положительных контролей соответственно.

На **фиг. 22** показаны изображения гибридизации *in situ* флуоресцентных меток с мРНК CFV (красным цветом) для отслеживания местной экспрессии системы комплемента и инфильтрации CD45+ клетками (зеленым цветом – лимфоциты) в задней лапе животных с индуцированным артритом CAIA после терапевтической обработки с помощью однократной дозы 3 мг/кг соединения J в день 5 после индуцирования заболевания.

На **фиг. 23** представлен график, на котором показан средний клинический балл из 2 экспериментов с использованием мышей с индуцированным MOG экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (EAE), у которых заболевание индуцировали в день 0 и которые получали 2 дозы коклюшного токсина в дни 0 и 1, а затем проводили их терапевтическую обработку с помощью 5 еженедельных доз по 3 мг/кг соединения J, начиная в день 7 после индуцирования заболевания. В качестве положительного контроля заболевания использовали животных с EAE, обработанных с помощью PBS.

На **фиг. 24** представлены иллюстративные изображения окрашивания спинного мозга с помощью люксоля быстрого синего у мышей с индуцированным MOG EAE после 5 еженедельных доз по 3 мг/кг соединения J по сравнению с не подвергавшимися

воздействию мышами с ЕАЕ, обработанными с помощью PBS, которых использовали в качестве положительного контроля заболевания.

На **фиг. 25А** представлен график, на котором показано количество мРНК CFB в печени у мышей с индуцированным MOG ЕАЕ после 5 еженедельных доз по 3 мг/кг соединения J по сравнению с не подвергавшимися воздействию мышами с ЕАЕ, обработанными с помощью PBS (положительный контроль заболевания).

На **фиг. 25В** представлен график, на котором показано количество CFB в сыворотке крови у мышей с индуцированным MOG ЕАЕ после 5 еженедельных доз по 3 мг/кг соединения J по сравнению с не подвергавшимися воздействию мышами с ЕАЕ, обработанными с помощью PBS (положительный контроль заболевания).

На **фиг. 26** представлен график, на котором показано соотношение протеинурия:креатинин, измеренное при сборе разовой порции мочи в крысиной модели пассивного нефрита Хеймана (PHN), в которой протеинурию индуцировали в день 0 с помощью однократной дозы овечьего антитела к Fx1A крысы и затем проводили профилактическую обработку с помощью 3 доз по 12 мг/кг соединения J в дни -14, -7 и 0, по сравнению с обработанными с помощью PBS животными с PHN (положительный контроль заболевания) и здоровыми животными.

На **фиг. 27** представлен график, на котором показано процентное значение лизиса сыворотки крови крыс с пассивным нефритом Хеймана (PHN) после обработки с помощью 12 мг/кг соединения J в дни -14, -7 и 0, измеренное посредством способа гемолиза эритроцитов кролика, до индуцирования заболевания (день -1) или через 6 дней после индуцирования заболевания, по сравнению с обработанными с помощью PBS животными с PHN (положительный контроль заболевания) и здоровыми животными.

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. Подходящие способы введения олигонуклеотида могут включать, например, пероральное введение, посредством инъекции (например, внутривенной, внутрибрюшинной, внутримышечной, интравитреальной и подкожной), препараты для капельной инфузии и т. п. Способы

введения олигонуклеотида могут включать подкожное введение. Олигонуклеотиды, полученные согласно описанному в данном документе, можно вводить в различных формах в зависимости от нарушения, подлежащего лечению, а также возраста, состояния и массы тела субъекта, как известно из уровня техники. Препарат можно вводить профилактически, то есть вводить для уменьшения вероятности развития заболевания или состояния.

При использовании в данном документе термин "средство, которое снижает уровень и/или активность CFB" относится к олигонуклеотиду (например, олигонуклеотиду для RNAi), раскрытому в данном документе, который можно применять (например, вводить) для снижения уровня или экспрессии CFB в клетке или у субъекта, как, например, в клетках или сыворотке крови субъекта. Под "снижением уровня CFB", "снижением экспрессии CFB" и "снижением транскрипции CFB" подразумевается уменьшение уровня, уменьшение экспрессии или уменьшение транскрипции мРНК CFB и/или белка CFB в клетке или у субъекта, например, путем введения олигонуклеотида для RNAi (такого как описанные в данном документе) в клетку или субъекту. Уровень мРНК CFB и/или белка CFB можно измерить с применением любого способа, известного из уровня техники (например, путем измерения уровня мРНК CFB или уровня белка CFB в клетке или у субъекта). Снижение может представлять собой уменьшение уровня, экспрессии или транскрипции мРНК CFB и/или белка CFB 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 мРНК CFB или белка CFB у субъекта, не получающего лечение (например, субъекта с заболеванием или нарушением, ассоциированным с активацией или нарушением регуляции системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции CFB), 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 CFB))). CFB может представлять собой любой CFB (такой как, например, CFB мыши, CFB крысы, CFB обезьяны или CFB человека), а также варианты или мутантные формы CFB. Таким образом, CFB может представлять собой CFB дикого типа, мутантный CFB или трансгенный CFB в качестве составной части клетки, группы клеток или организма, подвергнутых генетическим манипуляциям. "Снижение активности CFB" также означает уменьшение уровня активности, связанной с CFB (например, путем снижения активации пути активации системы комплемента, ассоциированной с заболеванием, опосредованной активацией или

нарушением регуляции пути активации системы комплемента). Активность CFB 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 CFB можно измерить с применением любого способа, известного из уровня техники. Снижение может представлять собой уменьшение уровня, экспрессии или транскрипции мРНК *CFB* и/или белка CFB 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 средством на основе олигонуклеотида, раскрытым в данном документе). Данное снижение уровня, экспрессии или транскрипции мРНК *CFB* и/или белка CFB может наблюдаться в течение периода, 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 CFB в крови субъекта, получающего лечение (например, субъекта-человека), на по меньшей мере 5 мкг/мл (например, на по меньшей мере 5-1000 мкг/мл), как, например, в течение периода, составляющего по меньшей мере 1 день (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 или больше).

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-тиазолоцитозина, 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 (ψ), пиридин-4-оновый 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 (co^5U), сложный метиловый эфир уридин-5-оксиуксусной кислоты (mco^5U), 5-карбоксиметилуридин (cm^5U), 1-карбоксиметилпсевдоуридин, 5-карбоксихидроксиметилуридин (chm^5U), сложный метиловый эфир 5-карбоксихидроксиметилуридина ($mchm^5U$), 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-селеноуридин (mnm^5se^2U), 5-карбамоилметилуридин (ncm^5U), 5-карбоксиметиламинметилуридин ($cmnm^5U$), 5-карбоксиметиламинметил-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-деазапсевдоуридин, 2-тио-1-метил-1-деазапсевдоуридин, 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-карбоксивинил)уридин (acr^3U), 1-метил-3-(3-амино-3-карбоксивинил)псевдоуридин ($acr^3\psi$), 5-(изопентениламинметил)уридин (inm^5U), 5-(изопентениламинметил)-2-тиоуридин (inm^5s^2U), α -тиоуридин, 2'-О-метилуридин (Um), 5,2'-О-диметилуридин (m^5Um), 2'-О-метилпсевдоуридин (ψm), 2-тио-2'-О-метилуридин (s^2Um), 5-метоксикарбонилметил-2'-О-метилуридин (mcm^5Um), 5-карбамоилметил-2'-О-метилуридин (ncm^5Um), 5-карбоксиметиламинметил-2'-О-метилуридин ($cmnm^5Um$), 3,2'-О-диметилуридин (m^3Um) и 5-(изопентениламинметил)-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-деазапсевдоизоцитидин, 1-метил-1-деазапсевдоизоцитидин, 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), α -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-деазааденин, 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, α -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-деазагуанозин, квеуозин (Q), эпоксиквеуозин (oQ), галактозилквеуозин ($galQ$), маннозилквеуозин ($manQ$), 7-циано-7-деазагуанозин ($preQ_0$), 7-аминометил-7-

деазагуанозин (preQ₁), археозин (G⁺), 7-деза-8-азагуанозин, 6-тиогуанозин, 6-тио-7-деазагуанозин, 6-тио-7-деаза-8-азагуанозин, 7-метилгуанозин (m⁷G), 6-тио-7-метилгуанозин, 7-метилюанозин, 6-метоксигуанозин, 1-метилгуанозин (m¹G), N₂-метилгуанозин (m²G), N₂,N₂-диметилгуанозин (m²₂G), N₂,7-диметилгуанозин (m^{2,7}G), N₂,N₂,7-диметилгуанозин (m^{2,2,7}G), 8-оксогуанозин, 7-метил-8-оксогуанозин, 1-метил-6-тиогуанозин, N₂-метил-6-тиогуанозин, N₂,N₂-диметил-6-тиогуанозин, α-тиогуанозин, 2'-О-метилгуанозин (Gm), N₂-метил-2'-О-метилгуанозин (m²Gm), N₂,N₂-диметил-2'-О-метилгуанозин (m²₂Gm), 1-метил-2'-О-метилгуанозин (m¹Gm), N₂,7-диметил-2'-О-метилгуанозин (m^{2,7}Gm), 2'-О-метилюанозин (Im), 1,2'-О-диметилюанозин (m¹Im), 2'-О-рибозилгуанозин (фосфат) (Gr(p)), 1-тиогуанозин, Об-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 "альтернативный путь активации системы комплемента" относится к одному из трех путей активации системы комплемента, при этом остальные представляют собой классический путь и лектиновый путь.

При использовании в данном документе термин "антисмысловой" относится к олигонуклеотиду, который в достаточной степени комплементарен всему гену, первичному транскрипту или процессированной мРНК или их части (например, последовательности *CFB* (например, SEQ ID NO: 12)), так что это препятствует экспрессии эндогенного гена (например, *CFB*).

Термины "антисмысловая нить" и "направляющая нить" относятся к нити олигонуклеотида для RNAi, которая содержит область, которая в значительной степени комплементарна последовательности-мишени, например, мРНК *CFB* (например, SEQ ID NO: 12).

Подразумевается, что термин "по меньшей мере" перед числом или рядом 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 рядом чисел или диапазоном, то подразумевается, что "по меньшей мере" может модифицировать каждое из чисел в ряду или диапазоне.

При использовании в данном документе термин "ослабляет" означает снижает или эффективно прекращает. В качестве неограничивающего примера одно или несколько средств лечения, предусмотренных в данном документе, могут снижать или эффективно прекращать начало проявления или прогрессирование заболевания, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции CFB) у субъекта. Данное ослабление может быть проиллюстрировано, например, в виде уменьшения 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 активации системы комплемента, такого как, например, заболевание, описанное в данном документе.

Термин "кДНК" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая является ДНК-эквивалентом последовательности мРНК (т. е. в которой имеется замена уридина на тимидин). Как правило, термины кДНК и мРНК могут использоваться взаимозаменяемо в отношении конкретного гена (например, гена *CFB*), поскольку специалисту в данной области будет понятно, что последовательность кДНК является такой же, как последовательность мРНК, за исключением того, что остатки уридина прочитываются как остатки тимидина.

Используемые в данном документе термины "CFB" и "фактор В системы комплемента" относятся к белку или гену, кодирующему фактор В системы комплемента, в зависимости от контекста, в котором данный термин используется. Термин "CFB" также охватывает природные варианты белка CFB дикого типа, такие как белки, характеризующиеся по меньшей мере 85% идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 99,9% или большей идентичностью последовательности) с аминокислотной последовательностью CFB человека дикого типа, которая представлена под идентификационным № в NCBI NP_001701.2 (SEQ ID NO: 11). Термин "CFB" также относится к природным вариантам гена *CFB* дикого типа, таким как 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 CFB человека дикого типа, которая представлена под идентификационным № в NCBI NM_001710.5 (SEQ ID NO: 12).

При использовании в данном документе термин "активация или нарушение регуляции пути активации системы комплемента" относится к отклонению в способности пути активации системы комплемента, включая классический путь, альтернативный путь и лектиновый путь, обеспечивать защиту хозяина от патогенов и удалять иммунные комплексы и поврежденные клетки, а также иммунорегуляцию. Активация или нарушение регуляции альтернативного пути активации 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. Такие условия могут представлять собой, например, жесткие условия, где жесткие условия могут включать: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES, pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C или 70°C, в течение 12-16 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 могут встречаться внутри организма. Специалист в данной области сможет определить набор условий, наиболее подходящих для теста на комплементарность двух последовательностей, в соответствии с конечным применением гибридизированных нуклеотидов или нуклеозидов. "Комплементарные" последовательности при использовании в данном документе также могут содержать неутсон-криковские пары оснований и/или пары оснований, образованные из неприродных и альтернативных нуклеотидов или нуклеозидов, или быть полностью образованы из них при условии удовлетворения указанных выше требований в отношении их способности к гибридизации. Такие неутсон-криковские пары оснований включают в себя без ограничения неоднозначные пары оснований G:U или хугстиновские пары оснований. Комплементарные последовательности в пределах олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) или между олигонуклеотидом и последовательностью-мишенью, как описано в данном документе, предусматривают спаривание оснований олигонуклеотида, содержащего первую нуклеотидную или нуклеозидную

последовательность, и олигонуклеотида, содержащего 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, то 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 вплоть до 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 мРНК, представляющей интерес (например, мРНК, кодирующей CFB). Например, олигонуклеотид комплементарен по меньшей мере части мРНК CFB, если последовательность в значительной степени комплементарна непрерывающейся части мРНК, кодирующей CFB. Однако, если два олигонуклеотида сконструированы так, что они образуют после гибридизации один или несколько однонитевых выступающих концов, такие выступающие концы не следует рассматривать как случаи ошибочного 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. В частности, 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. Подразумевается, что два олигонуклеотида могут гибридизоваться 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 олигонуклеотид для RNAi (например, однонитевой олигонуклеотид или двухнитевой

олигонуклеотид, который 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 может привести в физический контакт с клеткой либо, осуществляющее способ, или, в качестве альтернативы, средство на основе олигонуклеотида можно поместить в ситуацию, которая будет позволять или обуславливать его последующее 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 инъекции олигонуклеотида в ткань, где расположена клетка, или рядом с ней или посредством инъекции средства на основе олигонуклеотида в другую область, например, кровотока или подкожное пространство, так что средство впоследствии достигает ткани, где расположена клетка, подлежащая приведению в контакт. Например, олигонуклеотид может содержать лиганд и/или быть связанным с лигандом, который направляет олигонуклеотид к участку, представляющему интерес, или может быть интегрирован в вектор (например, вирусный вектор), который доставляет олигонуклеотид в участок-мишень, 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 из нуклеиновых оснований" относится к области олигонуклеотида (например, антисмысловой нити олигонуклеотида для RNAi), которая комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени. Термин может использоваться в данном документе взаимозаменяемо 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(дополнительные) нуклеотид(нуклеотиды) или нуклеозид(нуклеозиды). Нуклеотидная линкерная область может быть комплементарна или может быть не комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени. Межнуклеозидные связи, присутствующие между нуклеотидами непрерывной нуклеотидной области, могут включать в себя фосфотиоатные межнуклеозидные связи. Непрерывная нуклеотидная область может дополнительно содержать один или несколько нуклеозидов с модификацией сахара.

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, отличных от находящихся в 2'-положении, включая модификации или замены сахара, фосфатной группы или основания или внутри них.

При использовании в данном документе термин "заболевание" относится к приостановке, прекращению или нарушению функций организма, систем или органов. Заболевания или нарушения, представляющие интерес, включают заболевания и нарушения, при которых пользу принесет лечение с помощью олигонуклеотида, описанного в данном документе (например, однонитевой или двухнитевой РНК-конструкции, которая образует дуплекс, описанный в данном документе), который нацеливается на СFB, как, например, посредством способа лечения, описанного в данном документе. Неограничивающие примеры заболеваний или нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента (например, нарушением регуляции или активацией СFB) или ассоциированных с ними, которые можно лечить с помощью композиций и способов, описанных в данном документе, включают, например, кожные нарушения, неврологические нарушения, нефрологические нарушения, нарушения, требующие неотложной помощи, ревматические нарушения, легочные нарушения, дерматологические нарушения, гематологические нарушения и офтальмологические нарушения, такие как, например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), С3-гломерулопатия (С3G), иммуноглобулин-А-нефропатия (IgAN), мембранозная нефропатия (MN), включая первичную MN, индуцированный *E. coli* или типичный гемолитико-уремический синдром (HUS), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), возрастная дегенерация желтого пятна, географическая атрофия, диабетическая ретинопатия, увеит, средний увеит, увеит при болезни Бехчета, пигментный ретинит, отек желтого пятна, мультифокальный хориоидит, синдром Фогта-Коянаги-Харады, дробьевидная ретинохориоидопатия, симпатическая офтальмия, глазной рубцующий пемфигоид, глазная пузырчатка, неартритная ишемическая невропатия глазного нерва, послеоперационное воспаление, окклюзия вен сетчатки, неврологические нарушения, рассеянный склероз, инсульт, синдром Гийена-Барре, травматическое повреждение головного мозга, болезнь Паркинсона, осложнения гемодиализа, сверхострое отторжение аллотрансплантата, отторжение ксенотрансплантата, токсичность, индуцированная интерлейкином-2 в ходе терапии с IL-2, воспалительные нарушения, воспаление при аутоиммунных заболеваниях, болезнь Крона, респираторный

дистресс-синдром взрослых, миокардит, постишемические реперфузионные состояния, инфаркт миокарда, баллонная ангиопластика, постреперфузионный синдром при сердечно-легочном шунтировании или почечном шунтировании, атеросклероз, гемодиализ, ишемия почек, реперфузия брыжеечной артерии после реконструкции аорты, инфекционное заболевание или сепсис, формы болезни иммунных комплексов и аутоиммунные заболевания, ревматоидный артрит, системная красная волчанка (SLE), SLE-нефрит, пролиферативный нефрит, фиброз печени, гемолитическая анемия, тяжелая миастения, регенерация тканей, нейрорегенерация, одышка, кровохарканье, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), астма, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), эмфизема, формы легочной эмболии и инфаркта, пневмония, фиброгенные пылевые заболевания, фиброз легких, аллергия, бронхоспазм, гиперчувствительный пневмонит, паразитарные заболевания, синдром Гудпасчера, легочный васкулит, слабоиммунный васкулит, воспаление, ассоциированное с иммунными комплексами, антифосфолипидный синдром, гломерулонефрит, ожирение, артрит, аутоиммунное заболевание сердца, воспалительное заболевание кишечника, ишемически-реперфузионные повреждения, синдром Барракера-Симонса, гемодиализ, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), криоглобулинемия, псориаз, трансплантация, заболевания центральной нервной системы, такие как болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные состояния, болезнь плотных отложений, пузырьчатые кожные заболевания, мембранопротрофиеративный гломерулонефрит II типа (MPGN II), хроническая реакция "трансплантат против хозяина", синдром Фелти, гангренозная пиодермия (PG), гнойный гидраденит (HS), легочная артериальная гипертензия, первичный синдром Шегрена, первичный билиарный холангит, аутосомно-доминантный поликистоз почек и заболевание, ассоциированное с антителами к миелин-олигодендропроцитному гликопротеину (MOGAD).

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, описанного в данном документе), которое снижает уровень и/или активность СФВ (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, таким

образом, "эффективное количество" или его синоним зависят от контекста, в котором их используют. Например, в контексте лечения заболевания, ассоциированного с активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, оно представляет собой количество средства, которое снижает уровень и/или активность СFB, достаточное для достижения ответа на лечение по сравнению с ответом, полученным без введения средства, которое снижает уровень и/или активность СFB. Количество данного средства, которое снижает уровень и/или активность СFB, 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, индивидуальные особенности субъекта (например, возраст, пол и/или масса тела) или хозяина, получающего лечение, и т. п., но, тем не менее, может быть обычным способом определено специалистом в данной области. Также при использовании в данном документе "терапевтически эффективное количество" средства, которое снижает уровень и/или активность СFB, 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 снижает уровень и/или активность СFB, по настоящему изобретению может быть легко определено средним 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, означает нуклеотид, 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 подразумевается, что термин "нуклеотид" может также относиться к альтернативному нуклеотиду, как дополнительно подробно описано ниже, или к суррогатному заменяющему фрагменту. Специалисту в данной области 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 образовывать пары оснований с

нуклеотидами, содержащими аденин, цитозин или урацил. Следовательно, нуклеотиды, содержащие урацил, гуанин или аденин, можно заменять в нуклеотидных последовательностях олигонуклеотида, описанного в настоящем изобретении, на нуклеотид, содержащий, например, инозин. В другом примере аденин и цитозин в любом месте олигонуклеотида можно заменять на гуанин и урацил соответственно с образованием неоднозначных пар оснований G-U с мРНК-мишенью. Последовательности, содержащие такие заменяющие фрагменты, являются подходящими для композиций и способов, описанных в настоящем изобретении.

При использовании в данном документе термин "ингибитор" относится к любому средству, которое снижает уровень и/или активность белка (например, CFB). Неограничивающие примеры ингибиторов включают олигонуклеотиды (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 CFB, обнаруживаемый в сыворотке крови здоровых людей, составляет приблизительно 200 мкг/мл; поэтому пониженный уровень белка CFB может представлять собой, например, количество, которое меньше приблизительно 200 мкг/мл (например, 5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 150 мкг/мл и 190 мкг/мл).

Под "уровнем" подразумевается уровень или активность белка или мРНК, кодирующей белок (например, CFB), необязательно по сравнению с эталоном. Эталон может представлять собой любой применимый эталон, определенный в данном документе. Под "уменьшенным уровнем" или "увеличенным уровнем" белка подразумевается уменьшение или увеличение уровня белка соответственно по сравнению с эталоном (например, уменьшение или увеличение 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 увеличение 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 увеличение 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 увеличение 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 мРНК может быть выражен в масс./об. (например, г/дл, мг/мл, мкг/мл, нг/мл) или в виде процентной доли относительно общего количества белка или мРНК 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, так что в подходящих условиях гибридизации (например, в фосфатном буфере или в клетке) две антипараллельные области, которые фланкируют неспаренную область, гибридизируются с образованием дуплекса (называемого "стеблем").

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 разрушению, устойчивости к нуклеазам, растворимости, биодоступности, 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 разрушению, устойчивости к нуклеазам, растворимости, биодоступности, биологической активности, сниженную иммуногенность и т. п.

"Тетрапетлевая структура с однонитевым 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 тетрапетлю, конфигурация которой позволяет стабилизировать расположенную рядом стеблевую область, образованную в пределах по меньшей мере одной нити. Тетрапетлевая структура с однонитевым разрывом обеспечивает одиночный разрыв в нуклеотидах смысловой и антисмысловой нитей, так что они больше не соединяются в данном участке путем ковалентной связи.

Термины "нуклеиновое основание" и "основание" включают пуриновые (например, адениновые и гуаниновые) и пиримидиновые (например, урациловые, тиминные и цитозинные) фрагменты, 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 в ходе 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 Hiraio et al. (*Accounts of Chemical Research*, vol. 45: page 2055, 2012) и Bergstrom (*Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry Suppl.* 37 1.4.1, 2009).

Термин "нуклеозид" относится к мономерному звену олигонуклеотида, содержащему нуклеиновое основание и сахарный фрагмент. Нуклеозид может включать в себя нуклеозиды, которые встречаются в природе, а также альтернативные нуклеозиды, такие как описанные в данном документе. Нуклеиновое основание нуклеозида может представлять собой встречающееся в природе нуклеиновое основание или альтернативное нуклеиновое основание. Аналогичным образом, сахарный фрагмент нуклеозида может представлять собой встречающийся в природе сахар 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 в себя или может не включать в себя фосфатную связь. Аналогичным 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, фосфотионатные и боронофосфатные связи. Альтернативные нуклеозиды включают в себя бициклические нуклеозиды (BNA) (например, "запертые" нуклеозиды (LNA) и нуклеозиды, конформационно затрудненные этилом (сEt)), 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 однонитевым или предназначен для RNAi. Олигонуклеотид может иметь или может не иметь 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, являющуюся субстратом для Dicer (dsiRNA), антисмысловый олигонуклеотид, короткую siRNA или однонитевую siRNA. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид для RNAi.

При использовании в данном документе термин "выступающий конец" относится к концевому(концевым) нуклеотиду(нуклеотидам), не участвующему(не участвующим) в спаривании оснований, что является результатом того, что одна нить или область выступает за пределы конца комплементарной нити, с которой одна нить или область образует дуплекс. В некоторых вариантах осуществления выступающий конец содержит один или несколько неспаренных нуклеотидов, выступающих за пределы дуплексной области на 5'-конце или 3'-конце олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi). В определенных вариантах осуществления выступающий конец представляет

собой 3'- или 5'-выступающий конец 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 в лечении заболевания или нарушения, такого как заболевание, опосредованное нарушением регуляции альтернативного пути активации системы комплемента (например, нарушением регуляции, связанным с CFB, таким как нарушение регуляции одного или всех путей активации системы комплемента (например, альтернативного, классического и/или лектинового путей)). Субъект может быть идентифицирован, например, как имеющий необходимость в лечении заболевания или нарушения, например, на основании диагноза, ранее поставленного специалистом в данной области (например, врачом).

"Процент (%) идентичности последовательностей" по отношению к эталонной олигонуклеотидной или полипептидной последовательности определяется как процентная доля нуклеиновых кислот или аминокислот в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеиновым кислотам или аминокислотам в эталонной олигонуклеотидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и, при необходимости, введения гэпов для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах возможностей специалиста в данной области, например, с применением общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2 или Megalign. Специалисты в данной области 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 для сравнения последовательностей BLAST. В качестве иллюстрации процент идентичности последовательности у данной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности А с данной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности В, по отношению к ней или относительно нее (что в качестве альтернативы можно сформулировать как данная последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность А, которая характеризуется определенным процентом идентичности последовательности с

данной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью В, по отношению к ней или относительно нее) рассчитывают следующим образом:

100 умножают на (частное X/Y),

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

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 существу отсутствия токсичности и отсутствия воспалительного эффекта у пациента. Вспомогательные вещества могут включать, например, антиадгезивы, антиоксиданты, связующие вещества, покрытия, добавки для прессования, разрыхлители, красители (пигменты), смягчающие средства, эмульгаторы, наполнители (разбавители), пленкообразователи или покрытия, ароматизаторы, отдушки, вещества, способствующие скольжению (вещества, препятствующие слеживанию и комкованию), смазывающие вещества, консерванты, типографские краски, сорбенты, суспендирующие или диспергирующие средства, подсластители и разновидности 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 в себя соли, которые находятся в пределах объема обоснованного медицинского суждения, являются подходящими для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и 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, что обеспечивает возможность их получения в виде фармацевтически приемлемых солей. Такие соли могут представлять собой соли присоединения кислоты, образованные с использованием 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 и 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 ацетатные, адипатные, альгинатные, аскорбатные, аспартатные, бензолсульфонатные, бензоатные, бисульфатные, боратные, бутиратные, камфоратные, камфорсульфонатные, цитратные, циклопентанпропионатные, диглюконатные, додецилсульфатные, этансульфонатные, фумаратные, глюкогептонатные, глицерофосфатные, гемисульфатные, гептонатные, гексаноатные, гидробромидные, гидрохлоридные, гидройодидные, 2-гидроксиэтансульфонатные, лактобионатные, лактатные, лауратные, лаурилсульфатные, малатные, малеатные, малонатные, метансульфонатные, 2-нафталинсульфонатные, никотинатные, нитратные, олеатные, оксалатные, пальмитатные, памоатные, пектинатные, персульфатные, 3-фенилпропионатные, фосфатные, пикратные, пивалатные, пропионатные, стеаратные, сукцинатные, сульфатные, тартратные, тиоцианатные,

толуолсульфонатные, ундеканоатные и валератные соли. Иллюстративные соли щелочных или щелочноземельных металлов содержат 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" представляет композицию, содержащую соединение (например, средство на основе олигонуклеотида), описанное в данном документе, составленную с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом и необязательно изготовленную или продаваемую с одобрения государственного регулирующего органа в качестве части 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 эмболов 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 "аналог фосфата" относится к химическому фрагменту, который имитирует электростатические и/или стерические свойства фосфатной группы. В некоторых вариантах осуществления аналог фосфата расположен на 5'-концевом нуклеотиде олигонуклеотида вместо 5'-фосфата, который зачастую восприимчив к ферментативному удалению. В некоторых вариантах осуществления 5'-аналог фосфата содержит связь, устойчивую к фосфатазам. Примеры аналогов фосфата включают 5'-фосфонаты, такие как 5'-метиленфосфонат (5'-MP) и 5'-(E)-винилфосфонат (5'-VP). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид содержит аналог фосфата в 4'-положении атома углерода сахара (называемый "4'-аналог фосфата") в 5'-концевом нуклеотиде. Примером 4'-аналога фосфата является оксиметилфосфонат, в котором атом кислорода оксиметильной группы связан с сахарным фрагментом (например, при его 4'-атоме углерода) или его аналогом. См., например, US 2019/0177729, содержание которой, относящееся к аналогам фосфата, 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, относящиеся к аналогам фосфата, 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 мРНК. Зонды можно синтезировать с применением широко известных и общепринятых способов в данной 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 количества активности гена в клетке или у субъекта по сравнению с соответствующими эталонными клеткой или субъектом. Например, действие, заключающееся в обработке клетки олигонуклеотидом для RNAi (например, олигонуклеотидом, содержащим антисмысловую нить, которая комплементарна последовательности мРНК *CFB*), может привести к уменьшению количества РНК-транскрипта, белка и/или активности (например, кодируемых геном *CFB*) по сравнению с клеткой, которую не обрабатывали олигонуклеотидом для RNAi. Аналогичным образом, используемый в данном документе термин "снижение экспрессии" относится к действию, которое приводит к сниженной экспрессии гена (например, *CFB*). Снижение экспрессии можно оценивать по уменьшению концентрации *CFB* 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 мРНК *CFB* (например, снижению на по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 55% или 60% или больше, такому как снижение в диапазоне 1-60% или больше, относительно, например, клетки, которую не приводили в контакт с олигонуклеотидом, описанным в данном документе). Снижение экспрессии *CFB* можно измерить с использованием анализа системы комплемента WIESLAB®, анализа ELISA, гемолитического анализа или анализа, известного из уровня техники.

Под "эталонном" подразумевается любой применимый эталон, используемый для сравнения уровней или активности белка или мРНК. 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, такой 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, клетку или ткань) от субъекта, у которого отсутствует заболевание; образец от субъекта, у которого диагностировано заболевание, но который еще не получал лечение с помощью соединения, описанного в данном документе; образец от субъекта, который получал лечение с помощью соединения, описанного 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 использованием 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, у которого имеется измеренное значение в пределах нормального контрольного значения для конкретного биомаркера, как правило, называется находящимся "в пределах нормы" по данному биомаркеру. Нормальный эталонный стандарт или уровень могут представлять собой значение или число, полученные у нормального субъекта, у которого отсутствует заболевание или нарушение (например, заболевание или нарушение, ассоциированное с активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента); субъекта, который получал лечение с помощью соединения, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления эталонный образец, стандарт или уровень сопоставляют с образцом от субъекта по по меньшей мере одному из следующих критериев: возраст, масса, пол, стадия заболевания и общее состояние здоровья. Стандартную кривую уровней очищенного олигонуклеотида или белка, например, любого описанного в данном документе, в пределах диапазона нормальных эталонных значений 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 гену, первичному транскрипту, последовательности (например, последовательности-мишени, например, нуклеотидной последовательности СФВ) или процессированной мРНК или их части, так что это препятствует экспрессии

эндогенного гена (например, *CFB*). Если область комплементарности не полностью комплементарна последовательности-мишени, случаи ошибочного спаривания могут иметь место во внутренних или концевых областях молекулы. Как правило, наиболее допустимые случаи ошибочного спаривания находятся в концевых областях, например, в пределах 5, 4, 3 или 2 нуклеотидов от 5'- и/или 3'-конца олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi).

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

При использовании в данном документе термин "олигонуклеотид для RNAi" относится к (а) 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 мРНК-мишени, либо (б) однонитевому олигонуклеотиду, содержащему одиночную антисмысловую нить, где данная антисмысловая нить (или часть антисмысловой нити) используется эндонуклеазой Ago2 при расщеплении мРНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi содержит петлевую область, такую как структура стебель-петля, которая содержит нуклеозиды, как этот термин определен в данном документе. Олигонуклеотид для RNAi включает в себя, например, dsRNA, siRNA и shRNA, которые опосредуют целенаправленное расщепление РНК-транскрипта посредством пути РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). Олигонуклеотид для RNAi управляет специфичным по отношению к последовательности разрушением мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (RNAi).

Олигонуклеотид для RNAi снижает экспрессию СЗ в клетке, например, клетке в организме 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 находится в по существу дуплексной форме. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной(дуплексных) области(областей) олигонуклеотида для RNAi образуется между антипараллельными последовательностями

нуклеотидов нитей нуклеиновой кислоты, которые не связаны ковалентно. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной(дуплексных) области(областей) олигонуклеотида для RNAi образуется между антипараллельными последовательностями нуклеотидов нитей нуклеиновой кислоты, которые связаны ковалентно. В некоторых вариантах осуществления комплементарное спаривание оснований дуплексной(дуплексных) области(областей) олигонуклеотида для RNAi образуется в одиночной нити нуклеиновой кислоты, которая сворачивается (например, в виде шпильки) с получением комплементарных антипараллельных последовательностей нуклеотидов, которые образуют пары оснований 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 выступающие концы на одном или обоих концах. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид для RNAi содержит антипараллельную последовательность нуклеотидов, которые являются частично комплементарными, и, таким образом, может содержать один или несколько случаев ошибочного спаривания, которые могут включать случаи внутреннего ошибочного спаривания или случаи концевоего ошибочного спаривания.

При использовании в данном документе термины "смысловая нить" и "сопровождающая нить" относятся к нити dsRNA, которая содержит область, в значительной степени комплементарную 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 гена-мишени (например, гена *CFB*). Например, смысловая нить может содержать область, которая на по меньшей мере 85% идентична части SEQ ID NO: 12, как, 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 образуются из более длинных молекул

dsRNA (например, длиной > 25 связанных нуклеозидов) посредством клеточного аппарата RNAi (например, Dicer или ее гомолога).

При использовании в данном документе термин "нить" относится к одиночной непрерывной последовательности нуклеотидов, связанных вместе посредством межнуклеотидных связей (например, фосфодиэфирных связей, фосфотиоатных 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 лечения или нуждаться в лечении, требовать лечения, получать лечение, получать лечение в будущем или являться человеком или животным, 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 включает "альтернативный сахар", определяемый как структура, которая способна замещать фуранозное кольцо нуклеозида. В определенных вариантах осуществления альтернативные сахара представляют собой нефуранозные (или 4'-замещенные фуранозные) кольца или кольцевые системы или открытые системы. Такие структуры предусматривают 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 суррогаты сахаров, где фуранозное кольцо было заменено на другую кольцевую систему, такую как, например, морфолиновая или гекситольная кольцевая система. Сахарные фрагменты, применимые при получении олигонуклеотидов, содержащих мотивы, включают без ограничения β -D-рибозу, β -D-2'-дезоксирибозу, замещенные сахара (такие как 2'-, 5'- и бис-замещенные 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 рибозы с мостиком 2'-O—CH₂-4' или 2'-O—(CH₂)₂-4') и суррогаты сахаров (как, например, если рибозное кольцо было заменено на морфолиновую или гекситольную кольцевую систему). Тип гетероциклического основания и межнуклеозидной связи, используемых в каждом положении, варьируется и не является фактором в определении

мотива. В большинстве нуклеозидов, содержащих альтернативный сахарный фрагмент, гетероциклическое нуклеиновое основание, как правило, сохраняется для обеспечения гибридизации.

При использовании в данном документе термин "структура стебель-петля" относится к области олигонуклеотида, в которой две области содержат комплементарную нуклеотидную последовательность, где одна считывается в направлении 5'-3', а другая считывается в направлении 3'-5', и нуклеотиды между двумя областями образуют неспаренную петлю. Область структуры 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 использованием стандартной номенклатуры нуклеиновых оснований.

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

При использовании в данном документе термин "нацеливать" или "нацеливание" относится к олигонуклеотиду, способному к специфичному связыванию с геном *CFB* или мРНК *CFB*, кодирующими продукт гена *CFB*. Например, он относится к олигонуклеотиду, способному подавлять указанный ген или указанную мРНК (например, путем снижения уровня белка, кодируемого геном или мРНК) посредством способов, известных специалистам в данной области (например, в области антисмысловых олигонуклеотидов 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, экспрессирующимся на поверхности клетки, и эндосомальной интернализации клеткой комплекса, содержащего олигонуклеотид, нацеливающий лиганд и рецептор. В некоторых вариантах осуществления нацеливающий лиганд конъюгирован с олигонуклеотидом посредством линкера, который расщепляется после клеточной интернализации или в ходе нее, так что олигонуклеотид высвобождается от нацеливающего лиганда в клетке.

При использовании в данном документе термин "тетрапетля" относится к петле, которая увеличивает стабильность расположенного рядом дуплекса, образованного путем гибридизации фланкирующих последовательностей нуклеотидов. Увеличение стабильности можно выявить как увеличение 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, тетрапетля может придавать температуру плавления, составляющую по меньшей мере 50°C , по меньшей мере 55°C , по меньшей мере 56°C , по меньшей мере 58°C , по меньшей мере 60°C , по меньшей мере 65°C или по меньшей мере 75°C , в 10 mM NaHPO_4 , шпильке, содержащей дуплекс длиной по меньшей мере 2 пары оснований. В некоторых вариантах осуществления тетрапетля может стабилизировать пару оснований в расположенном рядом стеблевом дуплексе путем стэкинг-взаимодействий. Кроме того, взаимодействия среди нуклеотидов в тетрапетле включают без ограничения неутсон-криковское спаривание оснований, 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 тетрапетля содержит от 3 до 6 нуклеотидов или состоит из них и, как правило, представлена 4-5 нуклеотидами. В определенных вариантах осуществления тетрапетля содержит три, четыре, пять или шесть нуклеотидов, которые могут быть модифицированными или могут быть немодифицированными (например, которые могут быть конъюгированы или могут быть не конъюгированы с нацеливающим фрагментом), или состоит из них. В одном варианте осуществления тетрапетля состоит из четырех нуклеотидов. В тетрапетле может использоваться любой нуклеотид, и для таких нуклеотидов могут использоваться стандартные символы IUPAC-IUB, как описано в

Cornish-Bowden (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 3021-3030. Например, буква "N" может использоваться для обозначения того, что в данном положении может находиться любое основание, буква "R" может использоваться для демонстрации того, что в данном положении может находиться А (аденин) или G (гуанин), и "B" может использоваться для демонстрации того, что в данном положении может находиться C (цитозин), G (гуанин) или T (тимин). Примеры тетрапетель включают семейство тетрапетель UNCG (например, UUCG), семейство тетрапетель GNRA (например, GAAA) и тетрапетлю 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 тетрапетель ДНК включают семейство тетрапетель d(GNNA) (например, d(GTTA), d(GNRA)), семейство тетрапетель d(GNAB), семейство тетрапетель d(CNNG) и семейство тетрапетель d(TNCG) (например, d(TTCG)). См., например, Nakano *et al.* *Biochemistry*, 41 (48), 14281-14292, 2002. SHINJI *et al.* *Nippon Kagakkai Koen Yokoshu VOL. 78th; NO. 2; pg. 731 (2000)*, которые включены в данный документ посредством ссылки в отношении их соответствующего раскрытия. В некоторых вариантах осуществления тетрапетля содержится в пределах тетрапетлевой структуры с однонитевым 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 вследствие активации или нарушения регуляции пути активации системы комплемента. Олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi), используемые в способах по настоящему изобретению, можно вводить в достаточном количестве для обеспечения разумного соотношения польза/риск, применимого для такого лечения.

При использовании в данном документе термин "лечить" относится к действию по предоставлению 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 для предупреждения или уменьшения вероятности возникновения состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение включает снижение частоты или тяжести по меньшей мере одного признака, симптома или способствующего фактора состояния (например, заболевания, нарушения), испытываемого субъектом. В некоторых вариантах

осуществления средства на основе нуклеиновой кислоты или олигонуклеотида для RNAi (например, dsRNA), описанные в данном документе, применяют для контроля клеточных и клинических проявлений нарушения пути активации системы комплемента (например, заболевания или нарушения, вызванного активацией или нарушением регуляции CFB).

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 фактор В системы комплемента (CFB), который, как известно, играет роль в активации альтернативного пути активации системы комплемента. Олигонуклеотиды можно вводить для уменьшения уровня и/или активности CFB в клетке (например, гепатоцитах) или у субъекта (например, человека). Например, олигонуклеотиды можно вводить *in vivo*, и они могут подвергаться интернализации клеткой (например, гепатоцитом; как, например, путем связывания с асиалогликопротеиновым рецептором (ASGPR)). После клеточной интернализации олигонуклеотиды могут связываться РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC) и нацеливаться на мРНК CFB, иницируя таким образом разрушение мРНК CFB и блокируя ее трансляцию.

Заболевания, опосредованные нарушением регуляции альтернативного пути активации системы комплемента, часто являются результатом повышенной активности системы комплемента. В данном документе описаны способы лечения заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента или ассоциированных с ними, посредством введения олигонуклеотидов, описанных в данном документе, которые снижают уровень экспрессии и/или активность CFB. Примеры нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента или ассоциированных с ними, которые можно лечить с помощью олигонуклеотидов и композиций, описанных в данном документе, включают, например, кожные нарушения, неврологические нарушения, нефрологические нарушения, нарушения, требующие неотложной помощи, ревматические нарушения, легочные нарушения, дерматологические нарушения, гематологические нарушения и офтальмологические нарушения, такие как, например, пароксизмальная ночная гемоглобинурия (PNH), С3-гломерулопатия (С3G), иммуноглобулин-А-нефропатия (IgAN), мембранозная нефропатия (MN), включая первичную MN, индуцированный *E. coli* или типичный гемолитико-уремический синдром (HUS), атипичный гемолитико-уремический синдром (aHUS), возрастная дегенерация желтого пятна, географическая атрофия, диабетическая ретинопатия, увеит, средний увеит, увеит при болезни Бехчета,

пигментный ретинит, отек желтого пятна, мультифокальный хориоидит, синдром Фогта-Коянаги-Харады, дробьевидная ретинохориоидопатия, симпатическая офтальмия, глазной рубцующий пемфигоид, глазная пузырчатка, неартритная ишемическая невропатия глазного нерва, послеоперационное воспаление, окклюзия вен сетчатки, неврологические нарушения, рассеянный склероз, инсульт, синдром Гийена-Барре, травматическое повреждение головного мозга, болезнь Паркинсона, осложнения гемодиализа, сверхострое отторжение аллотрансплантата, отторжение ксенотрансплантата, токсичность, индуцированная интерлейкином-2 в ходе терапии с IL-2, воспалительные нарушения, воспаление при аутоиммунных заболеваниях, болезнь Крона, респираторный дистресс-синдром взрослых, миокардит, постишемические реперфузионные состояния, инфаркт миокарда, баллонная ангиопластика, постперфузионный синдром при сердечно-легочном шунтировании или почечном шунтировании, атеросклероз, гемодиализ, ишемия почек, реперфузия брыжеечной артерии после реконструкции аорты, инфекционное заболевание или сепсис, формы болезни иммунных комплексов и аутоиммунные заболевания, ревматоидный артрит, системная красная волчанка (SLE), SLE-нефрит, пролиферативный нефрит, фиброз печени, гемолитическая анемия, тяжелая миастения, регенерация тканей, нейрорегенерация, одышка, кровохарканье, острый респираторный дистресс-синдром (ARDS), астма, хроническое обструктивное заболевание легких (COPD), эмфизема, формы легочной эмболии и инфаркта, пневмония, фиброгенные пылевые заболевания, фиброз легких, аллергия, бронхоспазм, гиперчувствительный пневмонит, паразитарные заболевания, синдром Гудпасчера, легочный васкулит, слабоиммунный васкулит, воспаление, ассоциированное с иммунными комплексами, антифосфолипидный синдром, гломерулонефрит, ожирение, артрит, аутоиммунное заболевание сердца, воспалительное заболевание кишечника, ишемически-реперфузионные повреждения, синдром Барракера-Симонса, гемодиализ, васкулит, ассоциированный с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), криоглобулинемия, псориаз, трансплантация, заболевания центральной нервной системы, такие как болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные состояния, болезнь плотных отложений, пузырчатые кожные заболевания, мембранопролиферативный гломерулонефрит II типа (MPGN II), хроническая реакция "трансплантат против хозяина", синдром Фелти, гангренозная пиодермия (PG), гнойный гидраденит (HS), легочная артериальная гипертензия, первичный синдром Шегрена, первичный билиарный холангит, аутосомно-доминантный поликистоз почек и заболевание, ассоциированное с антителами к миелин-олигодендроцитарному гликопротеину (MOGAD).

В композициях и способах, описанных в данном документе, используется олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) и его фармацевтически приемлемые соли (например, его натриевая соль), которые содержат смысловую нить и антисмысловую нить, которые характеризуются значительной идентичностью последовательности с областью гена *CFB* (например, гена *CFB* человека).

Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) можно применять для регуляции активности пути активации системы комплемента, например, путем снижения уровня и/или активности *CFB* в клетке (например, гепатоците), такой как клетка субъекта (например, человека), нуждающегося в этом. Средства на основе олигонуклеотидов нацеливаются на *CFB* в пути активации системы комплемента и не затрагивают активацию (защиту) других путей в альтернативном, классическом и лектиновом путях. Соответственно, в настоящем изобретении описываются композиции и способы для лечения заболеваний или нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента (например, заболеваний или нарушений, опосредованных активацией или нарушением регуляции *CFB*).

Последовательность-мишень фактора В системы комплемента

В данном документе предусмотрены ингибиторы экспрессии *CFB* на основе олигонуклеотидов, которые можно применять для достижения терапевтической пользы. Посредством исследования мРНК *CFB* (см., например, пример 1) и тестирования *in vitro* и *in vivo* было обнаружено, что последовательности мРНК *CFB* применимы в качестве последовательностей для нацеливания, поскольку они поддаются подавлению с использованием олигонуклеотидов. Например, последовательность-мишень *CFB* может содержать последовательность или состоять из последовательности, которая представлена под любым из SEQ ID NO: 13 или 14, которая соответствует нуклеотидам 1827-1845 и 489-507 соответственно из фактора В системы комплемента *Homo sapiens* с эталонной последовательностью NM_001710.6 (SEQ ID NO: 12). Эти последовательности *CFB* могут представлять собой последовательности-мишени для соединения А и соединения В соответственно и их вариантов, описанных в данном документе, которые характеризуются идентичностью последовательности с ними величиной вплоть до 85%. Соединения А и В (и их варианты, описанные в данном документе) также способны эффективно нацеливаться на *CFB* макака-резуса с эталонными последовательностями XM_015122636.2. Кроме того, последовательность-мишень *CFB* может содержать последовательность или состоять из последовательности, которая представлена под SEQ ID NO: 31, которая соответствует нуклеотидам 770-789 из фактора В системы комплемента *Mus musculus* с эталонной последовательностью NM_008198.2 (SEQ ID NO:

32), которая представляет собой мишень для 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 CFB системы комплемента *Rattus norvegicus* с эталонной последовательностью NM_212466.3. На такие области мРНК CFB можно нацеливаться с применением олигонуклеотида, такого как средства на основе dsRNA, описанные в данном документе, в целях подавления экспрессии мРНК CFB и последующей экспрессии белка CFB.

В некоторых вариантах осуществления антисмысловые нити средств на основе олигонуклеотидов (например, олигонуклеотидов для RNAi), описанных в данном документе, могут быть сконструированы так, что они содержат области комплементарности по отношению к мРНК CFB (например, в пределах последовательности-мишени мРНК CFB), в целях нацеливания на мРНК 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 с мРНК CFB в целях подавления ее транскрипции. Область комплементарности может иметь длину 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 по отношению к мРНК CFB, которая имеет длину 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 по отношению к CFB, которая имеет длину 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 по отношению к мРНК CFB, которая имеет длину 19 нуклеотидов.

В определенных случаях средство на основе олигонуклеотида 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 в последовательности, представленной под SEQ ID NO: 12, которая имеет длину 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, которая имеет длину 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, которая имеет длину 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 по отношению к мРНК *CFB* может содержать один или несколько случаев ошибочного спаривания по сравнению с соответствующей последовательностью мРНК *CFB*. 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 вплоть до 1, вплоть до 2, вплоть до 3, вплоть до 4 или вплоть до 5 случаев ошибочного спаривания при условии, что она сохраняет способность образовывать комплементарные пары оснований с мРНК *CFB* в подходящих условиях гибридизации. В качестве альтернативы область комплементарности олигонуклеотида может содержать не более чем 1, не более чем 2, не более чем 3, не более чем 4 или не более чем 5 случаев ошибочного спаривания при условии, что она сохраняет способность образовывать

комплементарные пары оснований с мРНК *CFB* в подходящих условиях гибридизации. Если в области комплементарности имеет место более одного случая ошибочного спаривания, случаи ошибочного спаривания могут располагаться последовательно (например, 2, 3, 4 или 5 подряд) или распределяться по всей области комплементарности, при условии, что олигонуклеотид сохраняет способность образовывать комплементарные пары оснований с мРНК *CFB* в подходящих условиях гибридизации. Например, средство на основе олигонуклеотида может содержать смысловой олигонуклеотид с последовательностью под SEQ ID NO: 4 и его варианты со случаями ошибочного спаривания в количестве вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5 относительно соответствующей последовательности *CFB* под SEQ ID NO: 12 или соответствующую антисмысловую последовательность под SEQ ID NO: 6 и ее варианты со случаями ошибочного спаривания в количестве вплоть до 1, 2, 3, 4 или 5 относительно последовательности под SEQ ID NO: 4.

Типы олигонуклеотидов

Существуют разнообразные структуры олигонуклеотидов, которые применимы для нацеливания на *CFB* в способах по настоящему изобретению, включая средства для RNAi, антисмысловую miRNA, shRNA и другие. Любую из структур, описанных в данном документе или где-либо в другом месте, можно использовать в качестве каркаса для включения последовательности или нацеливания на последовательность, которая описана в данном документе (например, для последовательности "горячей точки" *CFB*, такой как последовательности под SEQ ID NO: 13 и 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 мРНК *CFB* (например, SEQ ID NO: 12). Олигонуклеотиды, предназначенные для снижения экспрессии *CFB*, могут участвовать в путях РНК-интерференции (RNAi) до или после вовлечения 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'-выступающий конец 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 под действием 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 выступают за пределы дуплексной нацеливающей области, так что смысловая нить или антисмысловая нить содержит термодинамически стабилизирующую тетрапетлевою структуру (см., например, патенты США №№ 8513207 и 8927705, а также WO2010033225, которые включены в данный документ посредством ссылки в отношении раскрытия в них этих олигонуклеотидов). Такие структуры могут содержать одностебельные 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 участия в пути РНК-интерференции после вовлечения Dicer, что означает после расщепления под действием Dicer. Такие олигонуклеотиды могут содержать выступающий конец, 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 РНК-мишени (например, SEQ ID NO: 13 и 14), и комплементарную сопровождающую нить, где обе нити отжигаются с образованием дуплекса из 20 п. о. и выступающих концов из 2 нуклеотидов на любом или обоих 3'-концах. Также доступны более длинные олигонуклеотидные конструкции, в том числе олигонуклеотиды, содержащие направляющую нить из 23 нуклеотидов и сопровождающую нить из 21 нуклеотида, где имеется тупой конец на 3'-конце сопровождающей нити и 5'-конце направляющей нити и двухнуклеотидный 3'-выступающий конец направляющей нити в левой части молекулы на 5'-конце сопровождающей нити и 3'-конце направляющей нити. В таких молекулах имеется дуплексная область из 21 пары оснований (см. патенты США №№ 9012138, 9012621 и 9193753, которые включены в данный документ посредством ссылки в отношении их раскрытия, касающегося более длинных олигонуклеотидов).

Олигонуклеотиды, раскрытые в данном документе, могут содержать смысловую и антисмысловую нити, обе из которых имеют длину 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, обе из которых имеют длину в диапазоне 19-22 нуклеотида. Смысловая и антисмысловая нити также могут иметь одинаковую длину. В качестве альтернативы олигонуклеотид может содержать такие смысловую и антисмысловую нити, что в смысловой нити или антисмысловой нити или в обеих из смысловой и антисмысловой нитей имеется 3'-выступающий конец. Например, 3'-выступающий конец в смысловой, антисмысловой или в обеих из смысловой и антисмысловой нитей может иметь длину 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'-выступающий конец направляющей нити в "левой" части молекулы (т. е. на 5'-конце сопровождающей нити и 3'-конце направляющей нити). В таких молекулах может иметься, например, дуплексная область из 20 пар оснований.

Другие олигонуклеотидные конструкции 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, Краунack 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., *Ther.* 2009 Apr; 17(4): 725-32), вилочные siRNA (см., например, Hohjoh, *FEBS Letters*, Vol 557, issues 1-3; Jan 2004, p 193-198), одонитевые 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 литературных источников включен посредством ссылки во всей своей полноте в отношении его соответствующего раскрытия. Дополнительные неограничивающие примеры олигонуклеотидных структур, которые можно применять в некоторых вариантах осуществления для снижения или подавления экспрессии CFB, представляют собой микроРНК (miRNA), короткую шпилечную РНК (shRNA) и короткую siRNA (см. Hamilton et al., *Embo J.*, 2002, 21(17): 4671-4679; см. также публикацию заявки на патент США № 2009/0099115).

Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi) для нацеливания на экспрессию CFB посредством пути RNAi обычно содержат смысловую нить и антисмысловую нить, которые образуют дуплекс друг с другом. Олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi) могут представлять собой одонитевые или двухнитевые рибонуклеиновые кислоты (dsRNA). Кроме того, смысловая и антисмысловая нити могут не быть ковалентно связаны; например, олигонуклеотид может содержать одонитевой разрыв между смысловой и антисмысловой нитями. Олигонуклеотиды (например, олигонуклеотиды для RNAi) могут быть представлены в

форме фармацевтически приемлемой соли. Например, олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) может быть представлен в форме натриевой соли.

Вышеуказанные последовательности олигонуклеотидов (например, олигонуклеотидов для RNAi) представлены в виде последовательностей РНК, которые можно синтезировать внутри клетки; однако эти последовательности также могут быть представлены в виде соответствующей ДНК (например, кДНК), которая может быть включена в вектор по настоящему изобретению. Специалисту в данной области будет понятно, что последовательность кДНК эквивалентна последовательности мРНК, за исключением замены остатков уридина на остатки тимидина, и может применяться для той же цели в данном документе, т. е. для получения антисмыслового олигонуклеотида для подавления экспрессии мРНК *CFB*. 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: 36 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 РНК-векторов 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

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. 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 B, и/или антисмысловая нить может содержать олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3, как в случае соединения A.

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 B на фиг. 2C.

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 A на фиг. 1C.

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-mC-mA-mA-mU-mG-mU-fG-fA-fG-fU-mG-mA-mU-mG-mA-mG-mA-mU-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'-[Me-фосфонат-4O-mU]-S-fA-S-fU-fC-fU-mC-fA-mU-mC-fA-mC-mU-mC-fA-mC-mA-mU-mU-mG-mU-S-mG-S-mG-3',

где mX представляет собой 2'-O-метилрибонуклеотид, fX представляет собой 2'-фтордезоксирибонуклеотид, [ademA-GalNAc] представляет собой 2'-O-GalNAc-модифицированный аденозин, [Me-фосфонат-4O-mU] представляет собой 4'-O-монометилфосфонат-2'-O-метилуридин, "-" обозначает фосфодиэфирную связь, и "-S-" обозначает фосфотиоатную связь, как показано на фиг. 2D, 2E-1 и 2E-2. 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.

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 в отношении примеров пар смысловой нити и антисмысловой нити.

Таблица 1. Олигонуклеотиды для RNAi, нацеливающиеся на мРНК *CFB*

Конструкция	Смысловая нить	SEQ ID NO:	Антисмысловая нить	SEQ ID NO:	Нуклеотиды последовательности-мишени (мРНК <i>CFB</i>)
1	CAGGAAUUC UGAAUUUUA GCAGCCGAA GGCUGC	1	UUAAAAUUCAGGAA UCCUGGG	3	1827-1845 в SEQ ID NO: 12
2	CAGGAAUUC UGAAUUUUA	2	UUAAAAUUCAGGAA UCCUGGG	3	
3	ACAAUGUGAG UGAUGAGAU GCAGCCGAA GGCUGC	4	UAUCUCAUCACUCA CAUGUGG	6	489-507 в SEQ ID NO: 12
4	ACAAUGUGAG UGAUGAGAU	5	UAUCUCAUCACUCA CAUGUGG	6	
5	GUGACCAGAU UUCUUUCAA GCAGCCGAA GGCUGC	15	UUUGAAAAGAAAUC UGGUCACGG	16	770-789 в SEQ ID NO: 32

Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) содержит дуплексную область, образованную между смысловой нитью и антисмысловой нитью. Дуплекс, образованный между смысловой и антисмысловой нитями, может иметь длину от 10 до 30 нуклеотидов (например, иметь длину 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 нуклеотидов). Соответственно, дуплекс, образованный между смысловой и антисмысловой нитями, может иметь длину от 15 до 25 нуклеотидов (например, иметь длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления дуплексная область может иметь длину 20 нуклеотидов.

Область в смысловой нити, которая образует дуплекс с антисмысловой нитью, может содержать нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%

идентична (например, на 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 длиннее 22 нуклеотидов (например, имеет длину 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов), такую как смысловая нить из 36 нуклеотидов, и антисмысловую нить, имеющую длину 18-36 нуклеотидов, такую как антисмысловая нить из 22 нуклеотидов. Олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi) имеет такую длину, что при воздействии Dicer результатом является 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 выступающий конец на 3'-конце антисмысловой нити. 3'-Выступающий конец в антисмысловой нити может иметь длину 1-8 нуклеотидов (например, иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 нуклеотидов). Например, 3'-выступающий конец в антисмысловой нити может иметь длину два нуклеотида. Как правило, олигонуклеотид для RNAi имеет двухнуклеотидный выступающий конец на 3'-конце антисмысловой, направляющей, нити; однако возможны другие выступающие концы. В других вариантах осуществления 3'-выступающий конец может иметь длину 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 выступающий конец на 5'-конце. Выступающий конец может представлять собой 5'-выступающий конец, имеющий длину 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 мРНК-мишени *CFB*. В

качестве альтернативы два концевых нуклеотида на 3'-конце антисмысловой нити могут не быть комплементарны мРНК-мишени *CFB*. 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.

Могут иметься один или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5) случаев ошибочного спаривания при комплементарном спаривании между смысловой и антисмысловой нитями. Если имеется более одного случая ошибочного спаривания между смысловой и антисмысловой нитями, они могут быть расположены последовательно (например, 2, 3 или больше подряд) или распределены по всей области комплементарности. Например, 3'-конец смысловой нити может содержать один или несколько случаев ошибочного спаривания. Соответственно, два случая ошибочного спаривания могут быть введены в 3'-конец смысловой нити. Случаи ошибочного спаривания оснований или дестабилизация сегментов на 3'-конце смысловой нити олигонуклеотида могут улучшать эффективность синтетических дуплексов в ходе RNAi, вероятно посредством облегчения процессинга под действием 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 фактический 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 при этом по сути тех же или сходных свойств комплементарности по сравнению с указанной последовательностью.

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 гена-мишени, она может называться направляющей нитью.

В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить имеет меньшую длину в нуклеотидах, чем смысловая нить. В некоторых примерах олигонуклеотид (например, олигонуклеотид для RNAi), предусмотренный в данном документе, может содержать

антисмысловую нить, имеющую длину 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, имеющую длину от 15 до 30 нуклеотидов (например, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 нуклеотидов). Например, антисмысловая нить может иметь длину от 20 до 25 нуклеотидов (например, 20, 21, 22, 23, 24 и 25 нуклеотидов). В определенных вариантах осуществления антисмысловая нить может иметь длину 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. Например, олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, может содержать антисмысловую нить, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, как в соединении В, показанном на фиг. 2С. В некоторых вариантах осуществления антисмысловая нить может представлять собой фармацевтически приемлемую соль (например, натриевую соль) SEQ ID NO: 6. SEQ ID NO: 6 может иметь химическую структуру, показанную на фиг. 2В. В качестве альтернативы антисмысловая нить может содержать последовательность под SEQ ID NO: 3, как в соединении А, показанном на фиг. 1С. 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 содержать аналог фосфата; 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, имеющую длину 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, имеющую длину 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 смысловая нить может иметь длину 20 нуклеотидов. В других вариантах осуществления смысловая нить может иметь длину 36 нуклеотидов.

Олигонуклеотид может содержать смысловую нить, которая содержит непрерывную последовательность длиной от 7 до 36 нуклеотидов (например, длиной 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, длиной 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 и 30 нуклеотидов) относительно последовательности под 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, имеющую длину 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. Смысловая нить, содержащая структуру стебель-петля, может иметь длину в диапазоне от 10 до 50 нуклеотидов (например, иметь длину 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, смысловая нить, содержащая структуру стебель-петля, может иметь длину в диапазоне от 20 до 40 нуклеотидов (например, иметь длину 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 и 40 нуклеотидов). Например, смысловая нить, содержащая структуру стебель-петля, может иметь длину 36 нуклеотидов.

Кроме того, область структуры стебель-петля в смысловой нити способна образовывать дуплексную область сама с собой. Дуплексная область, содержащаяся в структуре стебель-петля, может иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 нуклеотидов.

Например, дуплексная область, содержащаяся в структуре стебель-петля, может иметь длину 6 нуклеотидов. Структура стебель-петля может обеспечивать для средства на основе олигонуклеотида защиту от разрушения (например, ферментативного разрушения) и может содействовать характеристикам нацеливания для доставки в клетку-мишень. Например, петля может предоставлять дополнительные 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 как S_1 -L- S_2 , в которой S_1 комплементарен S_2 , и в которой L образует петлю между S_1 и S_2 длиной вплоть до 10 нуклеотидов (например, длиной 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов). Соответственно, петля между S_1 и S_2 может иметь длину 4 нуклеотида, образующих тетрапетлю, описанную в данном документе. В некоторых вариантах осуществления область S_1 имеет длину 6 нуклеотидов, области S_2 имеют длину 6 нуклеотидов, и область L представляет собой тетрапетлю из 4 нуклеотидов.

Смысловая нить олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) может содержать область структуры стебель-петля и область, которая образует дуплекс с антисмысловой нитью. Область структуры стебель-петля может содержать нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере 85% идентична (например, на 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 структуры стебель-петля содержит олигонуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 7.

Петля (L) структуры стебель-петля может представлять собой тетрапетлю (например, в пределах тетрапетлевой структуры с односторонним разрывом). Петля структуры стебель-петля может содержать нуклеотидную последовательность GAAA. Тетрапетля 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 нуклеиновой кислоты гуанозина и аденозина.

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. 2С. SEQ ID NO: 4 может иметь химическую структуру, показанную на фиг. 2А. 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. 1С. SEQ ID NO: 1 может иметь химическую структуру, показанную на фиг. 1А. 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, биодоступности, устойчивости к разрушению под действием нуклеаз, 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 аналогичным носителем или их заключения в них. Однако если олигонуклеотид не защищен LNP или аналогичным 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 по существу 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 незащищенной 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 ферментативного

разрушения, способности нацеливаться на требуемую клетку после введения *in vivo* и/или термодинамической стабильности).

Модификации сахаров

Модифицированный сахар, также называемый в данном документе аналогом сахара, предусматривает модифицированный дезоксирибозный или рибозный фрагмент, в котором в 2'-, 3'-, 4'- и/или 5'-положении атома углерода сахара имеют место одна или несколько модификаций. Модифицированный сахар также может предусматривать неприродные альтернативные углеродные структуры, такие как присутствующие в "запертых" нуклеиновых кислотах ("LNA") (см. Koshkin et al. (1998), *Tetrahedron* 54, 3607-3630), "незапертых" 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). Работы Koshkin et al., Snead et al. и Imanishi and Obika включены в данный документ посредством ссылки в отношении их раскрытия, относящегося к модификациям сахаров.

Модификация нуклеотида в сахаре может предусматривать 2'-модификацию. 2'-Модификация может представлять собой 2'-аминоэтил, 2'-фтор, 2'-О-метил, 2'-О-метоксиэтил и 2'-дезоксид-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. Модификация в сахаре может предусматривать модификацию сахарного кольца, которое может иметь модификацию одного или нескольких атомов углерода сахарного кольца. Например, модификация сахара нуклеотида может предусматривать 2'-атом кислорода сахара, связанный с 1'-атомом углерода или 4'-атомом углерода сахара, или 2'-атом кислорода, связанный с 1'-атомом углерода или 4'-атомом углерода посредством этиленового или метиленового мостика. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеотид может содержать ациклический сахар, в котором отсутствует связь 2'-атома углерода с 3'-атомом углерода. 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), в том числе в обеих из смысловой нити и антисмысловой нити, являются модифицированными.

Модифицированный нуклеотид может содержать 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'-фтор-модификация представляет собой 2'-фтордезоксирибонуклеозид и/или 2'-О-метил-модификация 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, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 и 49) 2'-О-метил-модификаций. 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, средство на основе олигонуклеотида может содержать смысловую нить под SEQ ID NO: 4 и антисмысловую нить под SEQ ID NO: 6, или средство на основе олигонуклеотида может содержать смысловую нить под SEQ ID NO: 1 и антисмысловую нить под SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления в случае с такими олигонуклеотидами одно или несколько 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/или одно или несколько из положений 1, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 и 22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метил-модифицированного 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, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 и 22 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-О-метил-модифицированного нуклеозида, такого как 2'-О-метилрибонуклеозид. В других вариантах осуществления одно или несколько 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/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-метил-модифицированного нуклеозида, такого как 2'-О-метилрибонуклеозид. В определенных 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-метил-модифицированного 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-фтор-модификаций. В случае с такими олигонуклеотидами одно или несколько из положений 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеозида. Например, все из положений 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и/или все из положений 2, 3, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеозида. В другом примере 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'-фтор-модифицированного нуклеозида.

В случае с олигонуклеотидами, содержащими смысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 4, и антисмысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 6, одно или несколько из положений 1-7, 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-метил-модифицированного нуклеозида. Кроме того, все из положений 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и все из положений 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метил-модифицированного нуклеозида. В случае с олигонуклеотидами со смысловой нитью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 4, и антисмысловой нитью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 6, 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'-фтор-модифицированного 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'-фтор-модифицированного нуклеозида.

Например, в случае с олигонуклеотидами со смысловой нитью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 4, и антисмысловой нитью, содержащей последовательность под SEQ ID NO: 6, все из положений 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и все из положений 1, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метил-модифицированного 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'-фтор-модифицированного нуклеозида, как показано на фиг. 2А и 2В соответственно.

В случае с олигонуклеотидами, содержащими 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, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метил-модифицированного нуклеозида. В некоторых вариантах осуществления все из положений 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и все из положений 1, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метил-модифицированного нуклеозида. Дополнительно в случае с олигонуклеотидами, содержащими смысловую нить с последовательностью под SEQ ID NO: 1 и антисмысловую нить с последовательностью под SEQ ID NO: 3, одно или несколько из положений 8-11 смысловой нити и/или одно или несколько из положений 2, 3, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеозида. В некоторых вариантах осуществления все из положений 8-11 смысловой нити и все из положений 2, 3, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити модифицированы с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеозида. Например, в случае с олигонуклеотидами, содержащими смысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 1, и антисмысловую нить, содержащую последовательность под SEQ ID NO: 3, все из положений 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и все из положений 1, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити могут быть модифицированы с помощью 2'-О-метил-модифицированного нуклеозида; и все из положений 8-11 смысловой нити и все из положений 2, 3, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой

нити могут быть модифицированы с помощью 2'-фтор-модифицированного нуклеозида, как показано на фиг. 1А и 1В соответственно.

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.

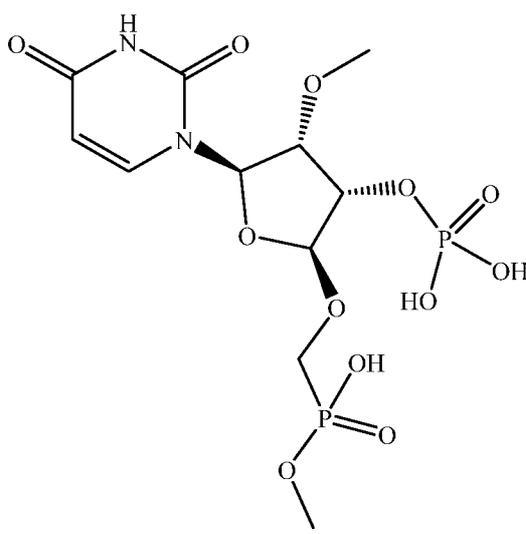
5'-Концевые фосфаты

5'-Концевые фосфатные группы олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) могут усиливать взаимодействие 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 восприимчивы к разрушению под действием фосфатаз или других ферментов, которые могут ограничивать их биодоступность *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды содержат аналоги 5'-фосфатов, которые устойчивы к такому разрушению. Следовательно, уридин на 5'-конце антисмысловой нити может содержать аналог фосфата. Аналог фосфата 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 ("имитатору фосфата") (см. Prakash et al., *Nucleic Acids Res.* 2015 Mar 31; 43(6): 2993-3011, содержание которой, относящееся к аналогам фосфата, включено в данный документ посредством ссылки). Было разработано множество имитаторов фосфата, которые могут присоединяться к 5'-концу (см. патент США № 8927513, содержание которого, относящееся к аналогам фосфата, включено в данный документ посредством ссылки). Были разработаны другие модификации для 5'-конца олигонуклеотидов (см. WO 2011/133871, содержание которой, относящееся к аналогам фосфата, включено в данный документ посредством ссылки). В определенных вариантах осуществления гидроксильная группа может быть присоединена к 5'-концу олигонуклеотида.

Олигонуклеотид может содержать аналог фосфата в 4'-положении атома углерода сахара, называемый "4'-аналог фосфата". См., например, WO 2018/045317, содержание которой, относящееся к аналогам фосфата, включено в данный документ посредством ссылки. Олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, может содержать 4'-аналог фосфата в 5'-концевом нуклеотиде. В некоторых вариантах осуществления аналог фосфата представляет собой оксиметилфосфонат, в котором атом кислорода

оксиметильной группы связан с сахарным фрагментом (например, по его 4'-атому углерода) или его аналогом. В других вариантах осуществления 4'-аналог фосфата представляет собой тиометилфосфонат или аминометилфосфонат, в котором атом серы тиометильной группы или атом азота аминометильной группы связан с 4'-атомом углерода сахарного фрагмента или его аналога. В определенных вариантах осуществления 4'-аналог фосфата 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 . В более типичном случае 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'-аналог фосфата представляет собой 5'-метоксифосфонат-4'-окси. В некоторых вариантах осуществления 4'-аналог фосфата представляет собой 4'-(метилметоксифосфонат). В некоторых вариантах осуществления аналог фосфата представляет собой 4'-O-монометилфосфонатный аналог.

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



при этом модифицированный нуклеотид называется 4'-O-монометилфосфонат-2'-O-метилуридином ([Me-фосфонат-4O-mU]) или 5'-метоксифосфонат-4'-окси-2'-O-метилуридином (5'-MeMOP). 5'-Метоксифосфонат-4'-окси-2'-O-метилуридин (5'-MeMOP)

может представлять собой первый нуклеотид на 5'-конце антисмысловой нити. В некоторых вариантах осуществления первый нуклеотид на 5'-конце любой из SEQ ID NO: 3 или 6 может представлять собой 5'-метоксифосфонат-4'-окси-2'-О-метилуридин.

Модифицированные межнуклеозидные связи

Модификации или замены фосфата в олигонуклеотиде могут приводить к получению 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 фосфодитионатную связь, фосфотионатную связь, фосфотриэфирную связь, тионоалкилфосфонатную связь, тионоалкилфосфотриэфирную связь, фосфорамидитную связь, фосфонатную связь или боранофосфатную связь. По меньшей мере одна модифицированная межнуклеотидная связь любого из олигонуклеотидов, раскрытых в данном документе, может представлять собой фосфотионатную связь. В определенных вариантах осуществления все модифицированные межнуклеотидные связи олигонуклеотида могут представлять собой фосфотионатные связи.

Олигонуклеотид, описанный в данном документе, может содержать фосфотионатную 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 фосфотионатную 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 фосфотионатную связь между положениями 1 и 2, и антисмысловая нить, содержащая последовательность под SEQ ID NO: 3 или 6, может

содержать фосфотиоатную 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 в 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 № 20080274462, 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, являться нуклеотидом с удаленным основанием).

В некоторых вариантах осуществления универсальное основание представляет собой гетероциклический фрагмент, расположенный в 1'-положении сахарного фрагмента нуклеотида в модифицированном нуклеотиде или эквивалентном положении замещающего сахарного фрагмента нуклеотида, который в случае присутствия в дуплексе может быть расположен напротив более чем одного типа основания без существенного изменения структуры дуплекса. В некоторых вариантах осуществления по сравнению с эталонной однонитевой нуклеиновой кислотой (например, олигонуклеотидом или полинуклеотидом), которая полностью комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени, однонитевая нуклеиновая кислота, содержащая универсальное основание, образует дуплекс с нуклеиновой кислотой-мишенью, который характеризуется более низкой T_m , чем дуплекс, образованный с комплементарной нуклеиновой кислотой. Однако в некоторых вариантах осуществления по сравнению с эталонной однонитевой нуклеиновой кислотой, в которой универсальное основание было заменено на основание с получением одного ошибочного спаривания, однонитевая нуклеиновая кислота, содержащая универсальное основание, образует дуплекс с нуклеиновой кислотой-мишенью, который характеризуется более высокой T_m , чем дуплекс, образованный с нуклеиновой кислотой, содержащей ошибочно спаренное основание. Неограничивающие примеры универсальных связывающихся нуклеотидов включают инозин, 1- β -D-рибофуранозил-5-нитроиндол и/или 1- β -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.

Каждая из вышеуказанных включена посредством ссылки в данный документ в отношении ее раскрытия, относящегося к модификациям оснований.

Обратимые модификации

Хотя определенные модификации можно осуществлять для защиты олигонуклеотида от среды *in vivo* перед тем, как он достигнет клеток-мишеней, они могут снижать эффективность или активность олигонуклеотида после того, как он достигнет цитозоля клетки-мишени. Обратимые модификации можно осуществлять таким образом, чтобы молекула сохраняла требуемые свойства вне клетки, и они затем удалялись после попадания в цитозольную среду клетки. Обратимая модификация может быть удалена, например, под действием внутриклеточного фермента или под действием 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 переуступленную Traversa Therapeutics, Inc. ("Traversa"), публикацию согласно РСТ № WO 2015/188197 авторства Solstice Biologics, Ltd. ("Solstice"), Meade et al., Nature Biotechnology, 2014,32:1256-1263 ("Meade"), публикацию согласно РСТ № WO 2014/088920 авторства Merck Sharp & Dohme Corp, каждая из которых включена посредством ссылки в отношении раскрытия в них таких модификаций. Обратимая модификация межнуклеотидных дифосфатных связей выполняется с возможностью внутриклеточного расщепления под действием восстанавливающей среды цитозоля (например, глутатиона). Более ранние примеры включают нейтрализующие фосфотриэфирные модификации, которые, как сообщалось, способны расщепляться внутри клеток (см. Dellinger et al. J. Am. Chem. Soc. 2003,125:940-950).

Такая обратимая модификация обеспечивает защиту в ходе 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 цитозоль клетки, где уровни глутатиона выше по сравнению с внеклеточным пространством, модификация устраняется, и результатом является отщепленный олигонуклеотид. При использовании обратимых глутатион-чувствительных фрагментов можно вводить стерически более крупные химические группы в олигонуклеотид, представляющий интерес, по сравнению с

вариантами, доступными при использовании необратимых химических модификаций. Это обусловлено тем, что такие более крупные химические группы будут удаляться в цитозоле и, следовательно, не будут препятствовать биологической активности олигонуклеотидов внутри цитозоля клетки. Благодаря этому 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 сниженная 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'-атому углерода сахара модифицированного нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный фрагмент расположен при 5'-атоме углерода сахара, в частности, если модифицированный нуклеотид представляет собой 5'-концевой нуклеотид олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный фрагмент расположен при 3'-атоме углерода сахара, в частности, если модифицированный нуклеотид представляет собой 3'-концевой нуклеотид олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления глутатион-чувствительный фрагмент содержит сульфонильную группу. См., например, US 2019/0177355, содержание которой включено в данный документ посредством ссылки в отношении ее соответствующего раскрытия.

Нацеливающие лиганды

Может требоваться 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 содержать углевод, 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 используется для нацеливания на сосудистую сеть опухоли или клетки глиомы, пептид CREKA (SEQ ID NO: 78) для нацеливания на сосудистую сеть опухоли или стому, трансферрин, 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 N-ацетилгалактозаминовых фрагментов (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 выступающим концом 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.

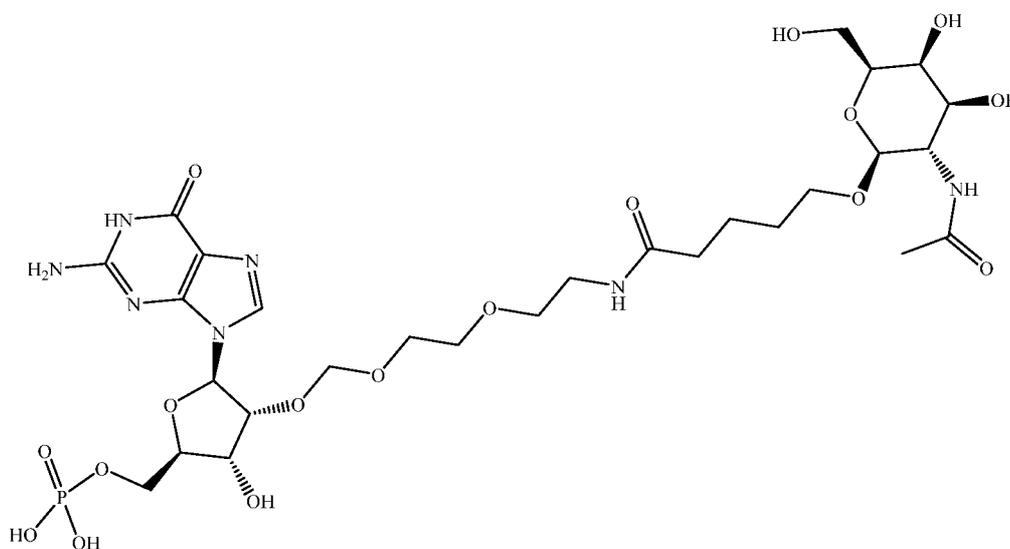
В некоторых вариантах осуществления требуется нацеливать олигонуклеотид, который снижает экспрессию CFB, на гепатоциты печени субъекта. Для данной цели можно использовать любой подходящий фрагмент, нацеливающийся на гепатоциты.

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 (асиалогликопротеинов). 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 больше) моновалентным GalNAc и, как правило, конъюгирован с 3 или 4 моновалентными фрагментами GalNAc. Фрагмент(фрагменты) GalNAc могут присутствовать в пределах петлевой области 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 интернализироваться и интегрироваться во внутриклеточный аппарат RNAi, называемый РНК-индуцируемым комплексом сайленсинга (RISC). Белок Argonaute-2 (Argo-2) RISC в данном комплексе нацеливает антисмысловую нить олигонуклеотидного дуплекса на комплементарную ей мРНК *CFB* и инициирует ее разрушение, блокируя таким образом трансляцию мишени.

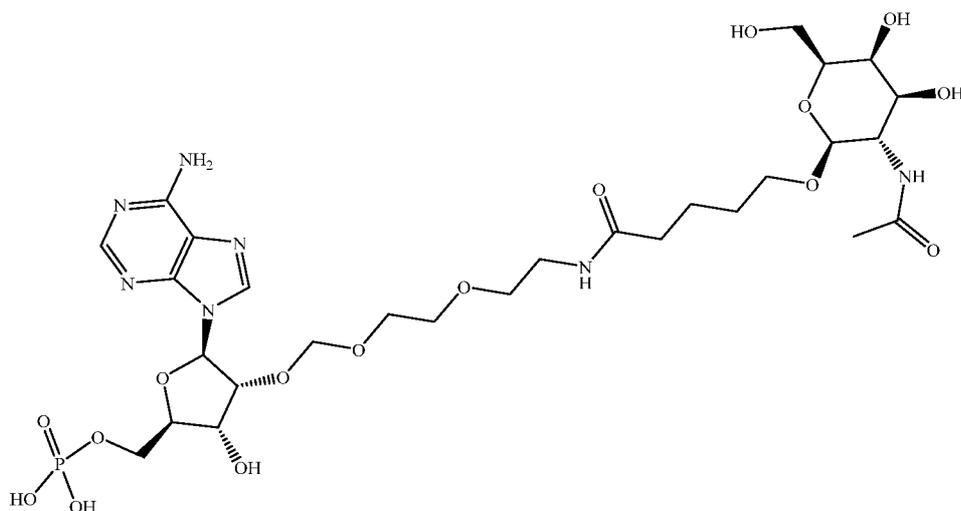
В некоторых вариантах осуществления каждый из 2-4 нуклеотидов петли (L) в структуре стебель-петля конъюгирован с отдельным фрагментом GalNAc. В некоторых вариантах осуществления три нуклеотида петли стебля олигонуклеотида могут быть непосредственно или опосредованно конъюгированы с тремя отдельными моновалентными 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, называемый [ademG-GalNAc] или 2'-аминодиэтоксиметанолгуанин-GalNAc, как изображено ниже:

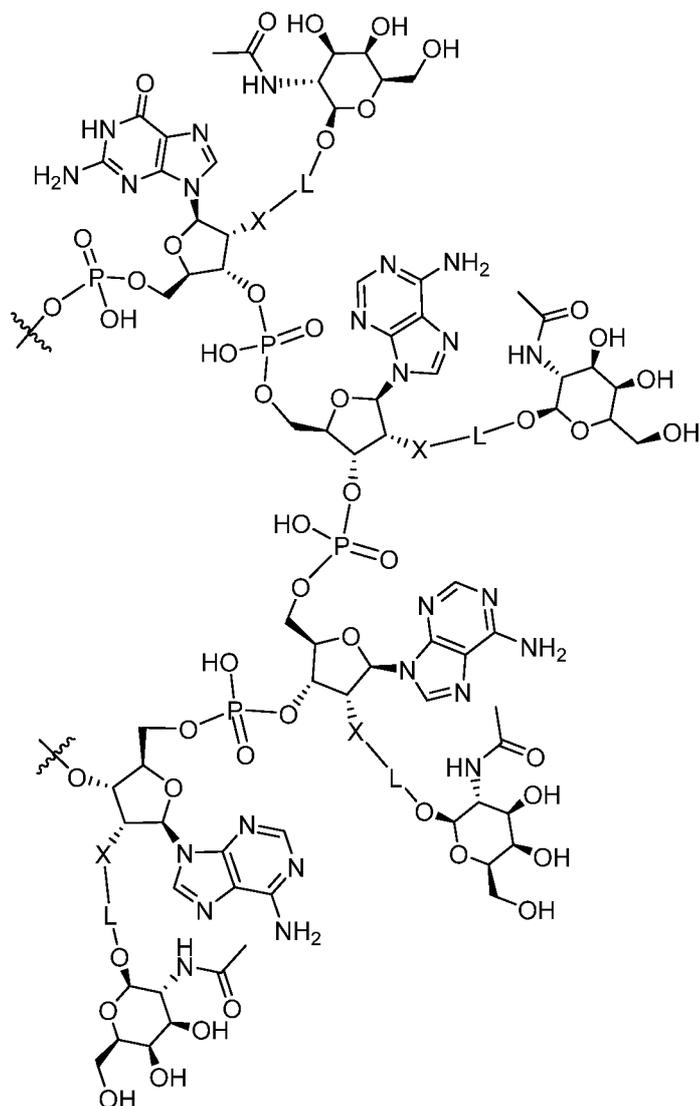


Дополнительно или в качестве альтернативы олигонуклеотид в данном документе может содержать моновалентный GalNAc, присоединенный к адениновому нуклеиновому

основанию, называемый 2'-O-GalNAc-модифицированным аденозином [ademA-GalNAc] или 2'-аминодиэтоксиметаноладенин-GalNAc, как изображено ниже.



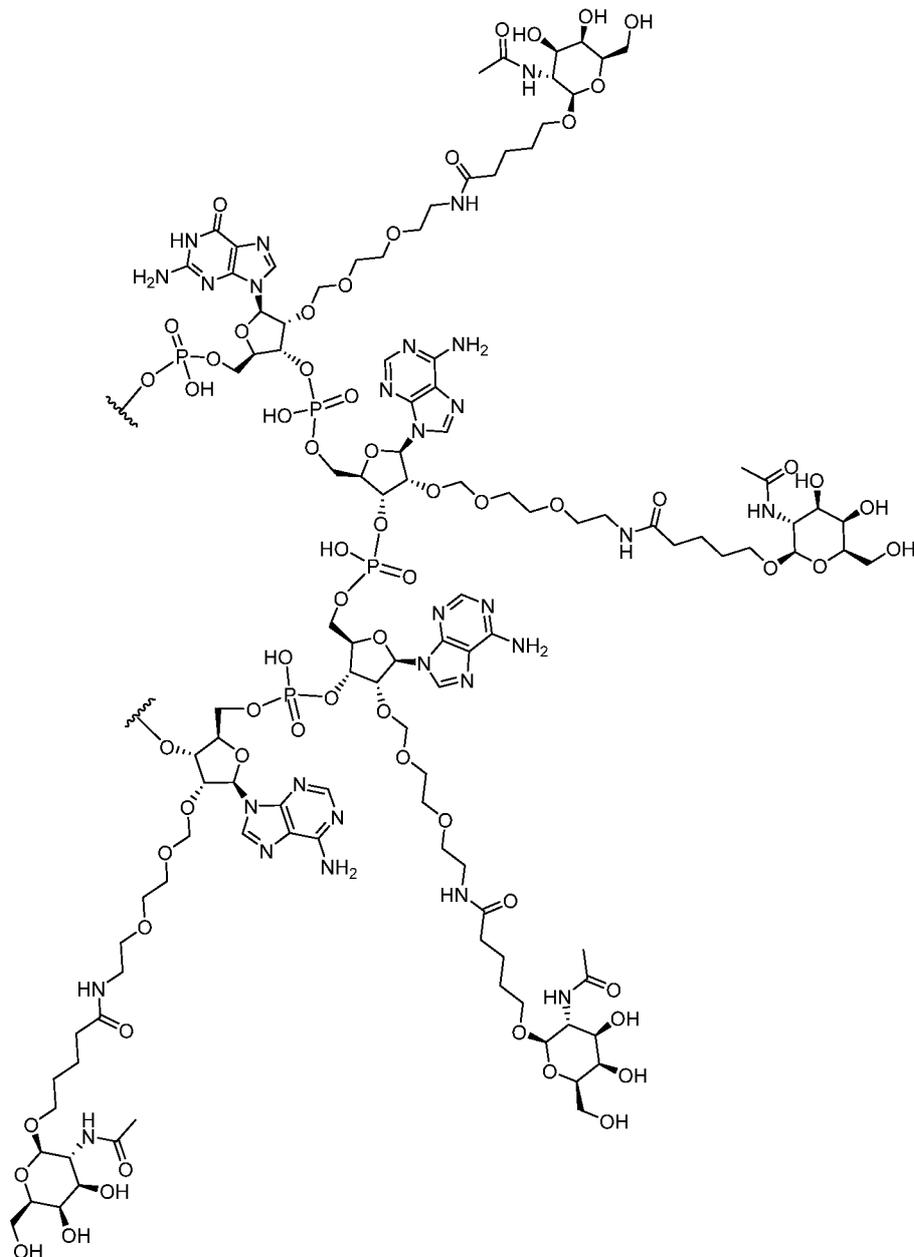
Пример такой конъюгации показан ниже для петли, содержащей в направлении от 5'-конца к 3'-концу нуклеотидную последовательность GAAA (L = линкер, X = гетероатом), где показаны точки присоединения к стеблю. Такая петля может присутствовать, например, в нуклеотидных положениях 27-30 молекулы, показанной на фиг. 1А и 2А (см. также фиг. 1С и 2С). В химической формуле \times представляет точку присоединения к нити олигонуклеотида.



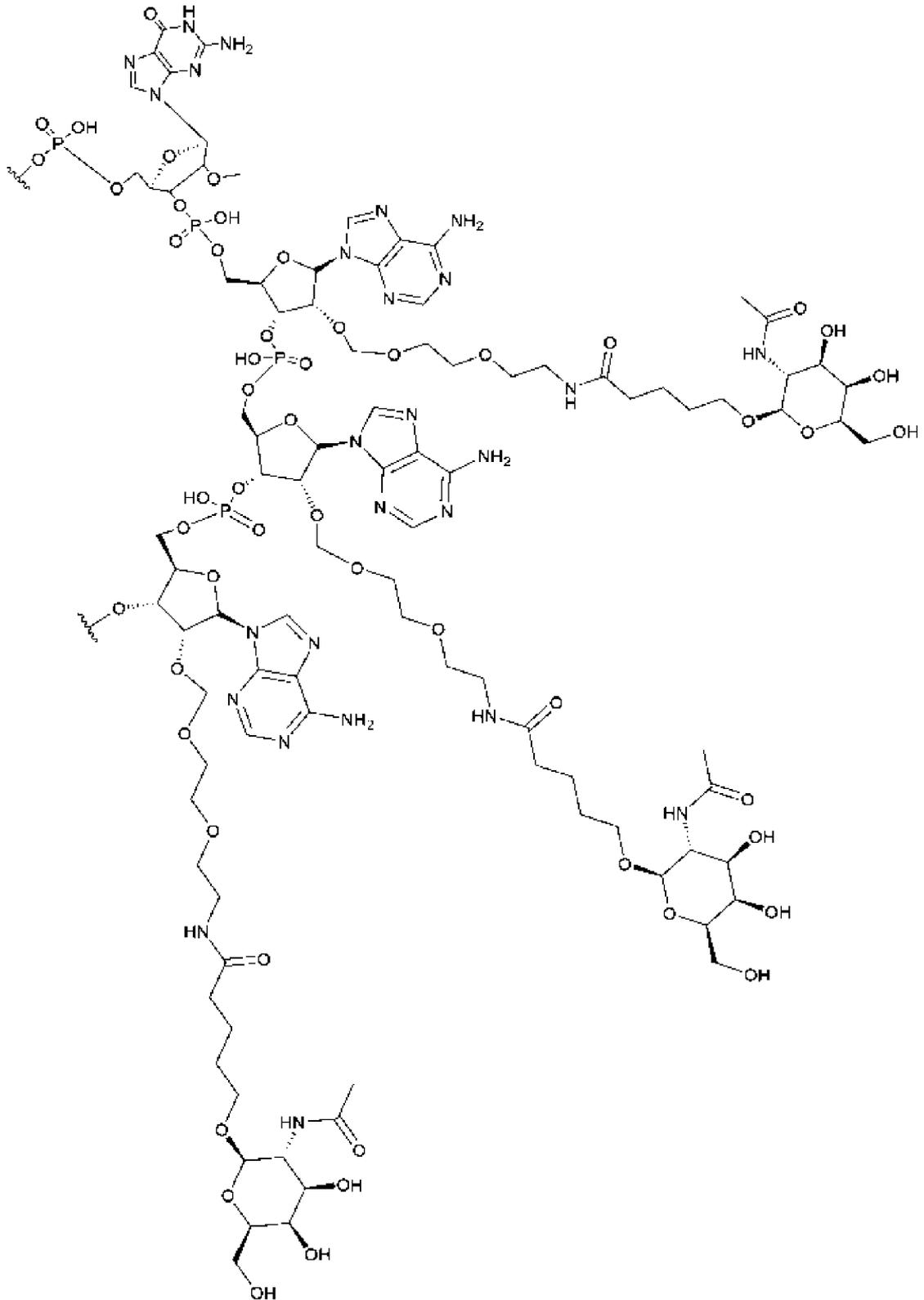
Подходящие способы или химические методы (например, клик-химию) можно применять для связывания нацеливающего лиганда с нуклеотидом. Нацеливающий лиганд может быть конъюгирован с нуклеотидом с помощью линкера для клик-химии. Кроме того, можно использовать линкер на основе ацетала для конъюгации нацеливающего 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, относящееся к таким линкерам, включено в данный документ посредством ссылки. Линкер может представлять собой лабильный линкер. Однако в других вариантах осуществления линкер является стабильным (нелабильным).

Ниже показан пример петли, содержащей в направлении от 5'-конца к 3'-концу нуклеотиды GAAA, в которой фрагменты GalNAc присоединены к нуклеотидам петли с помощью ацетального линкера. Такая петля может присутствовать в олигонуклеотиде, раскрытом в данном документе (см., например, положения 27-30 олигонуклеотидов,

имеющих последовательности под SEQ ID NO: 1 и 4). В химической формуле  представляет точку присоединения к нити олигонуклеотида.



В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид в данном документе (например, олигонуклеотид для RNAi) содержит смысловую нить, имеющую тетрапетлю, где три (3) фрагмента GalNAc конъюгированы с нуклеотидами, образующими тетрапетлю, 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, имеющую тетрапетлю, содержащую GalNAc-конъюгированные нуклеотиды, где тетрапетля содержит следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления предусмотрено удлинение дуплекса (например, длиной вплоть до 3, 4, 5 или 6 пар оснований) между нацеливающим лигандом (например, фрагментом GalNAc) и олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi). В некоторых вариантах осуществления удлинение дуплекса между нацеливающим лигандом (например, фрагментом GalNAc) и олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi) имеет длину 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 разрушение, 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 CFB. Такие композиции можно соответствующим образом составлять так, чтобы при введении субъекту в непосредственную среду клетки-мишени либо системно достаточная часть олигонуклеотидов попадала в клетку для снижения экспрессии CFB. Любые разнообразные подходящие составы на основе олигонуклеотидов можно использовать для доставки олигонуклеотидов для снижения уровня CFB, как раскрыто в данном документе. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид, фармацевтическая композиция, вектор или клетка составлены в буферных растворах, таких как фосфатно-солевые буферные растворы, липосомах, мицеллярных структурах, векторах и капсидах.

Составы, раскрытые в данном документе, могут содержать вспомогательное вещество. Вспомогательное вещество может придавать композиции улучшенную стабильность, улучшенное всасывание, улучшенную растворимость и/или усиление терапевтических свойств активного ингредиента. Вспомогательное вещество может представлять собой буферное средство (например, цитрат натрия, фосфат натрия, трис-основание или гидроксид натрия) или среду-носитель (например, забуференный раствор, вазелин, диметилсульфоксид или минеральное масло). В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть лиофилизирован для увеличения его срока хранения и затем превращен в раствор 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 разложения (например, декстран, фикоилл или желатин).

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

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (при условии растворимости в воде) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсии. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Stremophor EL (BASF, Парсиппани, 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 инъекционные растворы можно получать путем включения олигонуклеотидов в необходимом количестве в выбранный растворитель с одним или комбинацией из перечисленных выше ингредиентов, при необходимости с последующей стерилизующей фильтрацией.

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

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая олигонуклеотид, представляет собой раствор, не содержащий консервантов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит стерильный раствор в WFI. В некоторых вариантах осуществления производят титрование с помощью 0,1 н. NaOH или 0,1 н. HCl для доведения pH раствора до целевого значения, составляющего приблизительно 7,2 (например, pH 7,2). В некоторых вариантах осуществления общая концентрация олигонуклеотида в форме свободной кислоты может составлять приблизительно 160 мг/мл (например, 160 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления WFI может быть добавлена для доведения фармацевтической композиции до желаемой общей концентрации олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления целевой объем заполнения составляет приблизительно 1,3 мл в стеклянном флаконе объемом 2 мл. В некоторых вариантах осуществления раствор предназначен для подкожного введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления композиция может содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% терапевтического средства (например, олигонуклеотида для снижения экспрессии *CFB*) или больше, хотя процентное содержание

активного(активных) ингредиента(ингредиентов) может составлять от приблизительно 1% до приблизительно 80% или больше от веса или объема общей композиции. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полужизни, путь введения, срок хранения продукта, а также другие фармакологические аспекты будут приниматься во внимание специалистом в области получения таких фармацевтических составов, и ввиду этого может быть желательным разнообразие доз и схем лечения.

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

Фармацевтическое применение

В данном документе раскрыты способы доставки в клетку или субъекту эффективного количества любого из олигонуклеотидов, раскрытых в данном документе, в целях снижения экспрессии CFB 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 активации системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции CFB), с применением любого подходящего способа доставки нуклеиновой кислоты. Например, олигонуклеотиды могут быть доставлены в клетку путем инъекции раствора, содержащего олигонуклеотиды, бомбардировки частицами, покрытыми олигонуклеотидами, осуществления воздействия на клетку или организм 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 стабильной экспрессии полинуклеотида, кодирующего олигонуклеотид (например, путем интеграции в ядерный или митохондриальный геном клетки млекопитающего), или посредством 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 снижает экспрессию *CFB*, 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 применять другие способы доставки олигонуклеотидов в клетки, такие как транспорт, опосредованный липидными носителями, транспорт, опосредованный химическими веществами, трансфекция с помощью катионных липосом, как, например, с фосфатом кальция, и использование 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 помощью вектора, например, вирусного вектора (например, аденовируса, ретровируса, вируса осповакцины, поксвируса, аденоассоциированного вируса или вируса простого герпеса), как описано выше, или невирусного вектора (например, плазмид или синтетических мРНК). В некоторых вариантах осуществления трансгены можно вводить путем прямой инъекции субъекту, например, в место действия или рядом с ним (например, в печень или рядом с ней), или в кровотоки.

Подавление CFB

После введения олигонуклеотиды по настоящему изобретению способны к связыванию с мРНК *CFB* и подавлению ее экспрессии. Подавление экспрессии гена *CFB* может проявляться в снижении количества мРНК, экспрессируемой первой клеткой или группой клеток (такие клетки могут присутствовать, например, в образце, выделенном (например, полученном) из организма субъекта), в которых ген *CFB* 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 данные клетки) таким образом, что экспрессия гена *CFB* подавляется, по сравнению со второй клеткой или группой клеток, которые по существу идентичны первой клетке или группе клеток, но которые не были обработаны таким образом (контрольной(контрольными) клеткой(клетками), не обработанными олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi) или не обработанными олигонуклеотидом (например, олигонуклеотидом для RNAi), нацеливающимся на ген, представляющий интерес). Уровень мРНК-мишени можно измерять с применением методик, широко известных специалисту в данной области, таких как RT-qPCR. Степень подавления может быть выражена следующим образом:

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

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

Последствия подавления мРНК *CFB* можно подтвердить посредством соответствующего анализа для оценки одного или нескольких свойств клетки или субъекта или посредством биохимических методик, которые позволяют оценивать молекулы, указывающие на экспрессию *CFB* (например, РНК, белка). Степень, в которой олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, снижает уровни экспрессии *CFB*, оценивают путем сравнения уровней экспрессии с соответствующим контролем (например, уровнем экспрессии мРНК *CFB* в клетке или популяции клеток, в которые олигонуклеотид не был доставлен или в которые был доставлен отрицательный контроль).

Соответствующий контрольный уровень экспрессии мРНК *CFB* может представлять собой предварительно определенные уровень или значение, так что контрольный уровень не нужно измерять каждый раз. Предварительно определенные уровень или значение могут иметь разнообразные формы, включая одиночное пороговое значение, такое как медианное или среднее значение. Например, предварительно определенные уровень или значение могут находиться на уровне точно или приблизительно 200 мг/мл белка *CFB*, что соответствует уровню белка *CFB*, который обычно обнаруживается в сыворотке крови здоровых субъектов.

Уровень экспрессии мРНК *CFB* в образце можно определять, например, путем выявления транскрибируемого полинуклеотида или его части, например, мРНК. РНК можно экстрагировать из клеток с помощью методик экстракции РНК, в том числе, например, с помощью кислотной экстракции с использованием фенола/гуанидинизотиоцианата (RNAzol™ B; Biogenesis), наборов для получения РНК RNEASY™ (Qiagen) или RAXGENE™ (PreAnalytix, Швейцария). мРНК *CFB* в образце также можно определять с помощью ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR). Например, РНК можно экстрагировать путем гомогенизации образцов ткани в лизирующем реагенте QIAzol с помощью TissueLyser II (Qiagen) и очистки с применением технологии MAGMAX® (ThermoFisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Затем можно использовать наборы для высокопроизводительной обратной транскрипции кДНК (ThermoFisher Scientific) для получения кДНК. Использовали специфические праймеры и зонды для *CFB* и контрольный ген "домашнего хозяйства" для ПЦР в системе выявления посредством ПЦР в режиме реального времени CFX384 (BioRad Laboratories), и использовали программное обеспечение BioRad CFX Maestro для оценки значений Ct; уровень экспрессии рассчитывали в EXCEL® и наносили на график в Prism (GraphPad). Праймеры, которые можно использовать для RT-PCR, включают те, что описаны в таблице 2. Праймеры, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под любым из SEQ ID NO: 39-42, можно использовать для определения уровня *CFB* в клетках человека. Аналогичным образом праймеры, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 43 и 44, можно использовать для определения уровня *CFB* в клетках обезьяны. Кроме того, праймеры, имеющие последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 43 и 44, можно использовать для определения уровня *CFB* в клетках мыши.

Таблица 2. Праймеры, используемые для RT-PCR

Ген-мишень	Праймеры	Последовательность/ID зонда	Краситель и гаситель	SEQ ID NO:
hCFB-F2198	Прямой	GACTCGGAAGGAGGTCTACAT	N/A	39
hCFB-R2279	Обратный	CCTCTGAGATGTCCTTGACTTTG	N/A	40
hCFB-P2235	Зонд	/56- FAM/AAAGGCAGC/ZEN/TGTGAGAGAG ATGCT /3IABkFQ/	FAM/ZEN/ IABkFQ	69
hCFB-F1045	Прямой	AACAGAAGCGGAAGATCGTC	N/A	41
hCFB-R1194	Обратный	TCACACCATAACTTGCCACC	N/A	42
hCFB-P1126	Зонд	CCAGCAACTTCACAGGAGCCAAAA	FAM/ZEN/ IABkFQ	70
CFB обезьяны	Тагман	Mf02805463_g1	5'-FAM	--
	Прямой	AAT GAA CTG CAG GAC GAG G	N/A	43
	Обратный	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TCC	N/A	44
	Зонд	/5HEX/CAC TGA AGC /ZEN/GGG AAG GGA CTG G/3IABkFQ/	5'-Hex, Zen, 3'- IABkFQ	72
RhHPR T1	RhHPRT1-F583	CTT TCC TTG GTC AGG CAG TAT	N/A	45
	RhHPRT1-R642	CAA CAC TTC GTG GAG TCC TT	N/A	46
	RhHPRT1-R607	/5HEX/CC AAA GAT G/ZEN/G TCA AGG TCG CAA GC/3IABkFQ/	5'-HEX, ZEN, 3'-IABLFQ	74
RhPPIB	Тагман	Mf02802985_m1	5'-VIC-MGB	--
CFB	mCFB-F2323	CGG AAG GAG GTG TAC ATC AAG	N/A	47
	mCFB-R2391	GAG GCA TCT TTG ACC TTC TCA TA	N/A	48

Ген-мишень	Праймеры	Последовательность/ID зонда	Краситель и гаситель	SEQ ID NO:
	mCFB P2367	/56-FAM/AG AGA TGC T/ZEN/A CAA AGG CCC AAG GC/3IABkFQ/	FAM/ZEN/IABk FQ	76
HPRT F576 Mm	Прямой	CAA ACT TTG CTT TCC CTG GT	N/A	49
HPRT R664 Mm	Обратный	CAA CAA AGT CTG GCC TGT ATC	N/A	50
HPRT P616 Mm	Зонд	TGGTTAAGGTTGCAAGCTTGCTGGTG	5'-Hex, Zen, 3'- IABkFQ	77

Типичные форматы анализа с использованием гибридизации рибонуклеиновых кислот включают ядерные анализы протекания транскрипции генов, RT-PCR, анализы защиты от РНКаз, нозерн-блоттинг, гибридизацию *in situ* и микроматричный анализ.

Циркулирующую мРНК 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 помощью зонда на основе нуклеиновой кислоты.

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

Альтернативный способ определения уровня экспрессии гена, представляющего интерес, в образце включает процесс амплификации и/или обратной транскрипции нуклеиновой кислоты (с получением кДНК), например, мРНК в образце, например, посредством RT-PCR (экспериментальный вариант осуществления изложен 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), репликазы Q-бета (Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197), репликации по типу "катящегося кольца" (Lizardi et al., патент США № 5854033) или любого другого способа амплификации нуклеиновой кислоты с последующим выявлением амплифицированных молекул с помощью методик, широко известных из уровня техники. Эти схемы выявления применимы при выявлении молекул нуклеиновой кислоты, если такие молекулы присутствуют в очень низких количествах. В некоторых аспектах настоящего изобретения уровень экспрессии гена, представляющего интерес (например, CFB), определяют посредством количественной флуорогенной RT-PCR (т. е. системы TAQMAN™) или люциферазного анализа DUAL-GLO®.

Уровни экспрессии мРНК гена, представляющего интерес, можно отслеживать с помощью мембранного блота (такого как используемый в анализе гибридизации, таком как нозерн-, Саузерн-, дот-блоттинг 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 использование зондов на основе нуклеиновой кислоты в растворе.

С помощью анализов, описанных выше, можно проводить определение эффективности лечения с помощью олигонуклеотидов, описанных в данном документе, исходя из снижения количества мРНК *CFB*. Снижение уровней мРНК *CFB* 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 мРНК *CFB* или уровнем CFB у субъекта до лечения. Соответствующий контрольный уровень может представлять собой уровень экспрессии мРНК *CFB* 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 мРНК *CFB* 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 *CFB* может привести к подавлению экспрессии белка *CFB*, которое может проявляться в снижении уровня белка *CFB*, который экспрессируется клеткой или группой клеток (например, уровня белка, экспрессируемого в образце, полученном от субъекта). Как поясняется выше, для оценки супрессии мРНК подавление уровней экспрессии белка в обработанной клетке или группе клеток можно аналогичным образом выражать в виде процентного значения уровня белка в контрольной клетке или группе клеток.

Последствия подавления экспрессии белка *CFB* можно подтвердить посредством соответствующего анализа для оценки одного или нескольких свойств клетки или субъекта или посредством биохимических методик, которые позволяют оценивать молекулы, указывающие на экспрессию белка *CFB*. Степень, в которой олигонуклеотид, предусмотренный в данном документе, снижает уровни экспрессии белка *CFB*, оценивают путем сравнения уровней экспрессии с соответствующим контролем (например, уровнем экспрессии белка *CFB* в клетке или популяции клеток, в которые олигонуклеотид не был доставлен или в которые был доставлен отрицательный контроль). Соответствующий контрольный уровень экспрессии белка *CFB* может представлять собой предварительно определенные уровень или значение, так что контрольный уровень не нужно измерять каждый раз, такие как количество белка *CFB*, которое, как определено, находится в диапазоне нормальных значений, например, приблизительно 200 мкг/мл в сыворотке крови. Предварительно определенные уровень или значение могут иметь разнообразные формы, включая одиночное пороговое значение, такое как медианное или среднее значение.

Уровень белка *CFB*, продуцируемого в результате экспрессии гена *CFB*, можно определять с помощью 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, колориметрические анализы, спектрофотометрические анализы, проточную цитометрию, иммунодиффузию

(одиночную или двойную), иммуноэлектрофорез, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ (RIA), твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), иммунофлуоресцентные анализы, электрохемилюминесцентные анализы и т. п. Такие анализы также можно применять для выявления белков, указывающих на наличие или репликацию белков, продуцируемых геном, представляющим интерес.

Дополнительно указанные выше анализы можно применять для регистрации изменения в последовательности мРНК, представляющей интерес, которое приводит к восстановлению или изменению функции белка, благодаря чему обеспечивается терапевтический эффект и польза для субъекта, лечение нарушения у субъекта и/или ослабление симптомов нарушения у субъекта.

С помощью анализов, описанных выше, можно проводить определение эффективности лечения с помощью олигонуклеотидов, описанных в данном документе, исходя из снижения количества белка *CFB*. Снижение уровней белка *CFB* 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 *CFB* (например, приблизительно 200 мкг/мл). Соответствующий контрольный уровень может представлять собой уровень экспрессии *CFB* 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 *CFB* 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 *CFB* можно определять с целью оценки того, нуждается ли субъект в повторном лечении. Например, если уровень *CFB* увеличивается 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) относительно уровня до лечения), субъект может нуждаться в повторном лечении.

Кроме того, подавление гена *CFB* с применением способов, описанных в данном документе, может привести к снижению транскрипции мРНК *CFB* в клетке субъекта, у которого идентифицировано наличие заболевания, опосредованного активацией и нарушением регуляции пути активации системы комплемента. Способы, предусмотренные в данном документе, применимы в любом соответствующем типе клеток (например, клетке, которая экспрессирует *CFB*, такой как гепатоцит). В некоторых

вариантах осуществления клетка представляет собой первичную клетку, которая была получена от субъекта и которая могла пройти ограниченное число пассажей, так что клетка по существу сохраняет свои природные фенотипические свойства. В некоторых вариантах осуществления клетка, в которую доставляется олигонуклеотид, находится в условиях *ex vivo* или *in vitro* (т. е. он 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), раскрытых в данном документе, в целях снижения экспрессии СFB исключительно в гепатоцитах.

Эффективное количество олигонуклеотида(олигонуклеотидов), раскрытых в данном документе, может быть определено как количество олигонуклеотида(олигонуклеотидов), которое приводит к ослаблению симптомов заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, такого как одно из заболеваний или нарушений, описанных в данном документе. Ослабление симптомов заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации 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 помощью клинических оценок, известных специалисту в данной области. Величину ослабления симптомов заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, можно использовать для определения того, нуждается ли субъект в повторном лечении с помощью олигонуклеотида(олигонуклеотидов) для RNAi, фармацевтической(фармацевтических) композиции(композиций), вектора(векторов) или клетки(клеток), описанных в данном документе. Примеры анализов для определения ослабления заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, включают без ограничения функциональные анализы для измерения и/или количественного определения уровня циркулирующего белка СFB (например, анализ Wieslab и гемолитический анализ). Количественное определение отложения СFB можно осуществлять посредством ИНС или иммунофлуоресценции или с помощью специфических биомаркеров заболевания.

Кроме того, олигонуклеотид, описанный в данном документе, который содержит как смысловую нить, так и антисмысловую нить в качестве дуплексного олигонуклеотида, можно вводить в клетку субъекта с использованием любой подходящей доставки

нуклеиновой кислоты. Дуплексный олигонуклеотид может быть доставлен в клетку путем инъекции раствора, содержащего олигонуклеотид, бомбардировки частицами, покрытыми олигонуклеотидом, осуществления воздействия на клетку или организм раствора, содержащего олигонуклеотид, или электропорации клеточных мембран в присутствии олигонуклеотида. Дуплексные олигонуклеотиды также могут быть доставлены в клетки с использованием транспорта, опосредованного липидными носителями, транспорта, опосредованного химическими веществами, трансфекции с помощью катионных липосом, как, например, с фосфатом 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 активации системы комплемента, в том числе, например, одного или нескольких заболеваний, ассоциированных с активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, раскрытых в данном документе, у субъекта путем введения композиции, описанной 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 активации 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, то есть количества, способного обеспечивать требуемый терапевтический результат (например, нокдаун экспрессии *CFB*). Терапевтически приемлемое количество может представлять собой количество, которое способно обеспечивать лечение заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента (например, активацией или нарушением регуляции *CFB*). Подходящая доза для любого субъекта будет зависеть от определенных факторов, в том числе габаритов, площади поверхности тела, возраста субъекта, конкретной композиции, подлежащей введению, активного(активных) ингредиента(ингредиентов) в композиции, времени и пути введения, общего состояния здоровья и других лекарственных средств, вводимых

одновременно. Такие средства лечения можно применять, например, для замедления, прекращения развития или предупреждения любого типа заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации 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 активации системы комплемента, так чтобы происходило предупреждение заболевания или нарушения или, в качестве альтернативы, задержка его прогрессирования. Субъекты с риском развития заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, могут быть идентифицированы посредством, например, одного или комбинации из диагностических или прогностических анализов, известных из уровня техники.

Композиции, раскрытые в данном документе, можно вводить субъекту с помощью любого стандартного способа. Например, любую из композиций, раскрытых в данном документе, можно вводить энтерально (например, перорально, с помощью желудочного зонда для кормления, с помощью дуоденального зонда для кормления, посредством гастростомии или ректально), парентерально (например, путем подкожной инъекции, внутривенной инъекции или инфузии, внутриартериальной инъекции или инфузии, внутрикостной инфузии, внутримышечной инъекции, интрацеребральной инъекции, интрацеребровентрикулярной инъекции, интратекально), местным путем (например, наочно, 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, вводятся 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 активации системы комплемента, лечение которого осуществляется, способов получения фармацевтического состава, способов введения (например, времени введения и пути введения), возраста, массы тела, пола субъекта, тяжести заболеваний, лечение которых осуществляется, рациона субъекта и скорости выведения у субъекта.

Субъекту, страдающему заболеванием или нарушением, опосредованным активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, можно вводить олигонуклеотиды, описанные в данном документе, например, один раз в год (например, один раз каждые 12 месяцев), один раз в полгода (например, один раз каждые шесть

месяцев), один раз в квартал (например, один раз каждые 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 или несколько раз в одну, две или три недели, один или несколько раз в месяц, каждый второй месяц, один или несколько раз в три месяца, один или несколько раз в квартал, один или несколько раз в шесть месяцев или один или несколько раз в год. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды можно вводить один раз в день.

Субъект, подлежащий лечению заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, может являться человеком или приматом, отличным от человека, или другим субъектом-млекопитающим. Другие иллюстративные субъекты, которых можно лечить с помощью олигонуклеотидов, описанных в данном документе, включают одомашненных животных, таких как собаки и кошки; сельскохозяйственных животных, таких как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы и куры, и животных, таких как мыши, крысы, морские свинки и хомяки.

Дозы

Доза 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 масса получающего ее пациента, природа и степень выраженности симптомов, частота лечения и/или тип сопутствующего лечения, если таковое имеется, и показатель клиренса соединения у субъекта, подлежащего лечению. Специалист в данной области может определить подходящую дозу, исходя из 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 CFB в клетке субъекта, (b) снижения транскрипции CFB в клетке субъекта, (c) снижения уровня белка CFB в клетке субъекта, (d) снижения активности белка CFB в клетке субъекта и/или (e) ослабления одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает

введение эффективного количества олигонуклеотида, описанного в данном документе, который специфично связывается с мРНК *CFB* и подавляет экспрессию белка *CFB* у субъекта. Например, в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения заболевания или нарушения, опосредованного нарушением регуляции альтернативного пути активации системы комплемента, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества олигонуклеотида, фармацевтической композиции, вектора или клетки, раскрытых в данном документе.

Заболевание или нарушение, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, подлежащее лечению с использованием раскрытых способов и композиций, может представлять собой, например, кожные нарушения, неврологические нарушения, нефрологические нарушения, нарушения, требующие неотложной помощи, ревматические нарушения, легочные нарушения, дерматологические нарушения, гематологические нарушения и офтальмологические нарушения.

Лечение заболеваний, опосредованных активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, можно осуществлять путем введения олигонуклеотида или его фармацевтически приемлемой соли, которые подавляют экспрессию и/или трансляцию мРНК *CFB* (например, экспрессию белка *CFB*), таких как описанные в данном документе.

Раскрытые композиции можно вводить в количествах, которые определены специалистами в данной области как подходящие. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид или его фармацевтически приемлемую соль, описанные в данном документе, можно вводить изначально в подходящей дозе, которую можно при необходимости корректировать в зависимости от клинического ответа.

В некоторых случаях олигонуклеотид или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе 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) массы тела субъекта. В определенных случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01 мг/кг - 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) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01 мг/кг - 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) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01 мг/кг - 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) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01 мг/кг - 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) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,01 мг/кг - 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) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,1 мг/кг - 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) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,1 мг/кг - 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) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 0,1 мг/кг - 5 мг/кг (например, 0,1-1 мг/кг, 2-3 мг/кг, 3-4 мг/кг и 4-5 мг/кг) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 1 мг/кг - 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) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 1 мг/кг - 20 мг/кг (например, 1-5 мг/кг, 5-10 мг/кг, 10-15 мг/кг и 15-20 мг/кг) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 1 мг/кг - 10 мг/кг (например, 1-2 мг/кг, 2-5 мг/кг, 5-7 мг/кг и 7-10 мг/кг) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 1 мг/кг - 5 мг/кг (например, 1-2 мг/кг, 2-3 мг/кг, 3-4 мг/кг и 4-5 мг/кг) массы тела субъекта. В других случаях олигонуклеотид вводят в концентрации 30 мг/кг - 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 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе, составляющей 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) массы тела субъекта. В других вариантах осуществления олигонуклеотид вводят в дозе, составляющей приблизительно 10 мг/кг или меньше. В другом варианте осуществления олигонуклеотид вводят в дозе, составляющей 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, составляющей 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, составляющей 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, составляющей 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, составляющей 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, составляющей 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, составляющей 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, составляющей 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, составляющей 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 или его фармацевтически приемлемую соль вводят в дозе, составляющей 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 массы тела субъекта.

В других случаях доза композиции (например, композиции, содержащей олигонуклеотид, описанный в данном документе) представляет собой профилактически или терапевтически эффективное количество. В некоторых случаях вирусный вектор (например, вектор на основе гAAV), содержащий олигонуклеотид, описанный в данном документе, 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 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} или 10^{14} GC/кг (общей массы субъекта). В других случаях олигонуклеотид вводят в дозе от 0,1 мг/кг до приблизительно 150 мг/кг (например, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 20 мг/кг, 50 мг/кг, 75 мг/кг, 100 мг/кг, 150 мг/кг).

Раскрытые олигонуклеотиды необязательно можно вводить в качестве части 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 вызывания терапевтически благоприятного эффекта, как может быть легко определено специалистами в данной области.

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, ослабления одного или нескольких симптомов заболевания у субъекта). Раскрытые композиции можно вводить один раз или более одного раза. Раскрытые композиции

можно вводить один раз в день, два раза в день, три раза в день, 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 не произойдет облегчение заболевания или состояния, или лечение может быть длительным в зависимости от тяжести и природы заболевания или состояния, лечение которого осуществляется (например, в течение всей жизни субъекта). Например, субъекту, у которого диагностирована PNH и который получает лечение с помощью композиции, 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 циклы лечения не вызывают терапевтической пользы, в том числе ослабления любого из симптомов, ассоциированных с PNH, таких как утомляемость, слабость, затрудненное дыхание, легкое появление синяков или кровоподтеков, рецидивирующие инфекции, сильная головная боль, тромбы и затруднения при остановке кровотечения, или снижения уровней мРНК *CFB* или уровней белка *CFB* в клетках или сыворотке крови субъекта.

Наборы

В настоящем изобретении также описываются наборы, содержащие (а) фармацевтическую композицию, содержащую средство на основе олигонуклеотида (например, олигонуклеотида для RNAi) или его фармацевтически приемлемую соль, которые снижают уровень и/или активность *CFB* в клетке или у субъекта, как описано в данном документе, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель. Набор может содержать вектор, кодирующий олигонуклеотид(олигонуклеотиды) (например, олигонуклеотид(олигонуклеотиды) для RNAi), описанные в данном документе, или клетку, содержащую вектор, кодирующий олигонуклеотид(олигонуклеотиды) (например, олигонуклеотид(олигонуклеотиды) для RNAi), описанные в данном документе. Набор также может содержать листок-вкладыш с инструкциями по осуществлению 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 снижает уровень и/или активность CFB в клетке или у субъекта, как описано в данном документе, (b) дополнительное терапевтическое средство и (c) листок-вкладыш с инструкциями по осуществлению 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 примере и следующих примерах, синтезировали химически 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 фосфорамидитного 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.* 22:1859–1862, 1981; doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7).

Олигонуклеотиды для RNAi, имеющие 19-мерную коровую последовательность, преобразовывали в формат конструкций, имеющих 25-мерную смысловую нить и 27-мерную антисмысловую нить, для обеспечения возможности процессинга посредством аппарата RNAi. 19-мерная коровая последовательность была комплементарной по отношению к области в мРНК CFB.

Отдельные нити РНК синтезировали и очищали посредством HPLC в соответствии со стандартными способами (Integrated DNA Technologies; Коралвилл, Айова). Например, РНК-олигонуклеотиды синтезировали с применением твердофазной фосфорамидитной химии, подвергали удалению защитной группы и обессоливали на колонках NAP-5 (Amersham Pharmacia Biotech; Пискатауэй, Нью-Джерси) с помощью 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 15-минутного

ступенчато-линейного градиента. Градиент варьировался от буферов А:В 90:10 до буферов А:В 52:48, где буфер А представляет собой 100 мМ Трис с рН 8,5, а буфер В представляет собой 100 мМ Трис с рН 8,5, 1 М NaCl. Образцы отслеживали при 260 нм, и пики, соответствующие полноразмерным олигонуклеотидным соединениям, собирали, объединяли, обессоливали на колонках NAP-5 и лиофилизировали.

Чистоту каждого олигомера определяли посредством капиллярного электрофореза (СЕ) с помощью Beckman PACE 5000 (Beckman Coulter, Inc.; Фуллертон, Калифорния). Капилляры для СЕ имеют внутренний диаметр 100 мкм и содержат гель для ssDNA 100R (Beckman-Coulter). Как правило, приблизительно 0,6 нмоль олигонуклеотида вводили в капилляр, прогоняли в электрическом поле на 444 В/см и выявляли 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 СЕ. 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) согласно рекомендуемому производителем протоколу. Получали относительные молекулярные массы всех олигомеров, которые часто находились в пределах 0,2% от ожидаемой молекулярной массы.

Получение дуплексов

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

Пример 2. Синтез олигонуклеотидов для RNAi, нацеливающих на CFB

Идентификация последовательностей-мишеней мРНК CFB

Фактор В системы комплемента (CFB) представляет собой белок, участвующий в альтернативном пути активации системы комплемента. Для получения олигонуклеотидов для RNAi, подавляющих экспрессию CFB, применяли компьютерный алгоритм для вычислительной идентификации последовательностей-мишеней мРНК CFB, подходящих

для анализа подавления экспрессии *CFB* посредством пути RNAi. Свыше 300 последовательностей направляющей (антисмысловой) нити олигонуклеотидов для RNAi, каждая из которых содержит область комплементарности с подходящей последовательностью-мишенью *CFB* из мРНК *CFB* человека (см. таблицу 3), получали и анализировали *in vitro* в отношении подавления экспрессии *CFB*. Для дополнительного исследования из этих олигонуклеотидов для RNAi отбирали подгруппу из девяти (см. таблицу 4). Подгруппа из девяти направляющих последовательностей, идентифицированных алгоритмом, была также комплементарна соответствующей последовательности-мишени *CFB* из мРНК *CFB* обезьяны (SEQ ID NO: 51; таблица 3). Прогнозируется, что олигонуклеотиды для RNAi *CFB*, содержащие область комплементарности с гомологичными последовательностями-мишенями мРНК *CFB* со сходством нуклеотидных последовательностей, обладают способностью к нацеливанию на гомологичные мРНК *CFB*.

Таблица 3. Последовательности мРНК *CFB* человека и обезьяны

Видовая принадлежность	Идентификационный № последовательности	SEQ ID NO
Человек (Hs)	NM_001710	12
Яванский макак (Mf)	XM_005553440	51

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

Олигонуклеотиды для RNAi (представленные в формате олигонуклеотидов dsRNA), сконструированные для подавления экспрессии *CFB*, индивидуально оценивали *in vitro* с применением клеточного анализа. Способы, применяемые для получения олигонуклеотидов, описаны в примере 1. Способы, применяемые для конструирования и создания последовательностей-мишеней мРНК *CFB*, описаны в примере 2.

Клеточные анализы in vitro

Способность каждого из созданных олигонуклеотидов для RNAi снижать уровень мРНК *CFB* измеряли с применением клеточных анализов *in vitro*. Вкратце, клетки-гепатоциты человека (Huh7), экспрессирующие эндогенный ген *CFB* человека, трансфицировали каждым из олигонуклеотидов для RNAi при 1 нМ в отдельных лунках многолуночного планшета для культуры клеток (соединения A-I). Клетки выдерживали в течение 24 часов после трансфекции модифицированными олигонуклеотидами для RNAi, а затем определяли количество оставшейся мРНК *CFB* из трансфицированных клеток с применением qPCR-анализов на основе TAQMAN®. Два qPCR-анализа, 3'-анализ и 5'-

анализ, применяли для определения уровней мРНК *CFB*, измеренных с помощью ПЦР-зондов, конъюгированных с 6-карбоксихлорофлуоресцеином (FAM), и нормализованных относительно гена "домашнего хозяйства" *HPRT*. Каждую пару праймеров оценивали в отношении % оставшейся мРНК *CFB*, как показано на фигуре 3А. Олигонуклеотиды для RNAi, которые приводили к количеству мРНК *CFB*, оставшейся в клетках, трансфицированных олигонуклеотидами для RNAi, которое меньше или равняется 8% по сравнению с клетками, подвергнутыми имитации трансфекции, считались "хитами" олигонуклеотидов для RNAi.

Исследование дозозависимого эффекта проводили путем трансфекции клеток печени человека Huh-7, экспрессирующих эндогенный *CFB*, олигонуклеотидами для RNAi в трех разных концентрациях (0,03 нМ, 0,1 нМ и 1 нМ; см. фигуру 3В), как указано, в отдельных лунках многолуночного планшета для культуры клеток. Клетки выдерживали в течение 24 часов после трансфекции, а затем определяли уровни оставшейся мРНК *CFB* из трансфицированных клеток с применением qPCR-анализов на основе TAQMAN®. Два qPCR-анализа, 3'-анализ и 5'-анализ, применяли для определения уровней мРНК, измеренных с помощью зондов HEX и FAM соответственно. Девять олигонуклеотидов для RNAi (соединения А-И) дополнительно тестировали в скрининговых анализах *in vivo*.

В совокупности эти результаты показывают, что олигонуклеотиды для RNAi, сконструированные для нацеливания на мРНК *CFB* человека, подавляют экспрессию *CFB* в клетках, что определяется по снижению количества мРНК *CFB* в клетках, трансфицированных олигонуклеотидами для RNAi, по сравнению с контрольными клетками. Эти результаты демонстрируют, что нуклеотидные последовательности, составляющие олигонуклеотиды для RNAi, применимы для создания олигонуклеотидов для RNAi для подавления экспрессии *CFB*. Кроме того, эти результаты демонстрируют, что для RNAi-опосредованного подавления экспрессии *CFB* подходят несколько последовательностей-мишеней мРНК *CFB* (таблица 4).

Таблица 4. Анализ мРНК *CFB* в клетках Huh7

Соединение	SEQ ID NO (смысловая нить)	SEQ ID NO: смысловой нити с модификациями	SEQ ID NO (антисмысловая нить)	SEQ ID NO: антисмысловой нити с модификациями	5'-анализ <i>CFB</i>		3'-анализ <i>CFB</i>	
					% оставшейся	SEM	% оставшейся	SEM
А	1	66	3	67	24,8	3,5	23,0	3,9

B	4	37	6	38	1,1	0,3	6,2	1,0
C	17	52	18	53	2,3	0,2	6,9	0,8
D	19	54	20	55	2,7	0,4	7,9	1,7
E	21	56	22	57	4,4	1,3	3,2	1,3
F	23	58	24	59	1,3	0,5	7,3	0,7
G	25	60	26	61	0,3	0,2	5,9	2,2
H	27	62	28	63	6,5	0,3	5,6	0,8
I	29	64	30	65	6,2	0,8	6,4	1,1

Пример 4. Скрининг олигонуклеотидов для RNAi у мышей, у которых экспрессируется кДНК CFB человека (мышей с HDI)

Скрининговый анализ *in vitro* в примере 3 подтвердил способность олигонуклеотидов, нацеливающихся на *CFB*, к нокдауну мРНК-мишени. Для подтверждения способности олигонуклеотидов для RNAi к нокдауну *CFB in vivo* использовали мышиную модель с HDI.

Олигонуклеотиды, приведенные в таблице 4, оценивали у мышей, сконструированных для транзientной экспрессии мРНК *CFB* человека в гепатоцитах печени мышей. Вкратце, 6-8-недельным самкам мышей CD-1 (n = 4-5) подкожно вводили указанные олигонуклеотиды для RNAi в дозе 0,25 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг, составленные в PBS. Контрольной группе мышей (n = 5) вводили только PBS. Через три дня (72 часа) мышам вводили путем гидродинамической инъекции (HDI) ДНК-плазмиду, кодирующую полный ген *CFB* человека (SEQ ID NO: 12) (25 мкг) под контролем убиквитарной промоторной последовательности цитомегаловируса (CMV). Через день после введения ДНК-плазмиды собирали образцы печени у мышей с HDI. Общую РНК, полученную от этих мышей с HDI, подвергали анализу методом qRT-PCR для определения уровней мРНК *CFB*, как описано в примере 3. Уровни мРНК измеряли для мРНК человека. Значения нормализовали по эффективности трансфекции с использованием гена Neor, включенного в ДНК-плазмиду.

Результаты на фигурах 4A-4C демонстрируют, что олигонуклеотиды для RNAi, сконструированные для нацеливания на мРНК *CFB* человека, подавляли экспрессию мРНК *CFB* человека у мышей с HDI, что определяется по снижению величины экспрессии мРНК *CFB* человека в образцах печени мышей с HDI, обработанных с помощью олигонуклеотидов для RNAi, по сравнению с контрольными мышами с HDI, обработанными только с помощью PBS. Все протестированные олигонуклеотиды для RNAi были способны снижать экспрессию *CFB*. В целом, в исследовании с HDI

идентифицировали ряд потенциальных олигонуклеотидов для RNAi для подавления экспрессии CFB в печени.

Пример 5. Скрининг олигонуклеотидов для RNAi у яванских макаков

Все соединения от А до I, описанные в примере 4, предварительно отобранные в ходе скрининга у мышей, тестировали у яванских макаков (NHP) в отношении продолжительности сайленсинга мРНК CFB после однократного подкожного введения соединений А-I при 4 мг/кг. Биопсию печени у всех тестируемых животных ($n = 5/\text{соединение}$) проводили перед введением дозы и в день 28 и день 56 после инъекции. Как продемонстрировано на фигуре 5, наблюдалось по меньшей мере 50% снижение уровней мРНК CFB в печени для большинства тестируемых соединений по сравнению с нормализованными исходными уровнями и сопоставимыми по времени контролями с PBS, как определено с помощью RT-qPCR. Два лидерных соединения (соединения А и В) отбирали, исходя из уровня нокдауна мРНК CFB в печени яванских макаков после однократного введения для тестирования в многодозовом исследовании.

Соединения А и В отбирали после исследования однократной дозы для дополнительной оценки в исследовании многократных доз у 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 за 4 дозы. Биоптаты печени собирали до введения дозы и в дни 28, 56 и 112 после первоначальной обработки для оценки уровней мРНК CFB в печени посредством RT-qPCR (фигура 6А). Образцы сыворотки крови собирали до введения дозы, в дни 14, 28, 42, 56, 70, 84, 98 и 112 после введения начальной дозы для оценки уровней белка CFB с помощью иммуноблоттинга (фигура 6В), активности системы комплемента с помощью анализа WIESLAB® AP (фигура 8) и гемолиза эритроцитов кролика (фигура 9; только соединение В тестировали в анализе гемолиза). Животных, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контроля в анализах мРНК CFB в печени, белка CFB в сыворотке крови и функциональных анализах. Многократная обработка яванских макаков с помощью соединения А или В приводила к длительной продолжительности сайленсинга мРНК CFB в печени, значительному снижению уровня циркулирующего CFB в сыворотке крови, > 95% снижению активности альтернативного пути активации системы комплемента и полному подавлению лизиса эритроцитов кролика в гемолитическом анализе после нескольких введений соединений А и В, как изображено на фигурах 6А, 6В, 8 и 9 соответственно.

Активность соединений А и В рассчитывали путем объединения результатов в день 28 как для одно-, так и для многодозовых исследований у NHP. Примерную ED₅₀ для

соединения А (0,65 мг/кг) и соединения В (0,65 мг/кг) рассчитывали из кривой дозозависимого эффекта, построенной для обоих соединений (фигура 7).

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

Мышей CD-1 обрабатывали с помощью соединения J для оценки процента нокдауна мРНК *CFB* в печени мышей и количества белка *CFB* в сыворотке крови мышей в результате введения соединения J. Соединение J представляет собой олигонуклеотид для RNAi, нацеливающийся на экспрессию *CFB* мыши, который выступает в качестве суррогата для олигонуклеотидов для RNAi, нацеливающих на экспрессию *CFB* человека, таких как соединение А и соединение В. Процент нокдауна мРНК *CFB* в печени в результате введения соединения J измеряли с применением RT-qPCR. Количество *CFB* в сыворотке крови качественно измеряли посредством иммуноблоттинга. Мыши получали однократную подкожную дозу соединения J при 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг или 3 мг/кг.

Однократное введение соединения J продемонстрировало дозозависимое процентное значение нокдауна мРНК *CFB* в печени с более чем 90% снижением уровня мРНК *CFB* в печени у животных, получивших дозу 3 мг/кг (n = 5 мышей/момент времени). Наиболее низкий уровень нокдауна мРНК наблюдали через 3-21 день после введения дозы 3 мг/кг, как показано на фигуре 10А. Процентное содержание белка *CFB* в сыворотке крови мышей CD-1 измерялось на протяжении всего исследования и подвергалось соответствующей супрессии (фигура 10В).

Количество соединения J в плазме крови, тканях селезенки, печени и почки мышей CD-1, которым вводили однократную подкожную дозу 3 мг/кг соединения J, измеряли посредством qPCR структур стебель-петля в течение периода 672 часов после получения дозы (фигура 11). Фармакокинетический анализ указывал на то, что наибольшее воздействие соединения J наблюдалось в печени, за которой следовали селезенка, почка и плазма крови (фигура 11).

Процентное содержание мРНК *CFB* в печени также измеряли с применением RT-qPCR, а количество белка *CFB* в сыворотке крови качественно оценивали посредством иммуноблоттинга в течение 70-дневного периода, когда мыши CD-1 получали четыре дозы по 0,5 мг/кг или 3 мг/кг соединения J в дни 0, 14, 28 и 42, как показано на фигурах 12А и 12В соответственно. Процедуры биопсии печени и сбора образцов сыворотки крови проводили в дни 3, 14, 17, 28, 31, 42, 45, 56 и 70 после введения начальной дозы для животных, которым вводили высокую дозу (3 мг/кг) соединения J, и в те же моменты времени (за исключением сбора в день 63, а не в день 70) для животных, которым вводили низкую дозу (0,5 мг/кг) соединения J. Концентрацию соединения J в печени и плазме

крови после введения 4 доз по 0,5 мг/кг анализировали в биоптатах печени и образцах плазмы крови посредством qPCR структур стебель-петля (SL-qPCR), как показано на фигурах 13А и 13В соответственно. Мышей CD-1, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контроля как для уровней мРНК CFB в печени, так и для уровней белка CFB в сыворотке крови.

Данное многодозовое исследование продемонстрировало, что соединение J (мышинный суррогат) продемонстрировало дозозависимый нокдаун мРНК CFB в печени, который сохранялся на протяжении периода 70 дней. Снижение уровней циркулирующего белка CFB соответствовало снижению уровня мРНК CFB, 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 (0,5 мг/кг) (см. фигуры 13А и 13В соответственно).

Далее проводили исследование всасывания, распределения, метаболизма и выведения (ADME) однократной дозы у самцов мышей CD-1, и определяли характеристики фармакокинетических показателей соединения В после введения однократной подкожной дозы 3, 10 или 100 мг/кг или внутривенной дозы 3 мг/кг. После однократного подкожного введения концентрация соединения В в плазме крови достигала T_{max} через 1 час во всех трех группах, получавших подкожную дозу, после чего следовала фаза быстрого распределения преимущественно в печени. Биодоступность составляла примерно 22%, исходя из сравнения площади под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени от нуля до последней измеримой концентрации (AUC_{last}) после введения подкожной дозы по сравнению с внутривенной дозой 3 мг/кг. Воздействие в плазме крови по сравнению с группой, получавшей дозу 3 мг/кг, увеличивалось примерно пропорционально дозе для группы, получавшей 10 мг/кг, и более чем пропорционально дозе для группы, получавшей 100 мг/кг. Воздействие на печень и почки, исходя из на максимальной концентрации, наблюдаемой после введения (C_{max}) и AUC_{last} , увеличивалось примерно пропорционально дозе при 10 мг/кг и менее чем пропорционально дозе при 100 мг/кг по сравнению с группой, получавшей дозу 3 мг/кг. Период полувыведения из печени находился в диапазоне от 3,94 до 4,98 дня.

Пример 7. Эффект соединения J в отношении экспрессии CFB в мышинной модели индуцированного артрита CAIA

Эффект соединения J в отношении лечения симптомов, связанных с артритом, изучали с помощью мышинной модели артрита, индуцированного антителом к коллагену (CAIA), которая является простой моделью ревматоидного артрита. Мышиную модель индуцированного артрита CAIA создавали путем введения мыши антитела 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 дозу 1,5 или 3 мг/кг соединения J в день -7 в случае превентивного исследования (фигура 14А) и после начала проявления заболевания в день 5 в случае терапевтического исследования (фигура 14В). Воспаление задней лапы анализировали визуально в день 10, и результаты как превентивного, так и терапевтического исследований показаны на фигурах 15А и 15В соответственно. Профилактическая обработка с помощью соединения J предупреждала опухание задних лап, что является характерной отличительной особенностью данной модели (фигура 15А). Терапевтическая обработка с помощью соединения J обеспечивала полное устранение клинических проявлений заболевания после однократной дозы по сравнению с контрольными животными, обработанными с помощью PBS (фигура 15В).

Окрашивание гематоксилином и эозином (H&E) проводилось на биоптатах задних лап и коленных суставов и демонстрировало снижение местной инфильтрации мононуклеарными клетками у мышей, которых обрабатывали превентивно 3 дозами по 3 мг/кг соединения J (фигуры 16 и 18). Кроме того, проводили окрашивание биоптатов на маркеры лимфоцитов (CD45-положительных клеток), лейкоцитов (CD11b-положительных клеток) и макрофагов (F4/80-положительных клеток), как показано на фигурах 19, 20 и 21 соответственно, с целью демонстрации снижения местного воспаления в результате терапевтической обработки с помощью однократной дозы 3 мг/кг соединения J. Биоптаты также окрашивали сафранином O для визуализации хрящевой ткани в коленных суставах в мышинной модели индуцированного артрита CAIA. Животные, обработанные с помощью 3 мг/кг соединения J, демонстрировали заметное снижение эрозии хрящевой ткани по сравнению с мышами, обработанными с помощью PBS, при превентивной обработке (фигура 17 и фигура 18). Эксперименты с применением гибридизации *in situ* для мРНК CFB и CD45 проводили на биоптатах с целью оценки экспрессии системы комплемента в местных участках воспаления в мышинной модели индуцированного артрита CAIA с обработкой и без обработки с помощью 3 мг/кг соединения J, что показано на фигуре 22. Нокдаун CFB в печени с помощью соединения J приводил к снижению инфильтрации

лимфоцитами (CD45-положительными клетками) и местной экспрессии мРНК CFB при терапевтической обработке с помощью соединения J по сравнению с животными, обработанными с помощью PBS, в качестве контрольной группы.

Пример 8. Эффект соединения J в отношении экспрессии CFB в мышинной модели рассеянного склероза

Мышиная модель экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (EAE), индуцированного миелин-олигодендроцитарным гликопротеином (MOG), может быть использована для изучения иммуноопосредованного механизма нейровоспаления и демиелинизации. Мышей с MOG-индуцированным EAE обрабатывали превентивно дозой 3 мг/кг соединения J ($n = 2$ эксперимента). Уровни мРНК CFB в печени после обработки с помощью соединения J, а также уровень белка CFB в сыворотке крови оценивали с применением RT-qPCR и иммуноблоттинга соответственно, как показано на фигурах 25А и 25В. Аналогичным образом оценивали процентное содержание мРНК CFB, оставшейся после обработки с помощью соединения J, а также количество CFB в сыворотке крови мышей с MOG-индуцированным EAE после обработки дозой 3 мг/кг соединения J по сравнению с животными, обработанными с помощью PBS. Нокдаун CFB в печени с помощью соединения J приводил к снижению тяжести заболевания (фигура 23).

Также от мышей с MOG-индуцированным EAE, обработанных с помощью соединения J, получали образцы поясничного отдела спинного мозга. Проводили окрашивание образцов поясничного отдела спинного мозга люксолем быстрым синим наряду с окрашиванием с помощью H&E с целью визуализации миелинизации, а также инфильтрации мононуклеарными клетками, как показано на фигуре 24. Сравнивали окрашенные люксолем быстрым синим образцы спинного мозга больных животных, обработанных с помощью 3 мг/кг соединения J, PBS, как показано на фигуре 24. Животные с MOG-индуцированным EAE, обработанные с помощью соединения J, демонстрировали незначительное снижение демиелинизации и предупреждение инфильтрации иммунными клетками.

Пример 9. Лечение рассеянного склероза с помощью соединения В у людей

Субъекта, страдающего рассеянным склерозом, можно лечить с помощью фармацевтической композиции, содержащей соединение В (например, при величине дозы приблизительно 3 мг/кг). Композицию можно вводить субъекту с частотой один раз в неделю, например, путем внутримышечной инъекции, в течение периода приблизительно 12 месяцев или дольше (например, до устранения или стабилизации симптомов).

Примерно один раз в месяц лечащий врач может оценивать симптомы и уровни CFB в сыворотке крови у субъекта для оценки эффективности соединения В. Уровень CFB в

сыворотке крови у субъекта можно определять количественно с использованием образца сыворотки крови, и его можно сравнивать с количеством белка СФВ, обнаруживаемым в сыворотке крови субъекта до введения соединения В, или сравнивать с контрольным количеством белка СФВ или с количеством белка СФВ, присутствующим в образце сыворотки крови нормального субъекта (например, субъекта без заболевания). Лечение с помощью соединения В может быть определено как эффективное в случае, если количество белка СФВ в сыворотке крови уменьшается на по меньшей мере 10% по сравнению с количеством белка СФВ в сыворотке крови до лечения с помощью соединения В. Кроме того, лечащий врач может оценивать симптомы субъекта, ассоциированные с рассеянным склерозом, такие как нечеткое зрение, невнятная речь, головокружение, покалывание, отсутствие координации и неустойчивая походка, для оценивания того, имеется ли уменьшение проявлений какого-либо или всех симптомов, которые испытывает субъект, по сравнению с симптомами, которые субъект испытывал до введения соединения В.

Пример 10. Лечение артрита с помощью соединения В у людей

Субъекта с диагностированным артритом можно лечить с помощью фармацевтической композиции, содержащей соединение В (например, в дозе приблизительно 1,5 мг/кг). Композицию можно вводить субъекту с частотой приблизительно один раз в месяц, например, путем внутримышечной инъекции, в течение периода приблизительно 6 месяцев или дольше (например, до устранения или стабилизации симптомов). Лечащий врач может оценивать субъекта (например, путем оценки симптомов и/или уровней СФВ в сыворотке крови у субъекта) для оценки эффективности соединения В, например, каждые один или два месяца. Уровень СФВ в сыворотке крови у субъекта можно определять количественно с использованием образца сыворотки крови, и его можно сравнивать с количеством белка СФВ, обнаруживаемым в сыворотке крови субъекта до введения соединения В, или сравнивать с контрольным количеством белка СФВ или с количеством белка СФВ, присутствующим в образце сыворотки крови нормального субъекта (например, субъекта без заболевания). Лечение с помощью соединения В может быть определено как эффективное в случае, если количество белка СФВ в сыворотке крови уменьшается на по меньшей мере 10% по сравнению с количеством белка СФВ в сыворотке крови до лечения с помощью соединения В. Кроме того, лечащий врач может оценивать симптомы субъекта, ассоциированные с артритом, включая боль, скованность, опухание, покраснение и ограниченная амплитуда движений, для оценивания того, имеется ли уменьшение проявлений какого-либо или всех симптомов, которые испытывает субъект, по сравнению с симптомами, которые субъект испытывал до

введения соединения В.

Пример 11. Оценка токсикологических показателей у яванских макаков и мышей

Безопасность и переносимость подкожно вводимого соединения В оценивали у яванских макаков и мышей.

В фармакологическом исследовании безопасности осуществляли подкожное введение 0,9% хлорида натрия с последующим введением возрастающих доз соединения В (30, 100 и 300 мг/кг), даваемых один раз в 7 дней тем же яванским макакам. Сердечно-сосудистые и неврологические эффекты не наблюдали ни на одном уровне дозы. При 300 мг/кг при оценках респираторных показателей отмечали минимальное снижение минутного объема и минимальное снижение дыхательного объема. Эти данные респираторных показателей не считались нежелательными по причине их минимальной тяжести, и все животные оставались в хорошем здоровье на протяжении всего исследования. Таким образом, уровень отсутствия нежелательных эффектов (NOAEL) в данном исследовании был определен как составляющий 300 мг/кг.

Процедуры генетико-токсикологических оценок, которые включали анализы микроядер *in vitro* и анализы обратных мутаций у бактерий *in vitro*, имели отрицательный результат в отношении индуцирования микроядер и в отношении мутагенной активности соответственно.

В исследовании на 6-месячных мышях оценивали потенциальную токсичность повторного подкожного введения дозы (0, 30, 100, 300 мг/кг каждые 4 недели в общей сложности за 7 доз) соединения В и обратимость, сохранение или отсроченное возникновение любых эффектов после 8-недельного периода восстановления. Диапазоны уровней дозы в данном исследовании выбирали так, чтобы достичь воздействия, по меньшей мере в 10 раз превышающего ожидаемое воздействие наиболее высокой предусмотренной клинической дозы. Также определяли токсикокинетические характеристики соединения В. Клинико-патологические результаты, не являющиеся нежелательными, включали увеличение количества нейтрофилов (2,08х и 1,39х соответственно), моноцитов (2,90х и 2,38х соответственно) и лимфоцитов (1,92х и 1,35х соответственно), что приводило к увеличению общего количества лейкоцитов (1,94х и 1,38х соответственно) у самцов и самок в группе 300 мг/кг/день в день 171 и уменьшению концентрации холестерина (62,9х) у самцов в группе 300 мг/кг/день в день 171. В конце периода восстановления наблюдалась полная обратимость всех клинико-патологических результатов. Микроскопические результаты, не являющиеся нежелательными, включали гепатоцеллюлярную кариоцитомегалию с коррелирующим увеличением массы печени/желчного пузыря, смешанноклеточное воспаление печени,

внутрицитоплазматические базофильные гранулы в почке и подкожные инфильтраты из гистиоцитов, смешанноклеточное воспаление дермы и дегенерацию, некроз и/или регенерацию *muscularis carnosus* в участке инъекции на момент эвтанази при завершении исследования, при этом гепатоцеллюлярная кариоцитомегалия, смешанноклеточное воспаление печени, подкожные инфильтраты из гистиоцитов и дегенерация, некроз и/или регенерация *muscularis carnosus* в участке инъекции все еще присутствовали на момент эвтанази после периода восстановления.

Результаты в печени у этих животных включали микровезикулярное жировое перерождение, некроз отдельных клеток и кариоцитомегалию. Так как печень считали целевой тканью на момент эвтанази при завершении исследования, изменения в печени, наблюдавшиеся у этих умерших мышей, считались потенциально связанными с соединением В. В дополнение к двум случаям смерти в основном исследовании в группе токсикокинетического исследования наблюдалась ранняя смертность 2 животных, связь которой с соединением В не известна. Эти животные были либо найдены мертвыми (самка в группе 300 мг/кг в день 14), либо подверглись эвтаназии ввиду состояния агонии (самец в группе 30 мг/кг в день 99). Потенциально релевантным макроскопическим результатом у этих животных была бледная обесцвеченная печень у самца в группе 30 мг/кг. Исходя из смертности, наблюдавшейся у самок в группах 100 и 300 мг/кг в основном исследовании, NOAEL считали составляющим 30 мг/кг для самок и 300 мг/кг для самцов. Эти дозы соответствовали средним значениям AUC_{last} в плазме крови, составляющим 17400 и 609000 ч.*нг/мл, и средним значениям C_{max}, составляющим 6490 и 140000 нг/мл, для самок в группе 30 мг/кг/день и самцов в группе 300 мг/кг соответственно в день 169.

В исследовании на 9-месячных обезьянах оценивали потенциальную токсичность повторного подкожного введения дозы (0, 30, 100, 300 мг/кг каждые 4 недели в общей сложности за 10 доз соединения В) и обратимость, сохранение или отсроченное возникновение любых эффектов после 8-недельного периода восстановления. Диапазоны уровней дозы в данном исследовании выбирали так, чтобы достичь воздействия, по меньшей мере в 10 раз превышающего ожидаемое воздействие наиболее высокой предусмотренной клинической дозы. Оценивали токсикокинетические характеристики и фармакодинамические эффекты соединения В. В конце фазы введения дозы в данном исследовании при ≥ 30 мг/кг наблюдались не являющиеся нежелательными микроскопические результаты от минимальных до умеренных в виде эозинофильных гепатоцеллюлярных глобул в печени и вакуолизованных/гранулярных макрофагов, отмеченных в нескольких тканях (пищеварительная система, мочеполовая система,

лимфоидная система, головной мозг (хориоидное сплетение), глаз (хориоидное или цилиарное тело), сердце, надпочечники, щитовидная железа, кожа, скелетные мышцы, бедренно-большеберцовый сустав и/или в участках подкожного введения). Эти результаты сохранялись в конце фазы восстановления с меньшей частотой встречаемости и/или тяжестью, что свидетельствует о продолжающемся, но неполном восстановлении. Воздействие на всех уровнях дозы вызывало ожидаемые и взаимосвязанные фармакодинамические эффекты, как показывает уменьшение концентраций белка CFB в сыворотке крови на > 95%, а также уменьшение функциональной активности системы комплемента в альтернативном пути активации системы комплемента на > 95% ко дню 28 и уменьшение экспрессии мРНК CFB в печени на > 89% после эвтаназии. Исходя из отсутствия каких-либо нежелательных результатов после периода введения дозы, NOAEL был определен как составляющий 300 мг/кг с соответствующей AUC_{last} 1360000 ч.*нг/мл и C_{max} 66200 нг/мл (самцы и самки в совокупности, день 253).

Пример 12. Анализы оценки CFB

Для определения характеристик эффекта соединения В в отношении уровней CFB можно применять различные анализы, описанные в данном документе, включая оценку уровня соединения В в плазме крови или в ткани, анализы функциональной активности системы комплемента WIESLAB[®], оценку уровня циркулирующего CFB, уровней экспрессии мРНК CFB и фармакокинетические анализы.

Соединение В в плазме крови

Концентрации соединения В в плазме крови мыши и обезьяны измеряли посредством аналитического способа высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентной детекцией (HPLC-FD). Аналит (соединение В) в 30 мкл образца плазмы крови подвергали ферментативной обработке с помощью протеиназы К, гибридизировали с флуоресцентным зондом (пептидной нуклеиновой кислотой; 22-мерным зондом на основе пептидной нуклеиновой кислоты PNA) с комплементарностью последовательности по отношению к антисмысловой нити соединения В, и вводили в систему высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), оснащенную флуоресцентным детектором. Хроматографическое разделение проводили с использованием градиентной системы в системах Shimadzu Prominence с использованием аналитических колонок DNAPAC[™] PA200. Подвижные фазы представляли собой 30% ацетонитрил (25 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, 2 мМ мочевины) в качестве подвижной фазы А и 1 М NaClO₄ в подвижной фазе В. С помощью FL-детектора отслеживали сигналы от 436 нм (Ex) до 484 нм (Em). Концентрации соединения В рассчитывали с помощью LabSolutions 6.70 с линейной регрессией по методу наименьших квадратов (со

взвешиванием 1/с2) в диапазоне количественного определения от 2,00 нг/мл до 2000 нг/мл, при этом нижний и верхний пределы этих диапазонов определяли нижний предел количественного определения (LLOQ) и верхний предел количественного определения (ULOQ) соответственно. Этот анализ применяли, например, в примерах 5 и 6, как описано выше.

Соединение В в ткани

Концентрации соединения В в печени и почке как обезьяны, так и мыши измеряли посредством аналитического способа HPLC-FD. Используя образец ткани массой 2,5 мг в аликвоте объемом 50 мкл (гомогенат ткани), соединение В в образцах ткани подвергали ферментативной обработке с помощью протеиназы К с последующей гибридизацией с 22-мерным зондом на основе PNA, который характеризовался комплементарностью последовательности по отношению к антисмысловой нити соединения В. Обработанные образцы вводили в систему HPLC, оснащенную флуоресцентным детектором.

Хроматографическое разделение проводили с использованием градиентной системы в системе Shimadzu Prominence с использованием аналитических колонок DNAPAC™ RA200. Подвижные фазы представляли собой 30% ацетонитрил (25 mM Трис-HCl, 1 mM EDTA, 2 M мочевины) в качестве подвижной фазы А и 1 M NaClO₄ в подвижной фазе А в качестве подвижной фазы В. Концентрации соединения В рассчитывали с помощью LabSolutions 6.89 с линейной регрессией по методу наименьших квадратов (со взвешиванием 1/с2) в диапазоне количественного определения от 30,0 нг/г до 20000 нг/г, при этом нижний и верхний пределы этих диапазонов определяли LOQ и ULOQ соответственно. Этот анализ применяли, например, в примерах 5 и 6, как описано выше.

Анализ функциональной активности системы комплемента (CCP, CAP, CLP) WIESLAB®

Формы активности классического пути активации системы комплемента (CCP), CAP и лектинового пути активации системы комплемента оценивали посредством скринингового анализа системы комплемента WIESLAB® с применением меченых антител, специфичных к неоантигену, с целью выявления терминального комплекса комплемента человека (C5b-9), образовавшегося в результате активации системы комплемента. Данный анализ также способен обеспечивать выявление C5b-9 яванского макака. Количество образовавшегося неоантигена было 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, обеспечивающий активацию только соответствующего пути. Лунки промывали, и выявляли C5b-9 с помощью специфического

меченного щелочной фосфатазой антитела к экспрессируемому неоантигену. Величина активации системы комплемента коррелировала с интенсивностью окрашивания, измеренной по поглощению при 405 нм. Значение для положительного контроля, предоставленного в наборе для тестирования, определяли как 100% активацию системы комплемента. Все измеренные значения выражали в виде процента (%) активности системы комплемента, определяемого 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 5.

Уровень белка

Величину уровней циркулирующего белка фактора В у яванских макаков оценивали посредством вестерн-блоттинга путем измерения относительных концентраций белка CFB в сыворотке крови, нормализованных относительно уровня трансферрина (TF) в образцах от обезьян. Разбавленные образцы сыворотки крови, смешанные в буфере для образцов, объединяли с флуоресцентным мастер-миксом. Образцы кипятили при 95°C в течение 5 минут, перемешивали вихревым способом и центрифугировали. Затем образцы помещали на лед и прогоняли в вестерн-блоттинге. Количественное определение проводили с использованием программного обеспечения ProteinSimple в соответствии с инструкциями производителя. Степень снижения уровня белка CFB в группах обработки рассчитывали как процент экспрессии относительно среднего уровня в контрольной группе, обработанной с помощью PBS, в тот же день исследования, при этом уровни CFB у обезьян в контрольной группе, обработанной с помощью PBS, принимали за 100%. Строили графики среднего значения \pm стандартное отклонение, и данные анализировали с применением GraphPad Prism (GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния). Для сравнения уровней белка CFB у обезьян в группах, обработанных с помощью соединения В, по сравнению с контрольной группой, обработанной с помощью PBS, в тот же день исследования проводили анализ с помощью непарного t-критерия.

Также осуществляли оценку уровней циркулирующего белка фактора В с помощью набора для твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) фактора В, предназначенного для количественного измерения концентраций фактора В системы комплемента у человека. 96-луночные планшеты предварительно покрывали антителами, специфичными к фактору В системы комплемента, и блокировали. В лунки добавляли стандарты или тестируемые образцы, а затем добавляли биотинилированное детекторное антитело, специфичное к фактору В системы комплемента, с последующей промывкой промывочным буфером. Добавляли конъюгат стрептавидин-пероксидаза, и несвязавшиеся

конъюгаты вымывали с помощью промывочного буфера. Затем для визуализации ферментативной реакции с участием конъюгата стрептавидин-пероксидаза использовали тетраметилбензидин (ТМВ). Реакция ТМВ катализировалась конъюгатом стрептавидин-пероксидаза с образованием продукта синего цвета, который изменялся на желтый после добавления кислотного стоп-раствора. Плотность желтого окрашивания была прямо пропорциональна количеству фактора В 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. Этот анализ применяли, например, в примере 5, как описано выше.

Уровни экспрессии мРНК CFB

Количество фактора В в печени яванского макака определяли путем измерения экспрессии мРНК фактора В относительно экспрессии мРНК пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы В (РРІВ) в РНК, выделенной из печени яванского макака, с использованием анализа методом дуплексной количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (qPCR) после обратной транскрипции. Сначала мРНК выделяли из замороженной ткани печени и определяли количественно. Затем мРНК транскрибировали в комплементарную ДНК (кДНК). Затем кДНК применяли в качестве матрицы для qPCR-реакции для измерения уровня мРНК фактора В с нормализацией относительно РРІВ. Степень присутствия мРНК фактора В в группах обработки рассчитывали как процент уровня экспрессии (нормализованного относительно уровней мРНК РРІВ) относительно группы без обработки или до введения дозы, при этом экспрессию мРНК фактора В в контрольной группе принимали за 100%. Этот анализ применяли, например, в примерах 5 и 11, как описано выше.

Фармакокинетические анализы

Концентрации соединения В в плазме крови человека измеряли посредством способа аналитической HPLC-FD. Аналит (соединение В) в 30 мкл образца плазмы крови подвергают ферментативной обработке с помощью протеиназы К, гибридизируют с флуоресцентным зондом (пептидной нуклеиновой кислотой; 22-мерным зондом на основе РНА), характеризующимся комплементарностью последовательности по отношению к антисмысловой нити соединения В, и вводят в систему HPLC, оснащенную флуоресцентным детектором. Хроматографическое разделение проводят с использованием градиентной системы в системах Shimadzu Prominence с использованием аналитических колонок DNAPAC™ PA200. Подвижные фазы представляют собой 30% ацетонитрил (25 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, 2 мМ мочевины) в качестве подвижной фазы

А и 1 М NaClO₄ в подвижной фазе А в качестве подвижной фазы В. С помощью FL-детектора отслеживали сигналы от 436 нм (Ex) до 484 нм (Em). Концентрации соединения В рассчитывают с помощью LabSolutions 6.70 с линейной регрессией по методу наименьших квадратов (со взвешиванием 1/с²) в диапазоне количественного определения от 2,00 нг/мл до 2000 нг/мл, при этом нижний и верхний пределы этих диапазонов определяют LLOQ и ULOQ соответственно.

Анализ антител к лекарственному средству

Анализ антител к лекарственному средству (ADA) для соединения В можно проводить с использованием сыворотки крови человека и электрохемилюминесцентного (ECL) мостикового анализа. Положительные контроли (PC) получали от кроликов, иммунизированных против иммуногенного коктейля, состоящего из соединения В, конъюгированного с гемоцианином фисуреллы (KLH), и олигонуклеотидов различной длины, конъюгированных с KLH, соответствующих модифицированным последовательностям соединения В. PC, отрицательные контроли (NC) и исследуемые образцы можно подвергать стадии кислотной диссоциации при окружающей комнатной температуре, затем добавлять их в планшет, содержащий Трис, биотинилированное соединение В и меченное рутением соединение В, что обеспечивает образование мостиковых комплексов между меченым соединением В и антителами к соединению В, присутствующими в образце. После инкубирования NC, PC и исследуемые образцы можно перенести в покрытый стрептавидином планшет и инкубировать в темноте в течение 1 часа, в ходе чего лекарственное средство связывается с планшетом, захватывая мостиковый комплекс ADA. Затем планшет промывают, и в него добавляют буфер для считывания MESO SCALE DISCOVERY® (MSD®) для генерирования ECL-сигнала, который прямо пропорционален количеству ADA, присутствующему в образце.

Пример 13. Эффект соединения J в крысиной модели мембранозной нефропатии

Эффект соединения J в отношении симптомов, связанных с мембранозной нефропатией, изучали с использованием крысиной модели пассивного нефрита Хеймана (PHN), которая является простой моделью мембранозной нефропатии. Крысиную модель PHN создавали путем введения крысе однократной дозы овечьего антитела к FX1а крысы в день 0.

Соединение J тестировали в превентивном исследовании. В этом исследовании животным вводили дозу 12 мг/кг соединения J в дни -14, -7 и 0 (фигура 26). Функцию почек оценивали как соотношение уровней белок:креатинин, измеренных в образцах мочи, ежедневно собираемых у животных, как показано на фигуре 26. Профилактическая обработка с помощью соединения J предупреждала развитие протеинурии по сравнению с контрольными животными с PHN, обработанными с помощью PBS, что является характерной отличительной особенностью данной модели (фигура 26).

Образцы сыворотки крови собирали в день -1 до индуцирования заболевания и через 6 дней после индуцирования заболевания для оценки активности системы комплемента путем гемолиза эритроцитов кролика (фигура 27). Здоровых животных и животных с PHN, обработанных с помощью PBS, использовали в качестве контроля для функциональных анализов СФВ. Крысы с PHN после получения 2 (сыворотка крови в день -1) или 3 доз (день 6) соединения J продемонстрировали снижение активности альтернативного пути активации системы комплемента на > 95%, измеренное по лизису эритроцитов кролика в гемолитическом анализе, по сравнению с уровнем лизиса, наблюдаемым у здоровых животных либо у контрольных животных с PHN, обработанных с помощью PBS (фигура 27). PBS вводили по той же многодозовой схеме, чтобы составить контрольную группу заболевания, а в качестве здоровых контролей использовали животных с имитацией обработки.

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 некоторые варианты осуществления, специалисту в данной области будет понятно, что охватываются дополнительные модификации и варианты осуществления, включая вариации, пути 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 в данном документе и описанным ниже в объеме формулы настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль для снижения экспрессии фактора В системы комплемента (*CFB*), при этом олигонуклеотид содержит смысловую нить и антисмысловую нить, где смысловая нить и антисмысловая нить образуют дуплексную область, где антисмысловая нить содержит область комплементарности по отношению к последовательности-мишени мРНК *CFB* под SEQ ID NO: 13 или 14, и где область комплементарности имеет длину по меньшей мере 15 смежных нуклеотидов.
2. Олигонуклеотид для RNAi по п. 1 или его фармацевтически приемлемая соль, где смысловая нить имеет длину 15-50 нуклеотидов.
3. Олигонуклеотид для RNAi по п. 1 или п. 2 или его фармацевтически приемлемая соль, где смысловая нить имеет длину 18-36 нуклеотидов.
4. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-3 или его фармацевтически приемлемая соль, где антисмысловая нить имеет длину 15-30 нуклеотидов.
5. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-4 или его фармацевтически приемлемая соль, где антисмысловая нить имеет длину 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 смысловая нить имеет длину 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 область комплементарности имеет длину по меньшей мере 19 смежных нуклеотидов, необязательно имеет длину 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 в виде 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 трипетлю или тетрапетлю.
10. Олигонуклеотид для RNAi по п. 9 или его фармацевтически приемлемая соль, где L представляет собой тетрапетлю.
11. Олигонуклеотид для RNAi по п. 10 или его фармацевтически приемлемая соль, где тетрапетля содержит последовательность нуклеиновой кислоты GAAA.

12. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 8-11 или его фармацевтически приемлемая соль, где S1 и S2 имеют длину 1-10 нуклеотидов, где необязательно S1 и S2 имеют одинаковую длину.

13. Олигонуклеотид для RNAi по п. 12 или его фармацевтически приемлемая соль, где S1 и S2 имеют длину 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 S1 и S2 имеют длину 6 нуклеотидов.

15. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 8-14 или его фармацевтически приемлемая соль, где область структуры 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 структуры стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся по меньшей мере 95% идентичностью с SEQ ID NO: 7.

17. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 8-16 или его фармацевтически приемлемая соль, где структура стебель-петля содержит последовательность нуклеиновой кислоты или состоит из последовательности нуклеиновой кислоты под 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, в которой имеется вплоть 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'-выступающего конца длиной один или несколько нуклеотидов.

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

21. Олигонуклеотид для RNAi по п. 20 или его фармацевтически приемлемая соль, где последовательность 3'-выступающего конца имеет длину 2 нуклеотида, где необязательно последовательность 3'-выступающего конца 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'-дезоксид-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, где необязательно 2'-фтор-модификация представляет собой 2'-фтордезоксирибонуклеозид и/или 2'-О-метил-модификация 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-метил-модификаций, 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, 12-27 и 31-36 смысловой нити и по меньшей мере один из нуклеотидов 1, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, как, например, в случае 2'-О-метилрибонуклеозида.

30. Олигонуклеотид для RNAi по п. 29 или его фармацевтически приемлемая соль, где от 10 до 29 из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и от 10 до 16 из нуклеотидов 1, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, как, например, в случае 2'-О-метилрибонуклеозида.

31. Олигонуклеотид для RNAi по п. 30 или его фармацевтически приемлемая соль, где все из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и все из нуклеотидов 1, 4, 6, 8, 9, 11-13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, как, например, в случае 2'-О-метилрибонуклеозида.

32. Олигонуклеотид для RNAi по п. 30 или его фармацевтически приемлемая соль, где все из нуклеотидов 1-7, 12-27 и 31-36 смысловой нити и все из нуклеотидов 1, 6, 8, 9, 11-

13 и 15-22 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-О-метила, как, например, в случае 2'-О-метилрибонуклеозида.

33. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 27-32 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид для RNAi содержит от 5 до 15 2'-фтор-модификаций, таких как 2'-фтордезоксирибонуклеозиды.

34. Олигонуклеотид для RNAi по п. 33 или его фармацевтически приемлемая соль, где по меньшей мере один из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и по меньшей мере один из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-фтора, как, например, в случае 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

35. Олигонуклеотид для RNAi по п. 34 или его фармацевтически приемлемая соль, где от 2 до 4 из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и от 2 до 7 из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-фтора, как, например, в случае 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

36. Олигонуклеотид для RNAi по п. 35 или его фармацевтически приемлемая соль, где все из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и все из нуклеотидов 2, 3, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-фтора, как, например, в случае 2'-фтордезоксирибонуклеозида.

37. Олигонуклеотид для RNAi по п. 35 или его фармацевтически приемлемая соль, где все из нуклеотидов 8, 9, 10 и 11 смысловой нити и все из нуклеотидов 2, 3, 4, 5, 7, 10 и 14 антисмысловой нити являются модифицированными с помощью 2'-фтора, как, например, в случае 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 фосфотиоатную связь.

40. Олигонуклеотид для RNAi по п. 39 или его фармацевтически приемлемая соль, где олигонуклеотид для RNAi содержит фосфотиоатную 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.

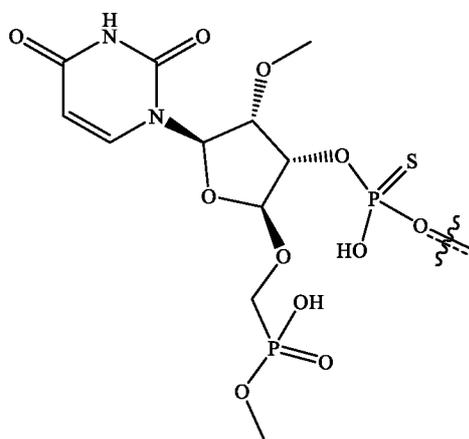
42. Олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-41 или его фармацевтически приемлемая соль, где 4'-атом углерода сахара 5'-нуклеотида антисмысловой нити содержит аналог фосфата.

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 аналог фосфата.

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

46. Олигонуклеотид для RNAi по п. 44 или его фармацевтически приемлемая соль, где уридин, содержащий аналог фосфата, имеет следующую структуру:



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, аминсахар, холестерин, полипептид или липид.

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

где:

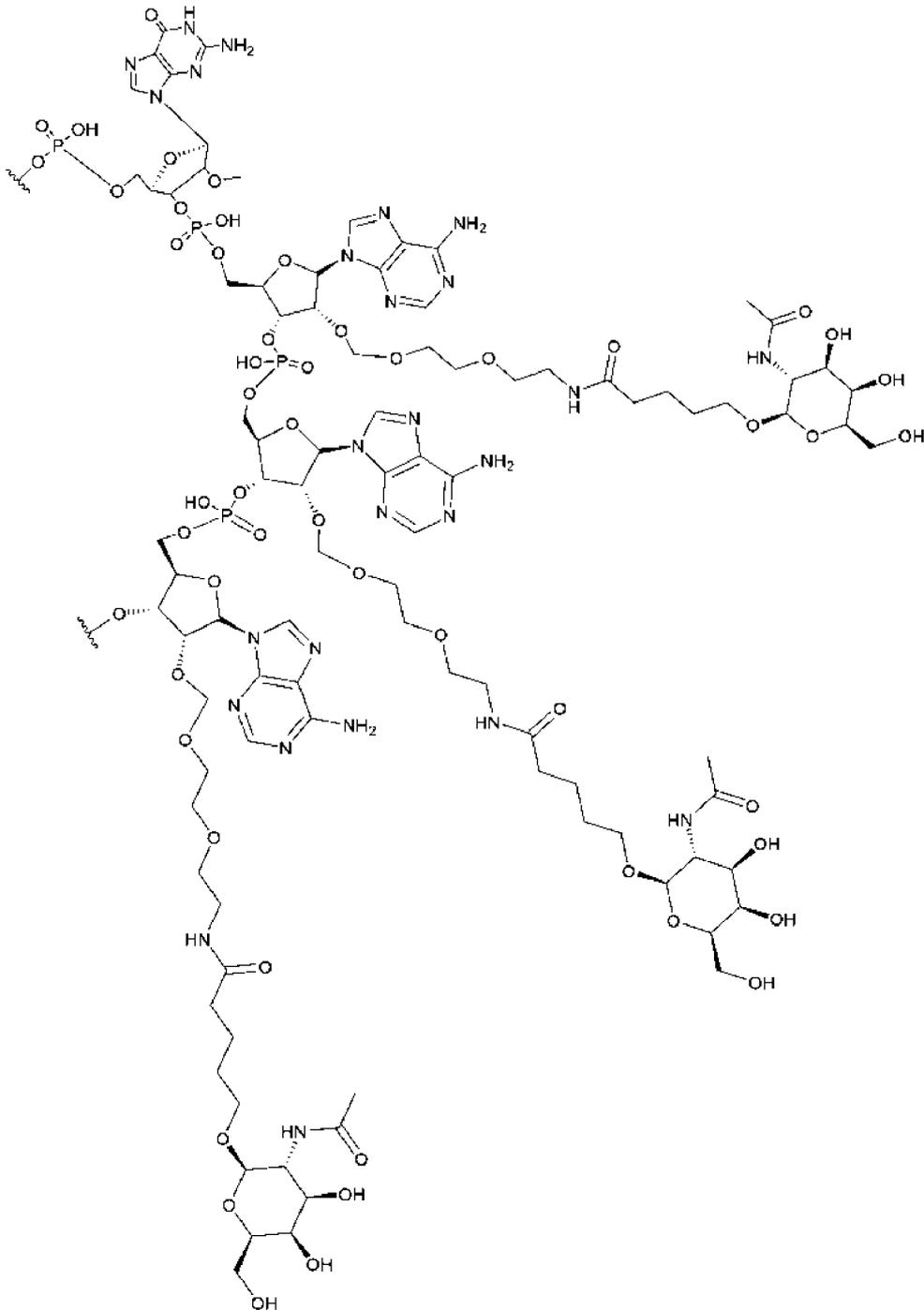
Z представляет собой связь, функциональную группу для реакции клик-химии или линкер длиной от 1 до 20 включительно последовательных ковалентно связанных атомов, выбранные из группы, состоящей из замещенного и незамещенного алкилена, замещенного и незамещенного алкенилена, замещенного и незамещенного 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, где 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: 66, и антисмысловая нить содержит нуклеотидную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 67.

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

67. Способ лечения субъекта, у которого имеется заболевание, нарушение или состояние, ассоциированное с активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, при этом способ включает введение субъекту олигонуклеотида для RNAi по любому из пп. 1-65 или фармацевтической композиции по п. 66 или соответствующей фармацевтически приемлемой соли.

68. Способ по п. 67, где олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль разрушает мРНК-транскрипт *CFB* в клетке субъекта.

69. Способ по п. 67 или п. 68, где обеспечивают снижение экспрессии *CFB* в клетке субъекта.

70. Способ по п. 67 или п. 68, где обеспечивают снижение транскрипции *CFB* в клетке субъекта.

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

72. Способ по п. 67, где обеспечивают снижение уровня и/или активности CFB на от 10% до 100% относительно уровня и/или активности CFB 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, вектор по п. 67 или клетку по п. 68.

73. Способ по п. 72, где обеспечивают снижение уровня и/или активности CFB на от 50% до 99% относительно уровня и/или активности CFB 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 является млекопитающим.

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

76. Способ по любому из пп. 67-75, где у субъекта идентифицировано наличие заболевания, нарушения или состояния, опосредованного активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента.

77. Способ по п. 76, где заболевание, нарушение или состояние, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), С3-гломерулопатии (С3G), иммуноглобулин-А-нефропатии (IgAN), мембранозной нефропатии (MN), включая первичную MN, индуцированного *E. coli* или типичного гемолитико-уремического синдрома (HUS), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), возрастной дегенерации желтого пятна, географической атрофии, диабетической ретинопатии, увеита, среднего увеита, увеита при болезни Бехчета, пигментного ретинита, отека желтого пятна, мультифокального хориоидита, синдрома Фогта-Коянаги-Харады, дробьевидной ретинохориоидопатии, симпатической офтальмии, глазного рубцующего пемфигоида, глазной пузырчатки, неартритной ишемической невропатии глазного нерва, послеоперационного воспаления, окклюзии вен сетчатки, неврологических нарушений, рассеянного склероза, инсульта, синдрома Гийена-Барре, травматического повреждения головного мозга, болезни Паркинсона, осложнений гемодиализа, сверхострого отторжения аллотрансплантата, отторжения ксенотрансплантата, токсичности, индуцированной интерлейкином-2 в ходе терапии с IL-2, воспалительных нарушений, воспаления при аутоиммунных заболеваниях, болезни Крона, респираторного дистресс-синдрома взрослых, миокардита, постишемических реперфузионных состояний, инфаркта миокарда, баллонной ангиопластики, постперфузионного синдрома при сердечно-легочном шунтировании или почечном шунтировании, атеросклероза, гемодиализа, ишемии почек, реперфузии брыжеечной

артерии после реконструкции аорты, инфекционного заболевания или сепсиса, форм болезни иммунных комплексов и аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, системной красной волчанки (SLE), SLE-нефрита, пролиферативного нефрита, фиброза печени, гемолитической анемии, тяжелой миастении, регенерации тканей, нейрорегенерации, одышки, кровохарканья, острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), эмфиземы, форм легочной эмболии и инфаркта, пневмонии, фиброгенных пылевых заболеваний, фиброза легких, аллергии, бронхоспазма, гиперчувствительного пневмонита, паразитарных заболеваний, синдрома Гудпасчера, легочного васкулита, слабоиммунного васкулита, воспаления, ассоциированного с иммунными комплексами, антифосфолипидного синдрома, гломерулонефрита, ожирения, артрита, аутоиммунного заболевания сердца, воспалительного заболевания кишечника, ишемически-реперфузионных повреждений, синдрома Барракера-Симонса, гемодиализа, васкулита, ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), криоглобулинемии, псориаза, трансплантации, заболеваний центральной нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные состояния, болезни плотных отложений, пузырьчатых кожных заболеваний, мембранопролиферативного гломерулонефрита II типа (MPGN II), хронической реакции "трансплантат против хозяина", синдрома Фелти, гангренозной пиодермии (PG), гнойного гидраденита (HS), легочной артериальной гипертензии, первичного синдрома Шегрена, первичного билиарного холангита, аутосомно-доминантного поликистоза почек и заболевания, ассоциированного с антителами к миелин-олигодендрогликовому гликопротеину (MOGAD).

78. Способ по п. 76, где заболевание, нарушение или состояние, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, представляет собой ревматоидный артрит.

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

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

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

82. Способ по любому из пп. 67-81, 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.

83. Способ снижения экспрессии *CFB* 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.

84. Способ по п. 83, где снижение экспрессии *CFB* включает снижение количества или уровня мРНК *CFB*, количества или уровня белка *CFB* или и того и другого.

85. Способ по п. 84, где обеспечивают снижение уровня мРНК *CFB*, уровня белка *CFB* или и того и другого на от 10% до 100% относительно уровня мРНК *CFB*, уровня белка *CFB* 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 п. 85, где обеспечивают снижение уровня мРНК *CFB*, уровня белка *CFB* или и того и другого на от 50% до 99% относительно уровня мРНК *CFB*, уровня белка *CFB* 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.

87. Способ по любому из пп. 83-86, где у субъекта имеется заболевание, нарушение или состояние, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента.

88. Способ по п. 87, где заболевание, нарушение или состояние, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, выбрано из группы, состоящей из пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), С3-гломерулопатии (С3G), иммуноглобулин-А-нефропатии (IgAN), мембранозной нефропатии (MN), включая первичную MN, индуцированного *E. coli* или типичного гемолитико-уремического синдрома (HUS), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), возрастной дегенерации желтого пятна, географической атрофии,

диабетической ретинопатии, увеита, среднего увеита, увеита при болезни Бехчета, пигментного ретинита, отека желтого пятна, мультифокального хориоидита, синдрома Фогта-Коянаги-Харады, дробьевидной ретинохориоидопатии, симпатической офтальмии, глазного рубцующего пемфигоида, глазной пузырчатки, неартеритной ишемической невротии глазного нерва, послеоперационного воспаления, окклюзии вен сетчатки, неврологических нарушений, рассеянного склероза, инсульта, синдрома Гийена-Барре, травматического повреждения головного мозга, болезни Паркинсона, осложнений гемодиализа, сверхострого отторжения аллотрансплантата, отторжения ксенотрансплантата, токсичности, индуцированной интерлейкином-2 в ходе терапии с IL-2, воспалительных нарушений, воспаления при аутоиммунных заболеваниях, болезни Крона, респираторного дистресс-синдрома взрослых, миокардита, постишемических реперфузионных состояний, инфаркта миокарда, баллонной ангиопластики, постперфузионного синдрома при сердечно-легочном шунтировании или почечном шунтировании, атеросклероза, гемодиализа, ишемии почек, реперфузии брыжеечной артерии после реконструкции аорты, инфекционного заболевания или сепсиса, форм болезни иммунных комплексов и аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, системной красной волчанки (SLE), SLE-нефрита, пролиферативного нефрита, фиброза печени, гемолитической анемии, тяжелой миастении, регенерации тканей, нейрорегенерации, одышки, кровохарканья, острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), эмфиземы, форм легочной эмболии и инфаркта, пневмонии, фиброгенных пылевых заболеваний, фиброза легких, аллергии, бронхоспазма, гиперчувствительного пневмонита, паразитарных заболеваний, синдрома Гудпасчера, легочного васкулита, слабоиммунного васкулита, воспаления, ассоциированного с иммунными комплексами, антифосфолипидного синдрома, гломерулонефрита, ожирения, артрита, аутоиммунного заболевания сердца, воспалительного заболевания кишечника, ишемически-реперфузионных повреждений, синдрома Барракера-Симонса, гемодиализа, васкулита, ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), криоглобулинемии, псориаза, трансплантации, заболеваний центральной нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные состояния, болезни плотных отложений, пузырчатых кожных заболеваний, мембранопротрофиеративного гломерулонефрита II типа (MPGN II), хронической реакции "трансплантат против хозяина", синдрома Фелти, гангренозной пиодермии (PG), гнойного гидраденита (HS), легочной артериальной гипертензии, первичного синдрома Шегрена, первичного билиарного холангита, аутосомно-доминантного поликистоза почек и

заболевания, ассоциированного с антителами к миелин-олигодендроцитарному гликопротеину (MOGAD).

89. Способ по п. 87, где заболевание, нарушение или состояние, опосредованное активацией или нарушением регуляции пути активации системы комплемента, представляет собой ревматоидный артрит.

90. Набор, содержащий олигонуклеотид для RNAi по любому из пп. 1-65 или его фармацевтически приемлемую соль или фармацевтическую композицию по п. 66.

91. 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 активации системы комплемента, у субъекта, нуждающегося в этом.

92. Олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция по п. 91 для применения в профилактике или лечении пароксизмальной ночной гемоглобинурии (PNH), С3-гломерулопатии (С3G), иммуноглобулин-А-нефропатии (IgAN), мембранозной нефропатии (MN), индуцированного *E. coli* или типичного гемолитико-уремического синдрома (HUS), атипичного гемолитико-уремического синдрома (aHUS), возрастной дегенерации желтого пятна, географической атрофии, диабетической ретинопатии, увеита, среднего увеита, увеита при болезни Бехчета, пигментного ретинита, отека желтого пятна, мультифокального хориоидита, синдрома Фогта-Коянаги-Харады, дробьевидной ретинохориоидопатии, симпатической офтальмии, глазного рубцующего пемфигоида, глазной пузырчатки, неартритной ишемической невропатии глазного нерва, послеоперационного воспаления, окклюзии вен сетчатки, неврологических нарушений, рассеянного склероза, инсульта, синдрома Гийена-Барре, травматического повреждения головного мозга, болезни Паркинсона, осложнений гемодиализа, сверхострого отторжения аллотрансплантата, отторжения ксенотрансплантата, токсичности, индуцированной интерлейкином-2 в ходе терапии с IL-2, воспалительных нарушений, воспаления при аутоиммунных заболеваниях, болезни Крона, респираторного дистресс-синдрома взрослых, миокардита, постишемических реперфузионных состояний, инфаркта миокарда, баллонной ангиопластики, постперфузионного синдрома при сердечно-легочном шунтировании или почечном шунтировании, атеросклероза, гемодиализа, ишемии почек, реперфузии брыжеечной артерии после реконструкции аорты, инфекционного заболевания или сепсиса, форм болезни иммунных комплексов и аутоиммунных заболеваний, ревматоидного артрита, системной красной волчанки (SLE),

SLE-нефрита, пролиферативного нефрита, фиброза печени, гемолитической анемии, тяжелой миастении, регенерации тканей, нейрорегенерации, одышки, кровохарканья, острого респираторного дистресс-синдрома (ARDS), астмы, хронического обструктивного заболевания легких (COPD), эмфиземы, форм легочной эмболии и инфаркта, пневмонии, фиброгенных пылевых заболеваний, фиброза легких, аллергии, бронхоспазма, гиперчувствительного пневмонита, паразитарных заболеваний, синдрома Гудпасчера, легочного васкулита, слабоиммунного васкулита, воспаления, ассоциированного с иммунными комплексами, антифосфолипидного синдрома, гломерулонефрита, ожирения, артрита, аутоиммунного заболевания сердца, воспалительного заболевания кишечника, ишемически-реперфузионных повреждений, синдрома Барракера-Симонса, гемодиализа, васкулита, ассоциированного с антинейтрофильными цитоплазматическими антителами (ANCA), криоглобулинемии, псориаза, трансплантации, заболеваний центральной нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные состояния, болезни плотных отложений, пузырьчатых кожных заболеваний, мембранопролиферативного гломерулонефрита II типа (MPGN II), хронической реакции "трансплантат против хозяина", синдрома Фелти, гангренозной пиодермии (PG), гнойного гидраденита (HS), легочной артериальной гипертензии, первичного синдрома Шегрена, первичного билиарного холангита, аутосомно-доминантного поликистоза почек и заболевания, ассоциированного с антителами к миелин-олигодендроцитарному гликопротеину (MOGAD), у субъекта, нуждающегося в этом.

93. Олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция по п. 91 для применения в профилактике или лечении ревматоидного артрита у субъекта, нуждающегося в этом.

94. Олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция для применения по любому из пп. 91-93, где олигонуклеотид для RNAi или его фармацевтически приемлемая соль или фармацевтическая композиция вводится подкожно.

95. РНК-олигонуклеотид по любому из пп. 1-65, где РНК-олигонуклеотид предусматривает фармацевтически приемлемую соль.

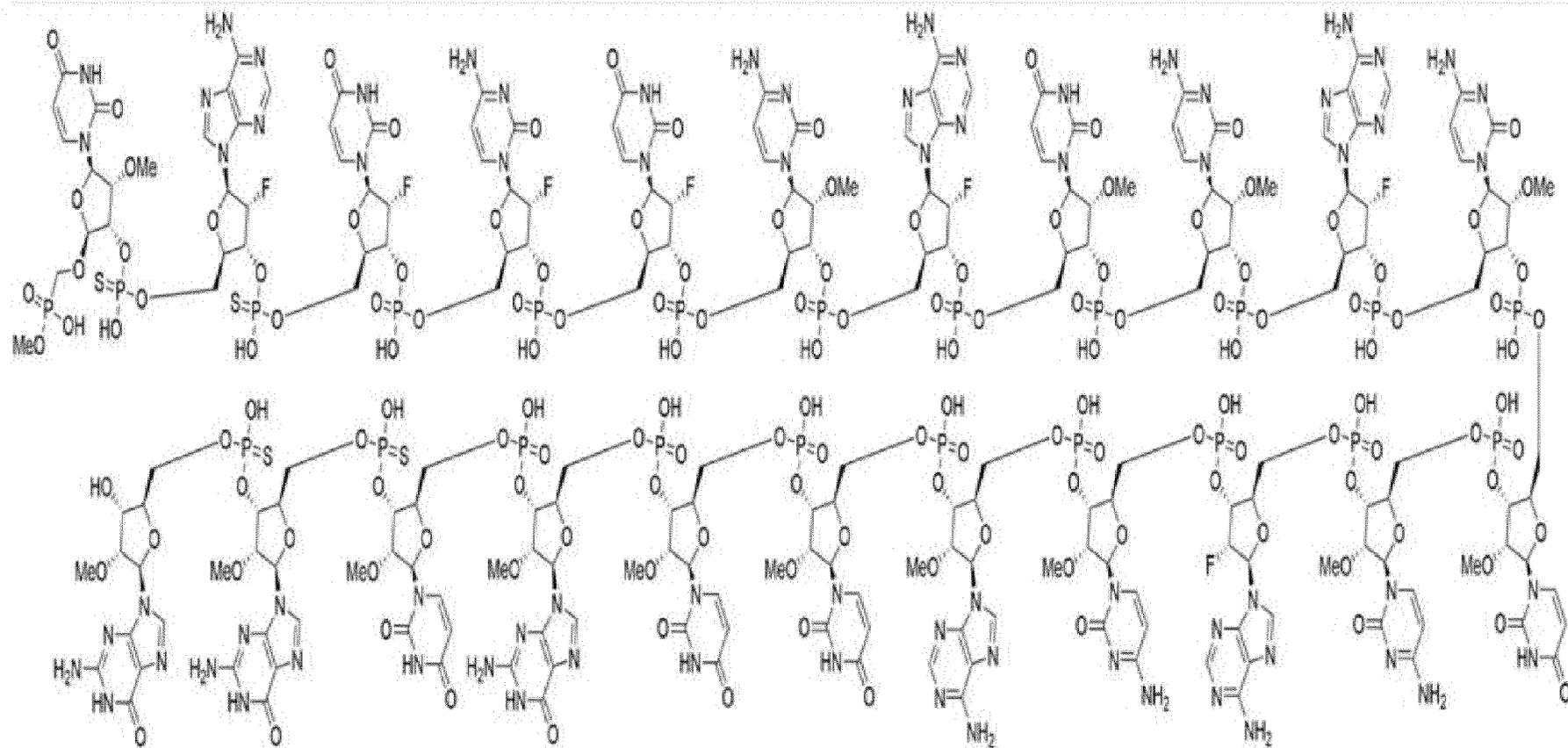
96. РНК-олигонуклеотид по п. 95, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой или включает в себя ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камфорсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, 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, валерат, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин или этиламин или представляет собой соль щелочного или щелочноземельного металла.

97. РНК-олигонуклеотид по п. 96, где соль щелочного или щелочноземельного металла выбрана из группы, состоящей из натриевой, литиевой, калиевой, кальциевой, магниевой и аммониевой (например, четвертичной аммониевой и тетраметиламмониевой).

98. РНК-олигонуклеотид по п. 95, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

ФИГ. 1В



ФИГ. 1С
Соединение А

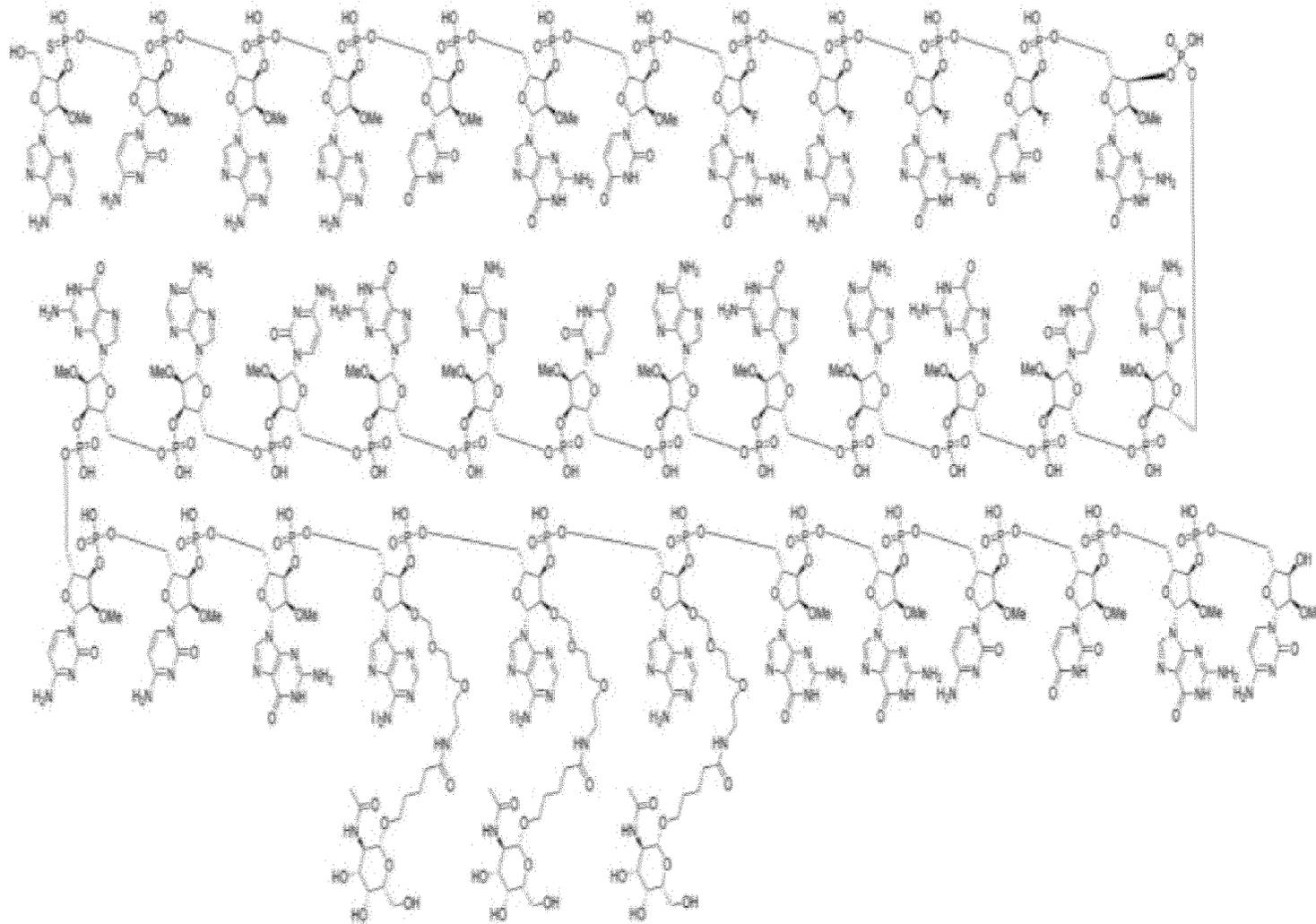
Смысловая нить (SEQ ID NO: 1)

5' - CAGGAAUUC CUGAAUUUUAAGCAGCCGAAAGGCUGC - 3'

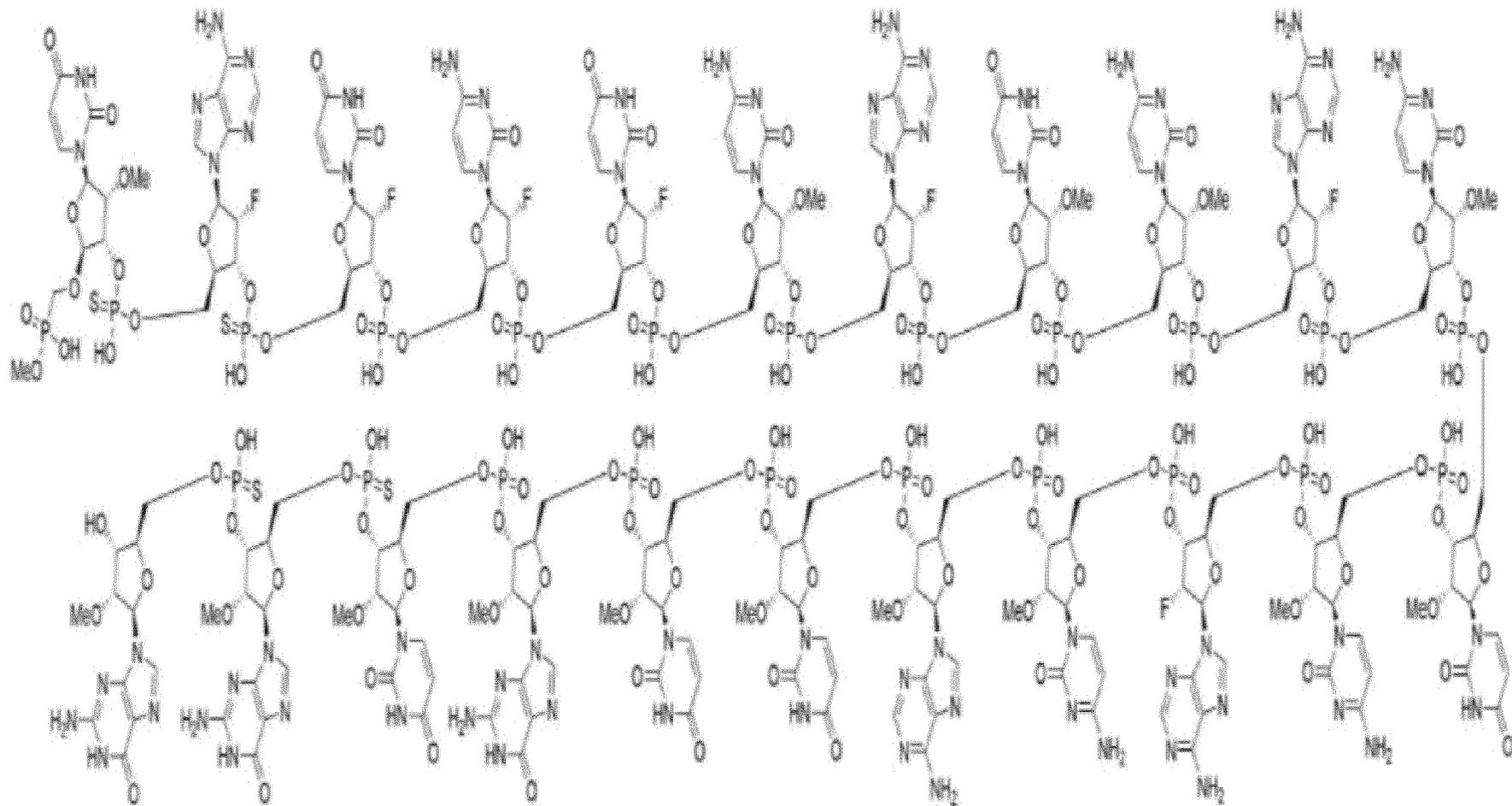
Антисмысловая нить (SEQ ID NO: 3)

5' - UUA AAAAUUCAGGAAUUC CUGGG - 3'

ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



ФИГ. 2С
Соединение В

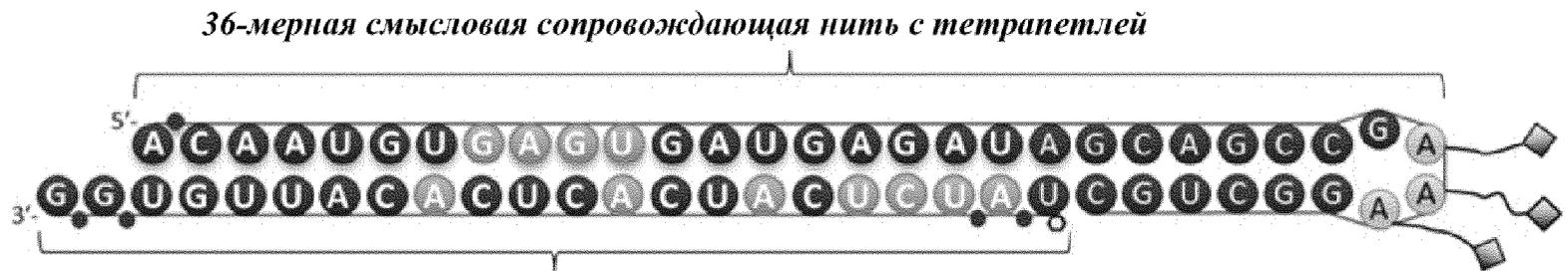
Смысловая нить (SEQ ID NO: 4)

5' – АСААUGUGAGUGAUGAGAUAGCAGCCGAAAGGCUGC – 3'

Антисмысловая нить (SEQ ID NO: 6)

5' – UАUCUCAUCACUCACAUGUGG – 3'

ФИГ. 2D
Соединение В

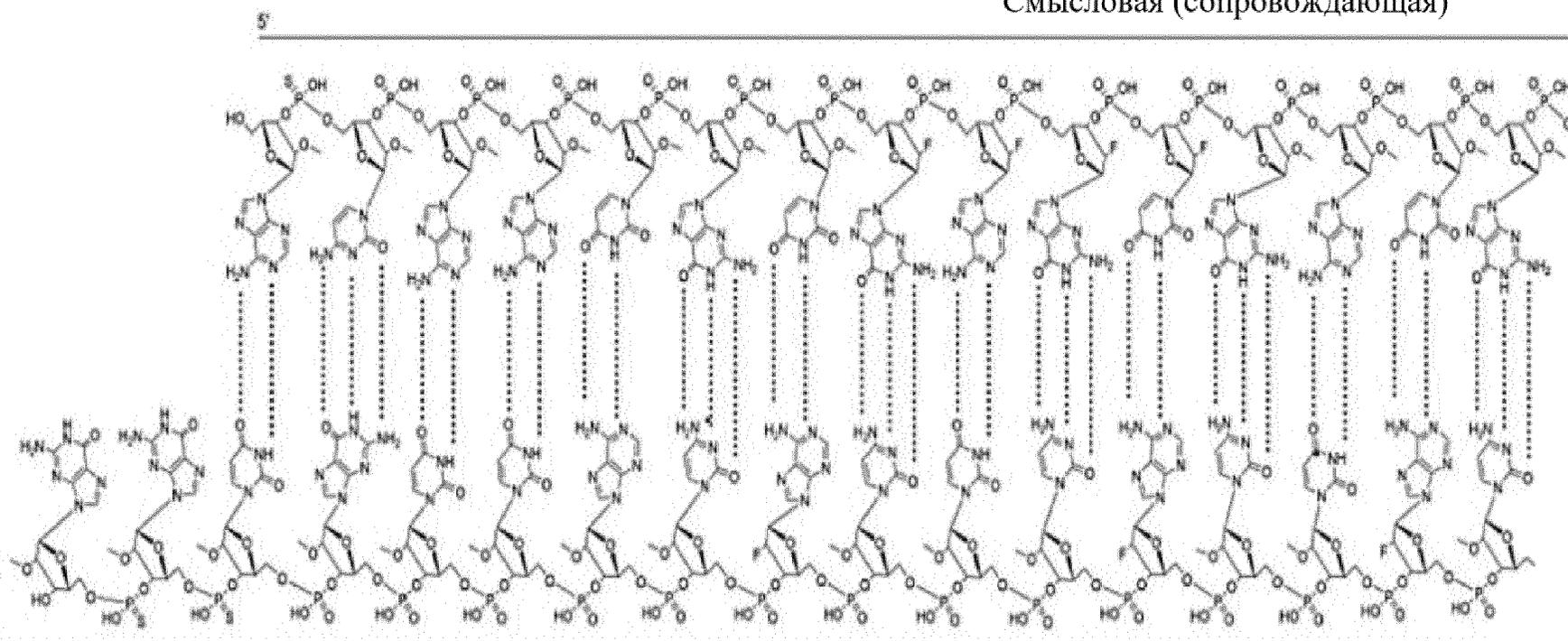


22-мерная антисмысловая направляющая нить с тетрапетлей (комплементарная по отношению к мРНК CFB)

- PS
 - 5'-MeMOP
 - Ⓝ 2'-OMe
 - Ⓛ 2'-F
 - ⓐ 2'-ацеталь
 - линкер
 - ◆ GalNAc
- где N представляет собой любой остаток нуклеиновой кислоты

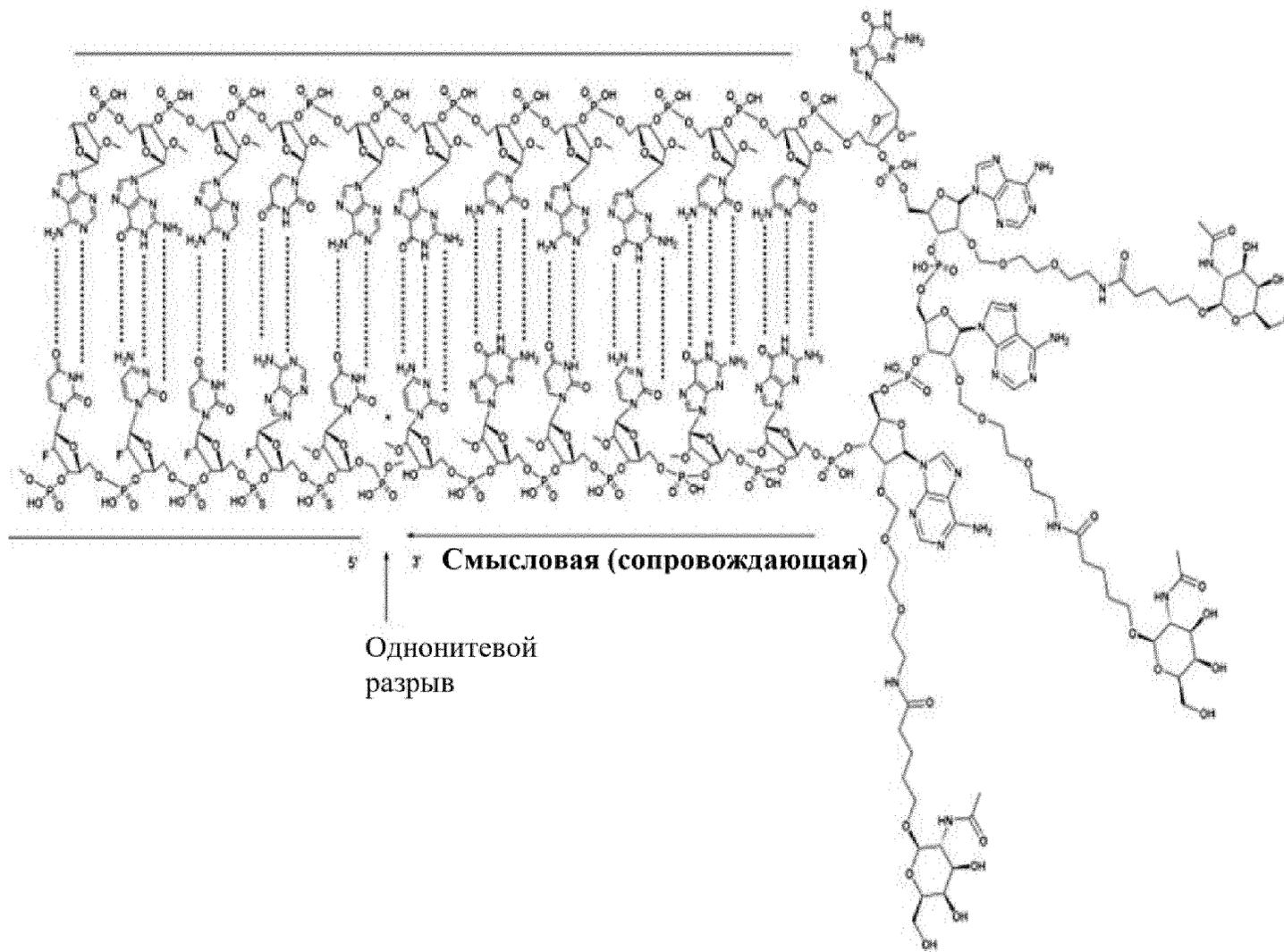
ФИГ. 2Е-1
Соединение В

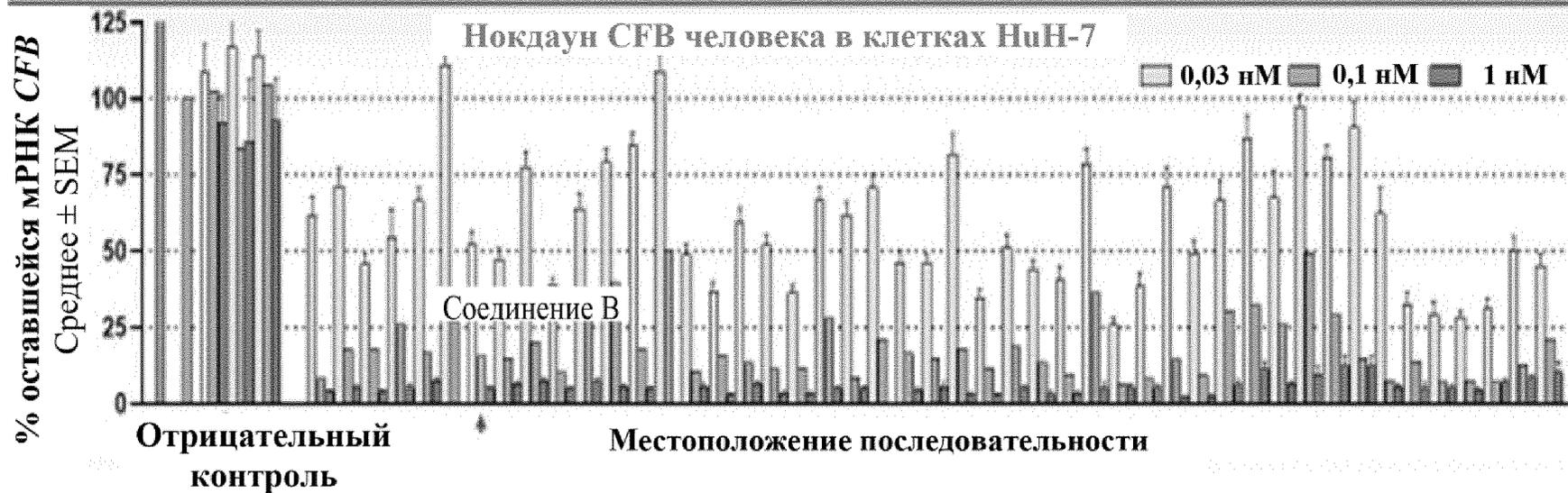
Смысловая (сопровождающая)



Антисмысловая (направляющая)

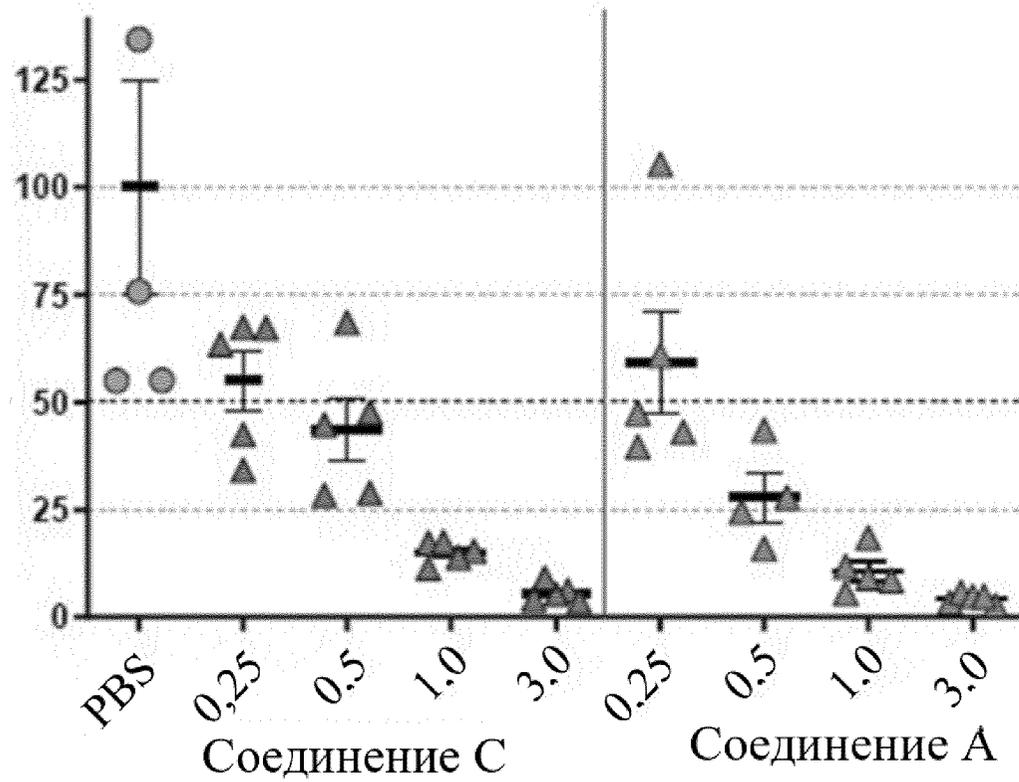
ФИГ. 2Е-2
Соединение В



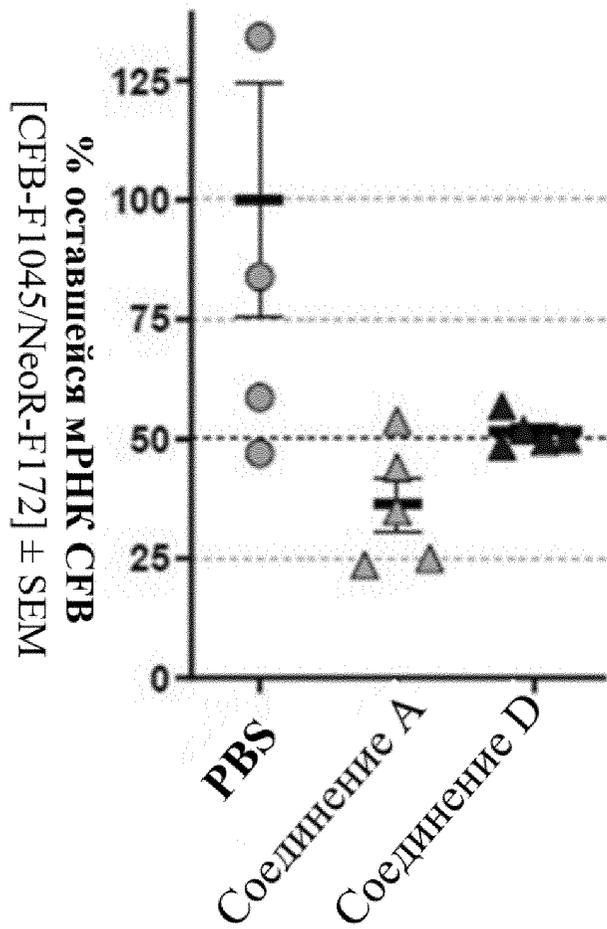


ФИГ. 4А

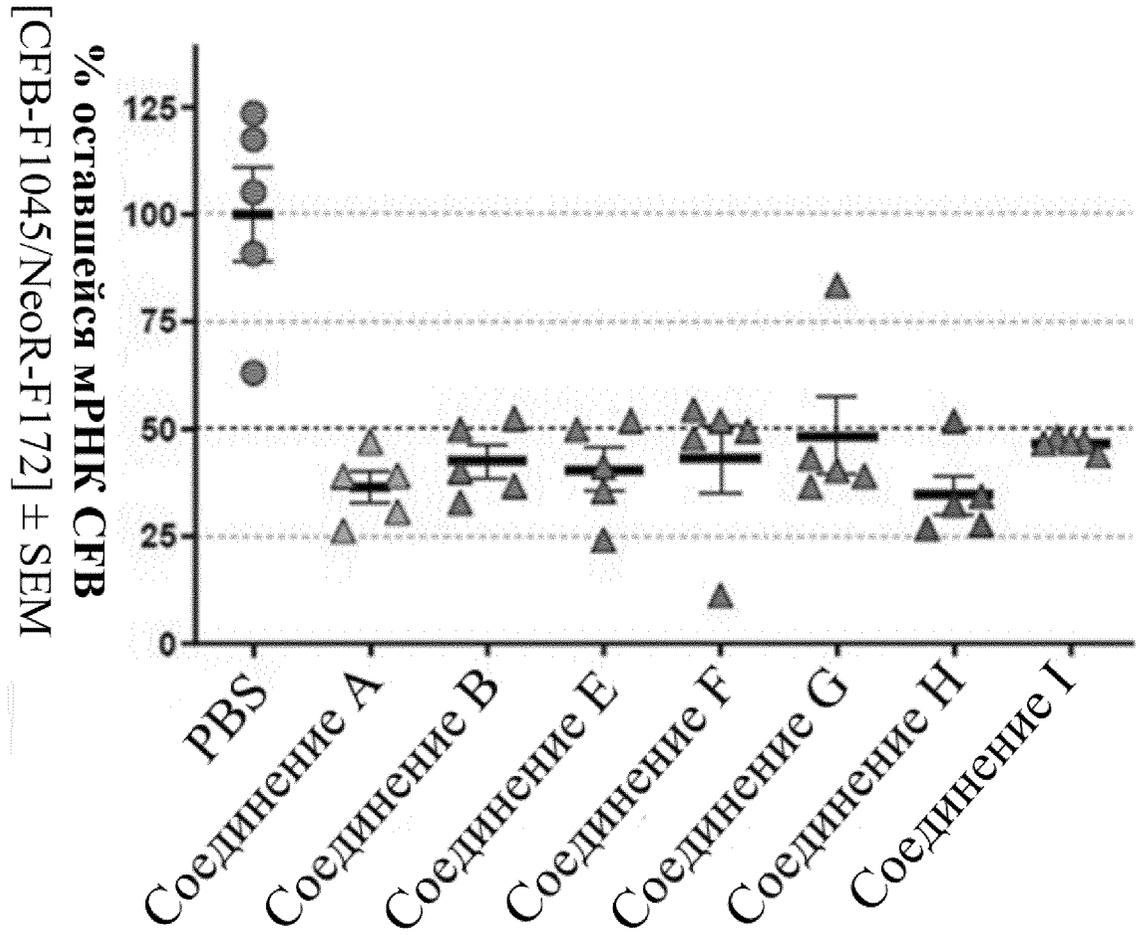
% оставшейся мРНК CFB
[CFB-F1045/NeoR-F172] ± SEM



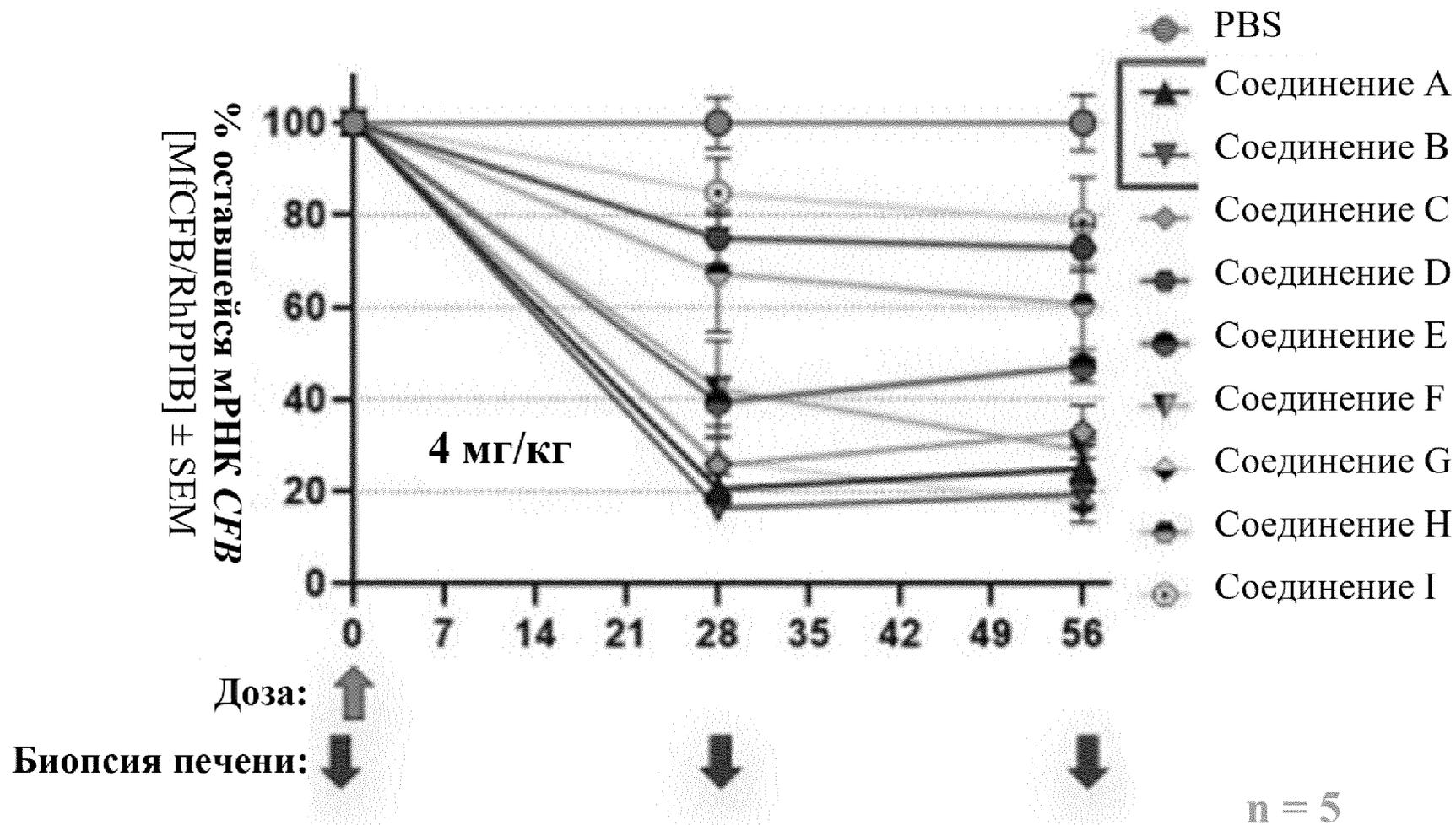
ФИГ. 4В



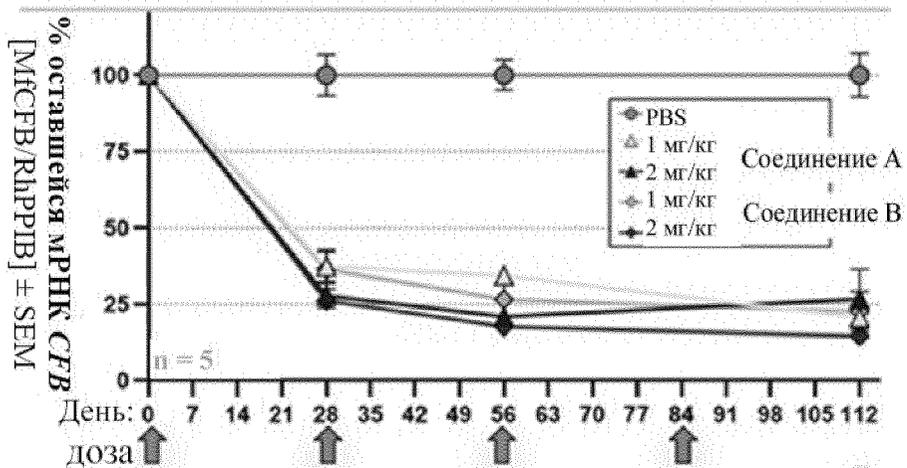
ФИГ. 4С



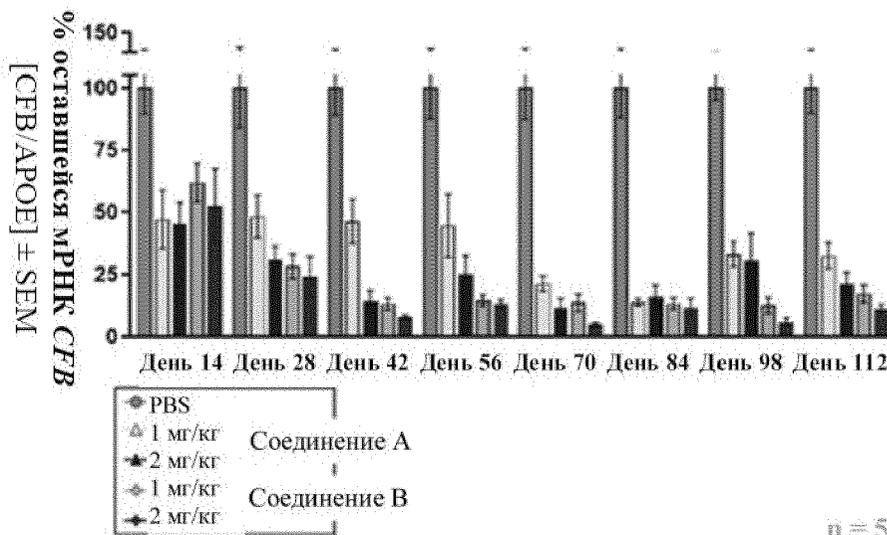
ФИГ. 5



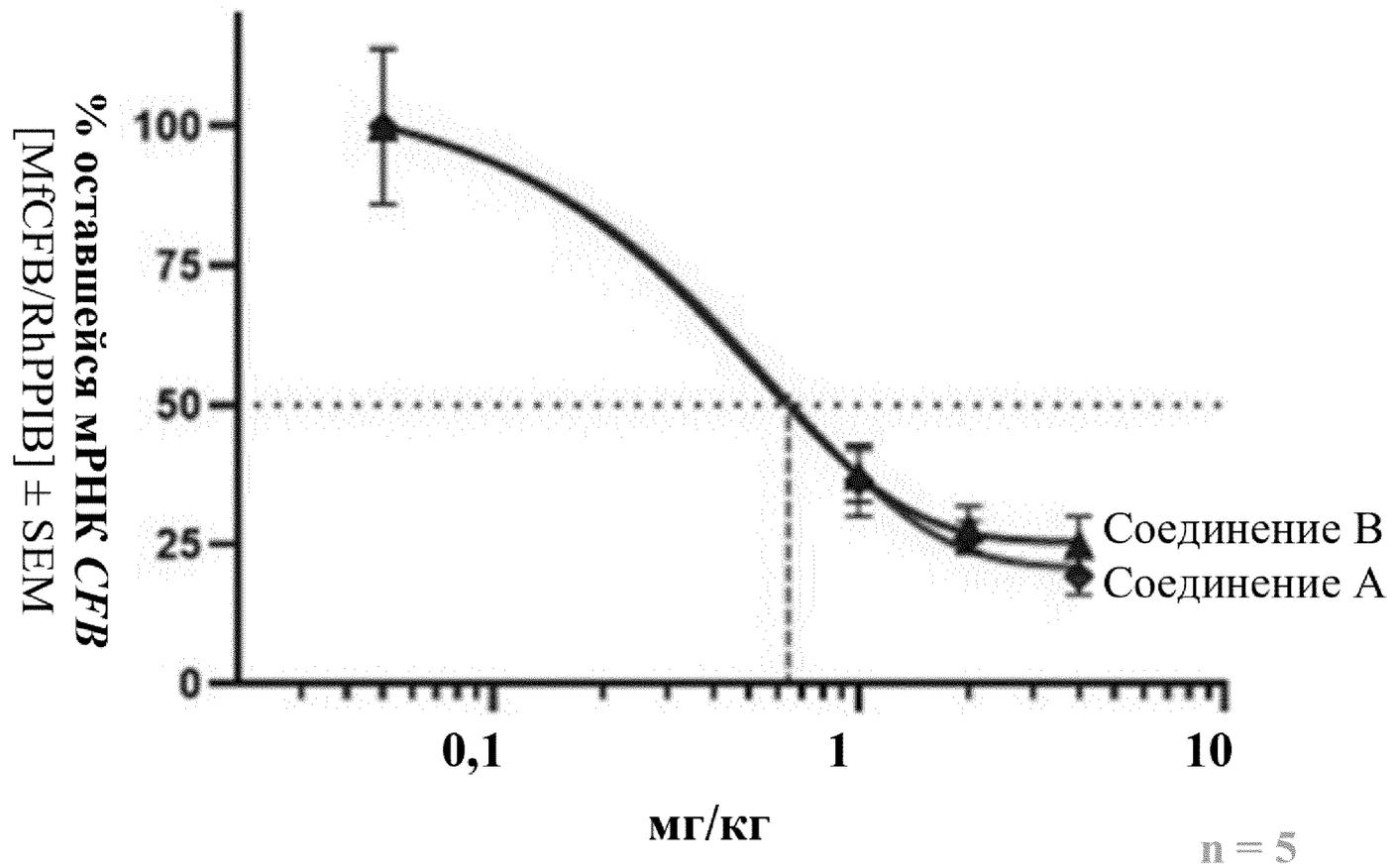
ФИГ. 6А



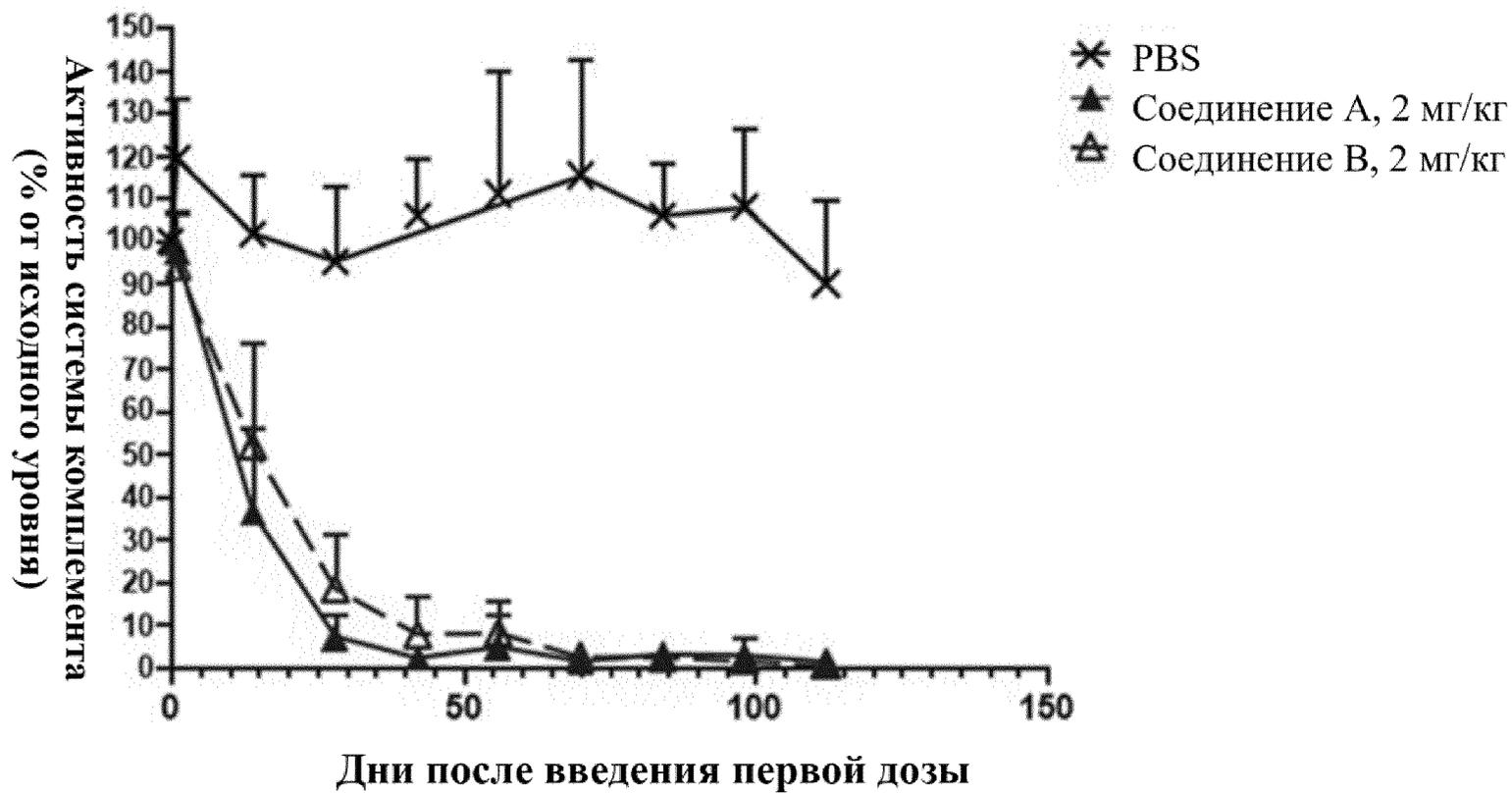
ФИГ. 6В



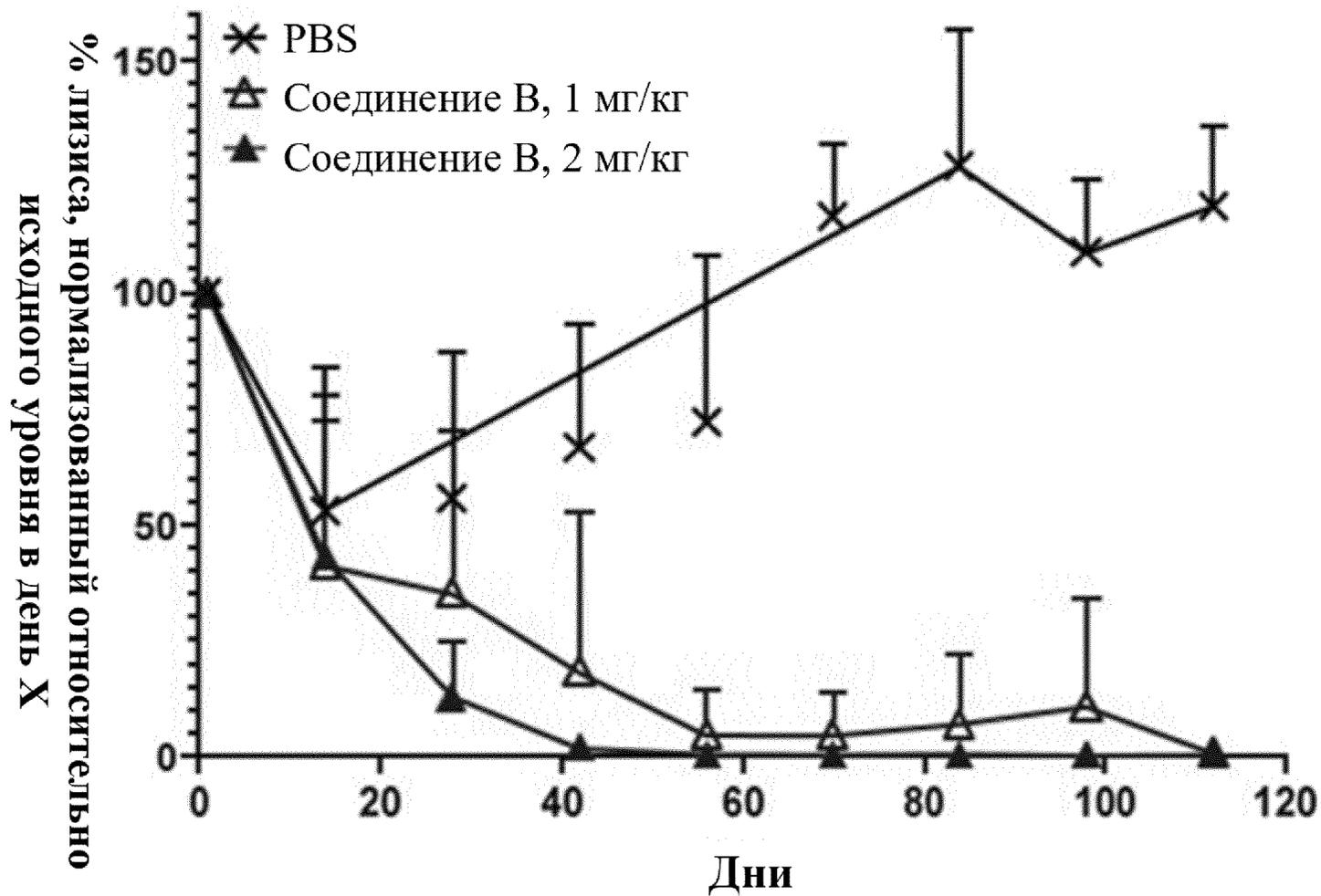
ФИГ. 7



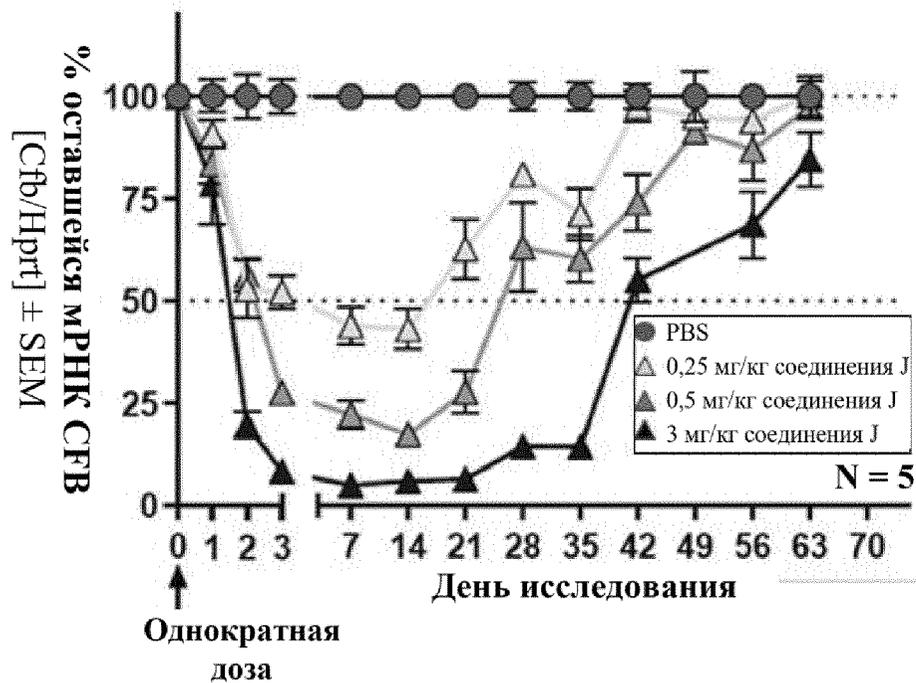
ФИГ. 8



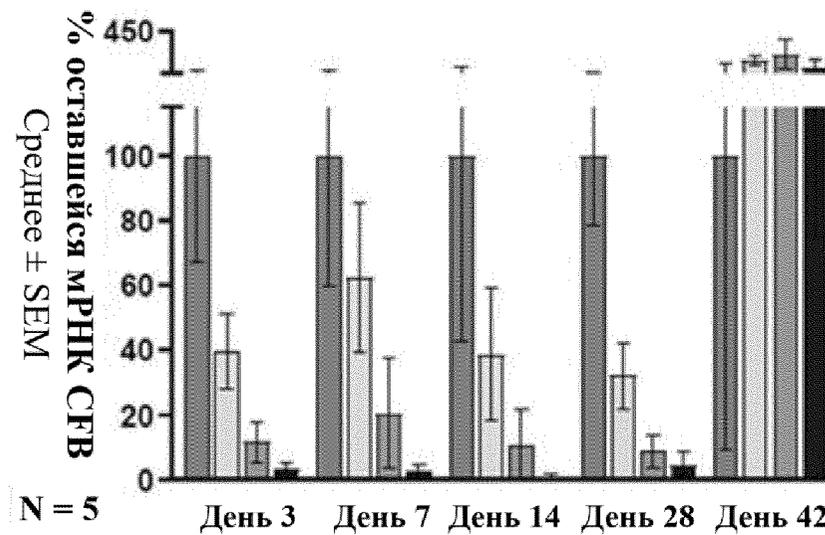
ФИГ. 9



ФИГ. 10А

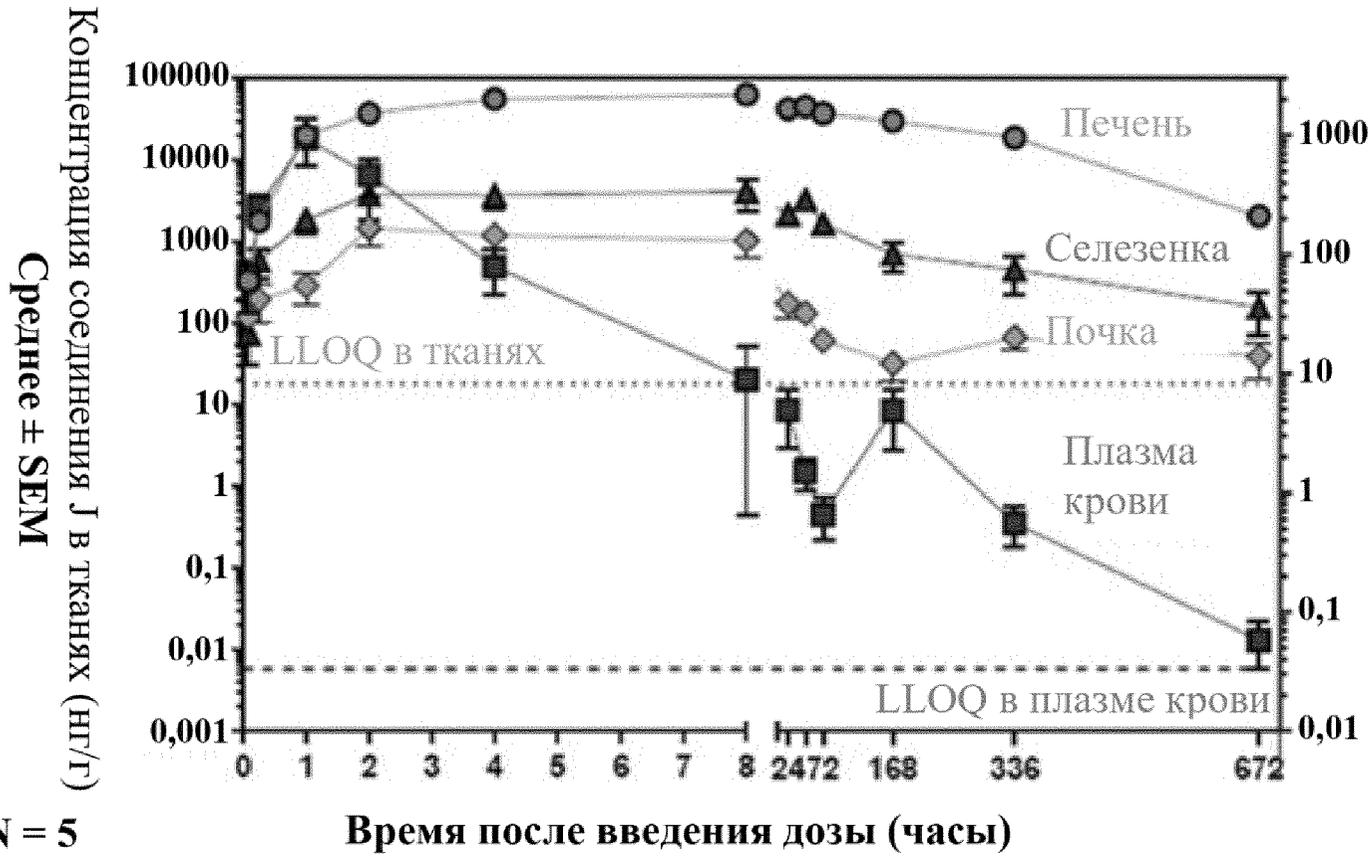


ФИГ. 10В

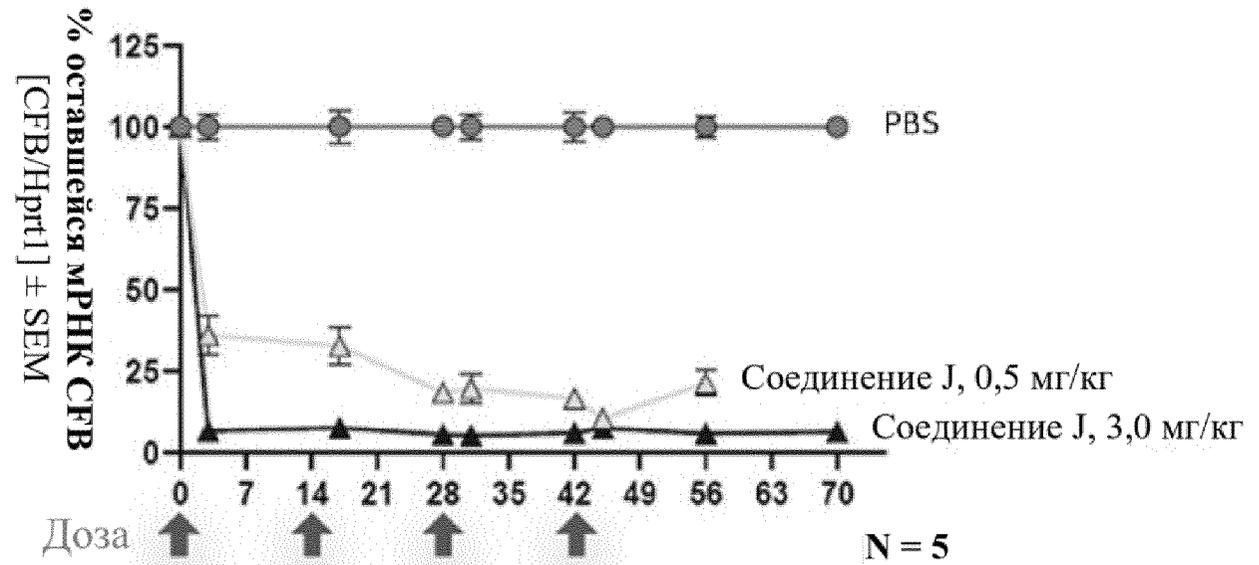


Концентрация соединения J в плазме крови (нг/мл)
Среднее \pm SEM

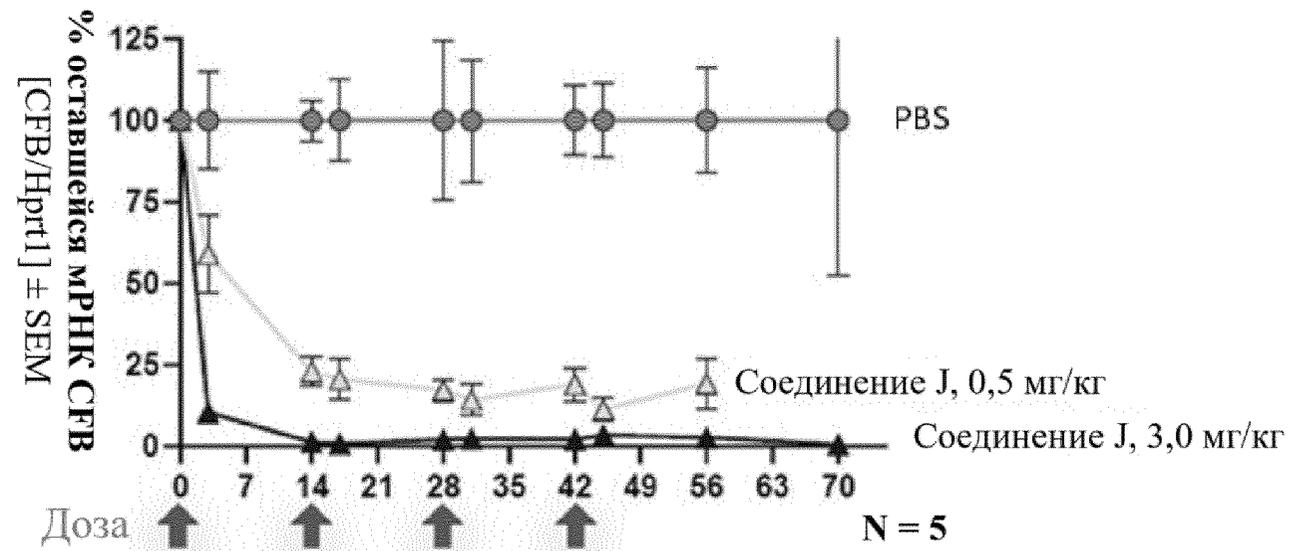
ФИГ. 11



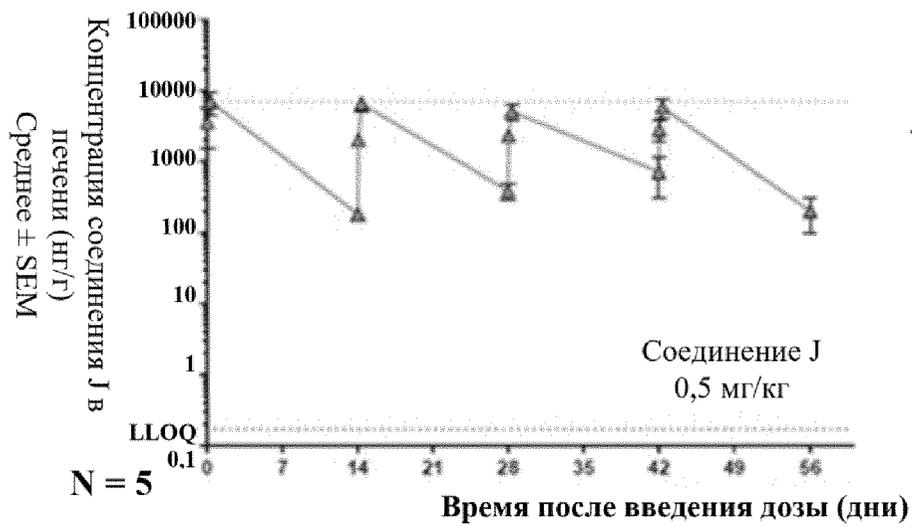
ФИГ. 12А



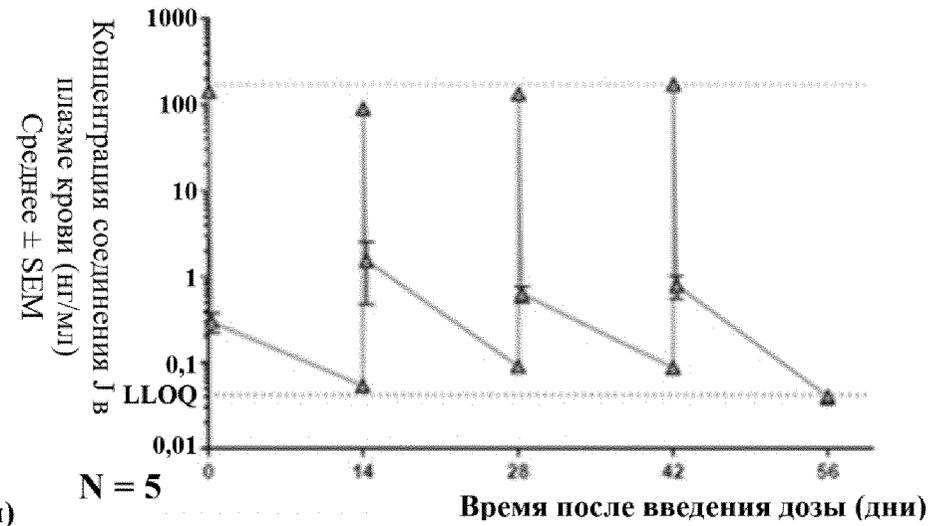
ФИГ. 12В



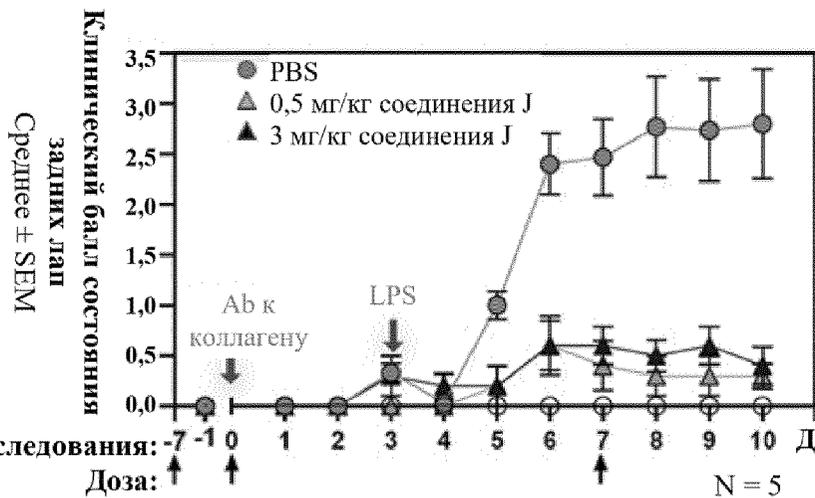
ФИГ. 13А



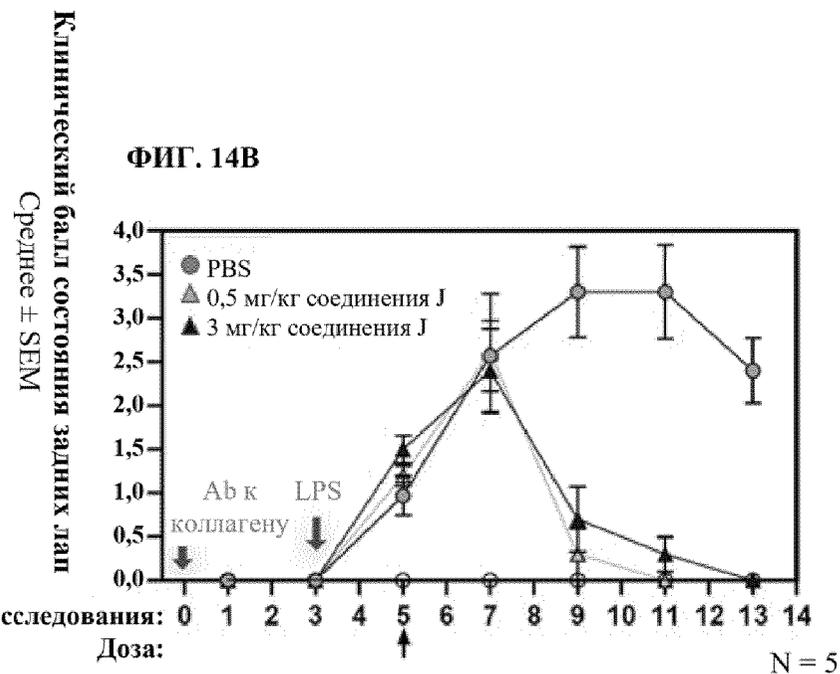
ФИГ. 13В



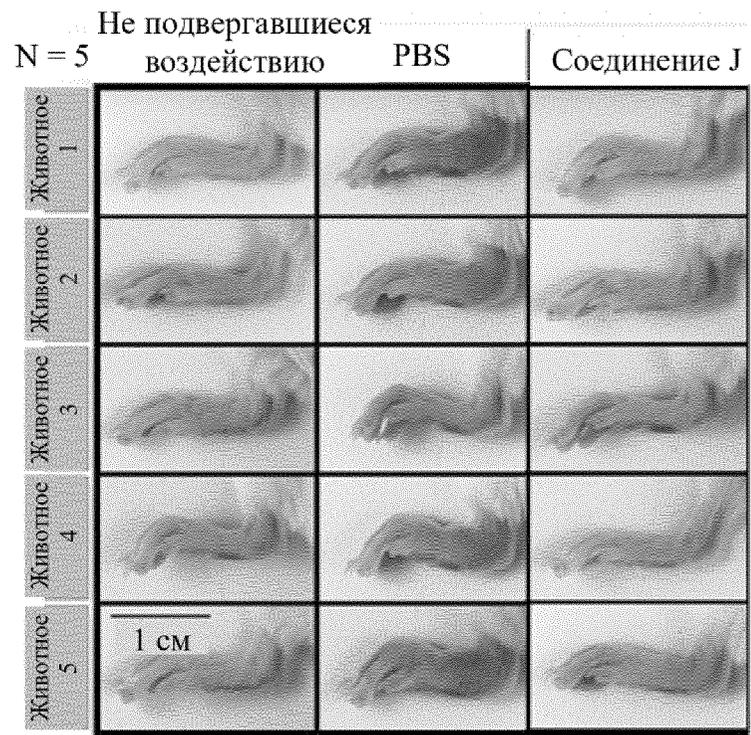
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В

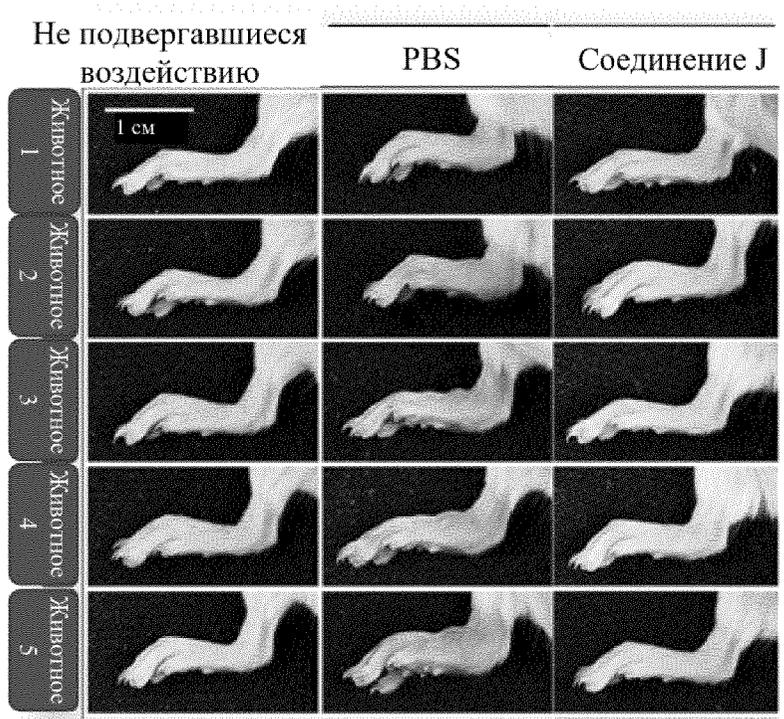


ФИГ. 15А



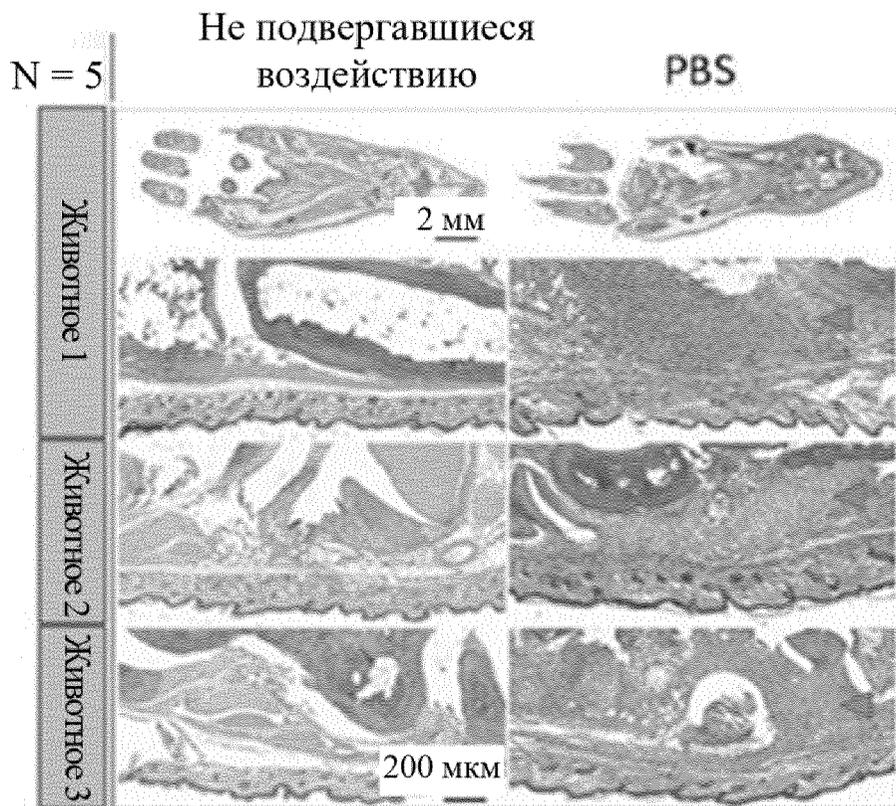
Масштабная метка = 1 см

ФИГ. 15В



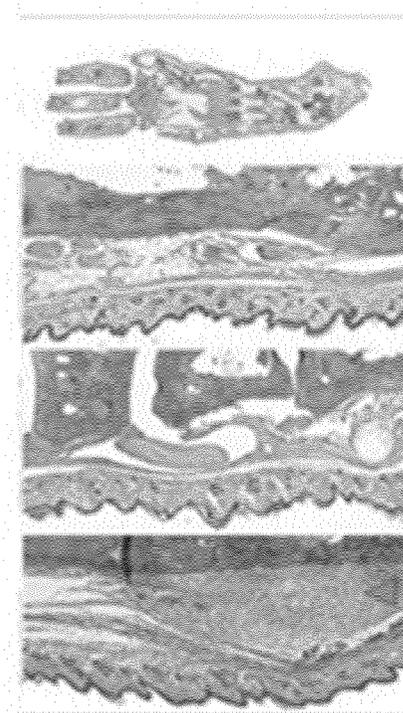
Масштабная метка = 1 см

ФИГ. 16



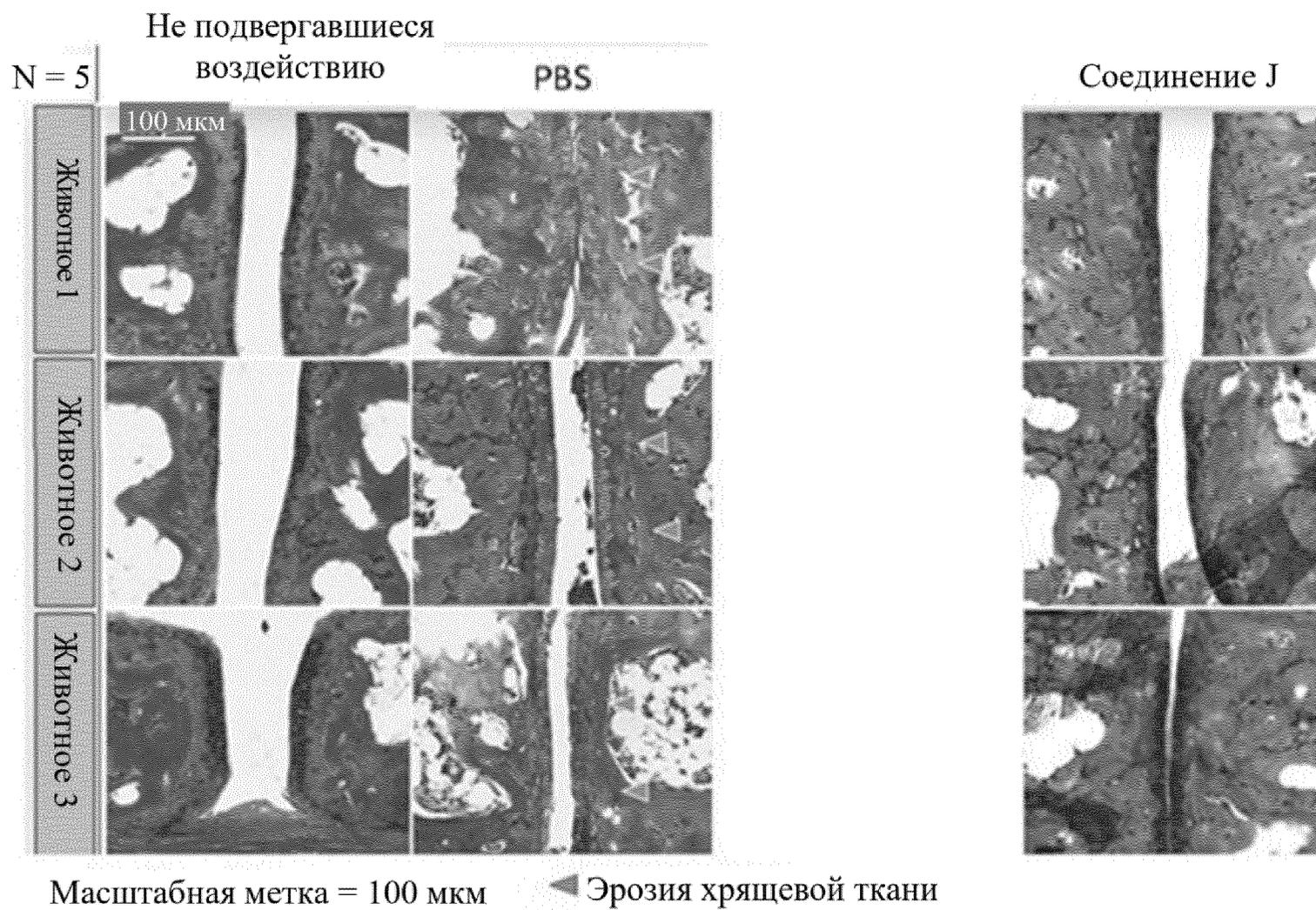
▲ Инфильтрация
мононуклеарными
клетками

Соединение J

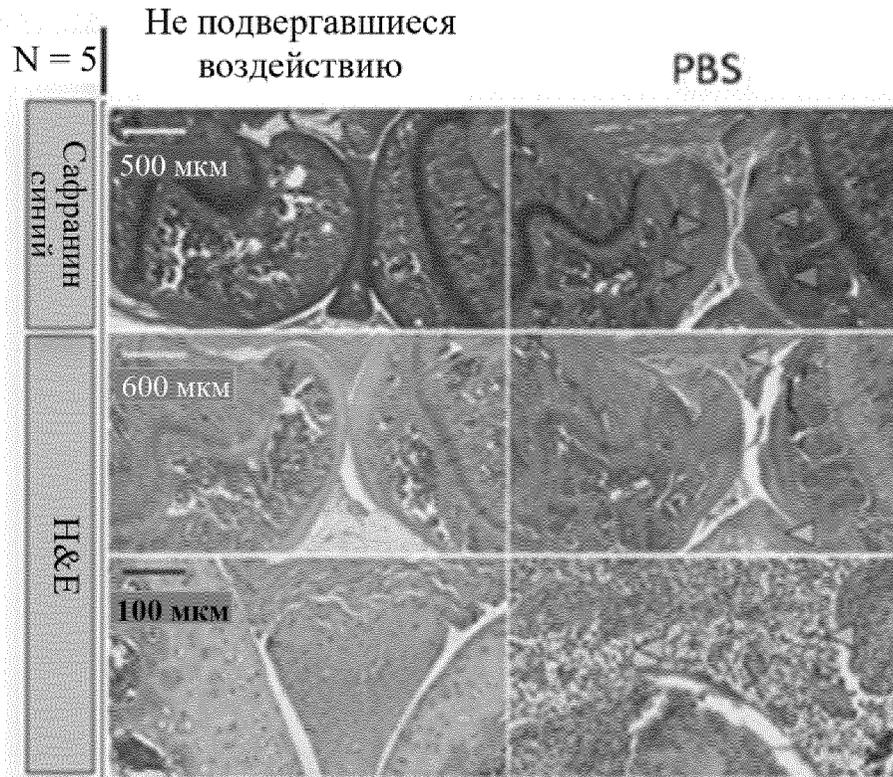


Верхняя масштабная метка = 2 мм; нижняя
масштабная метка = 200 мкм

ФИГ. 17

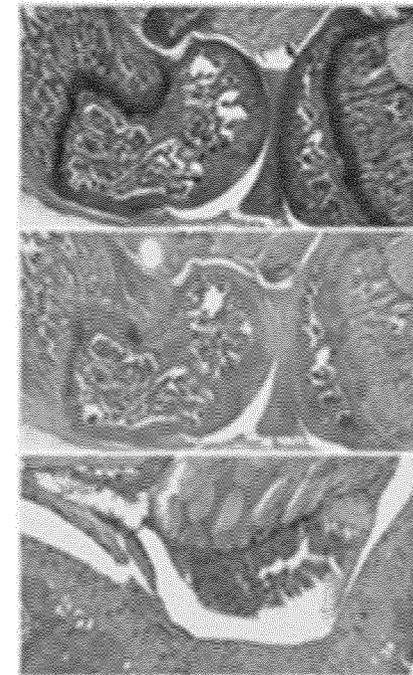


ФИГ. 18



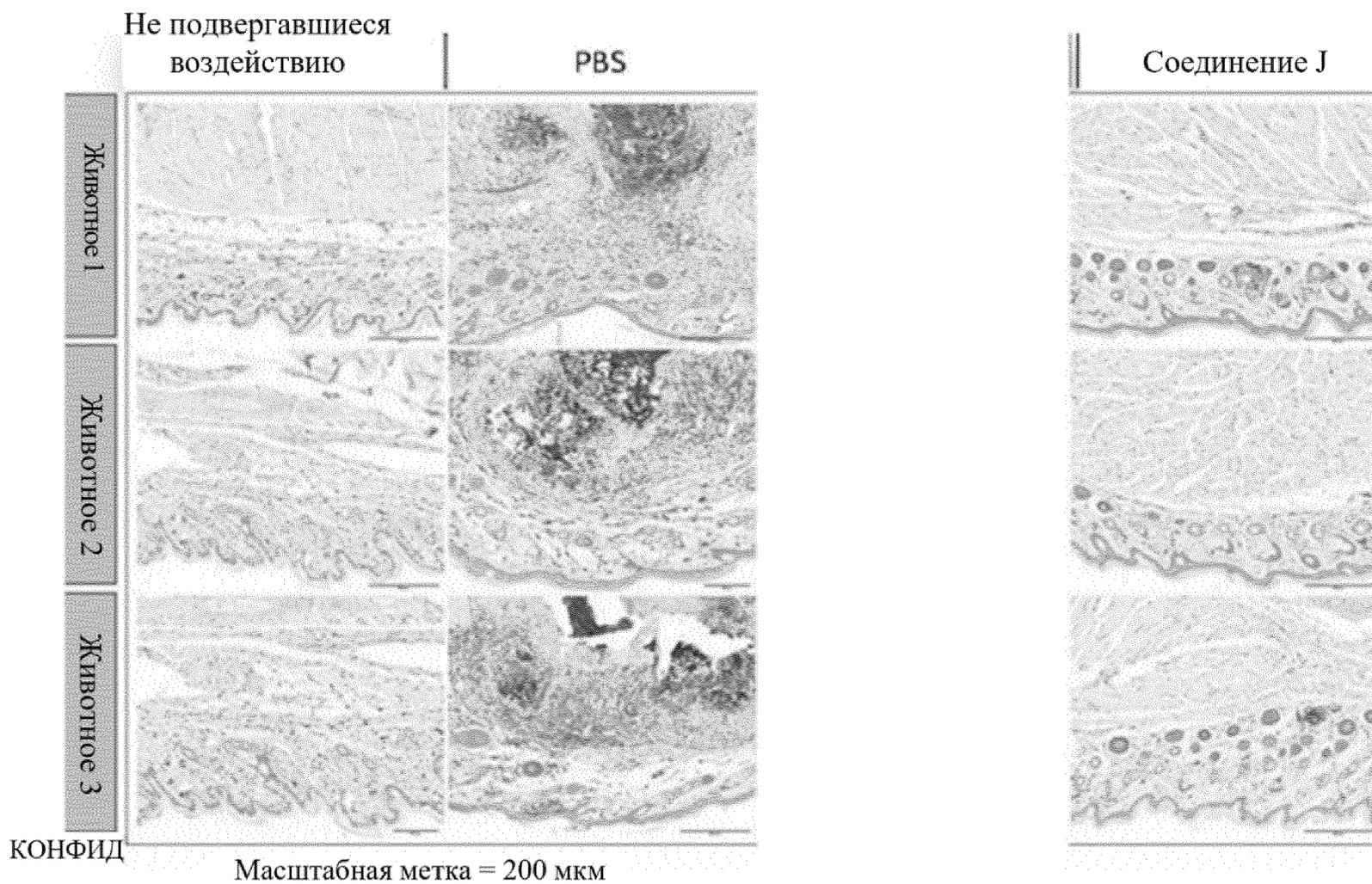
Масштабная метка = 500 мкм (белый) или 100 мкм (черный)

Соединение J



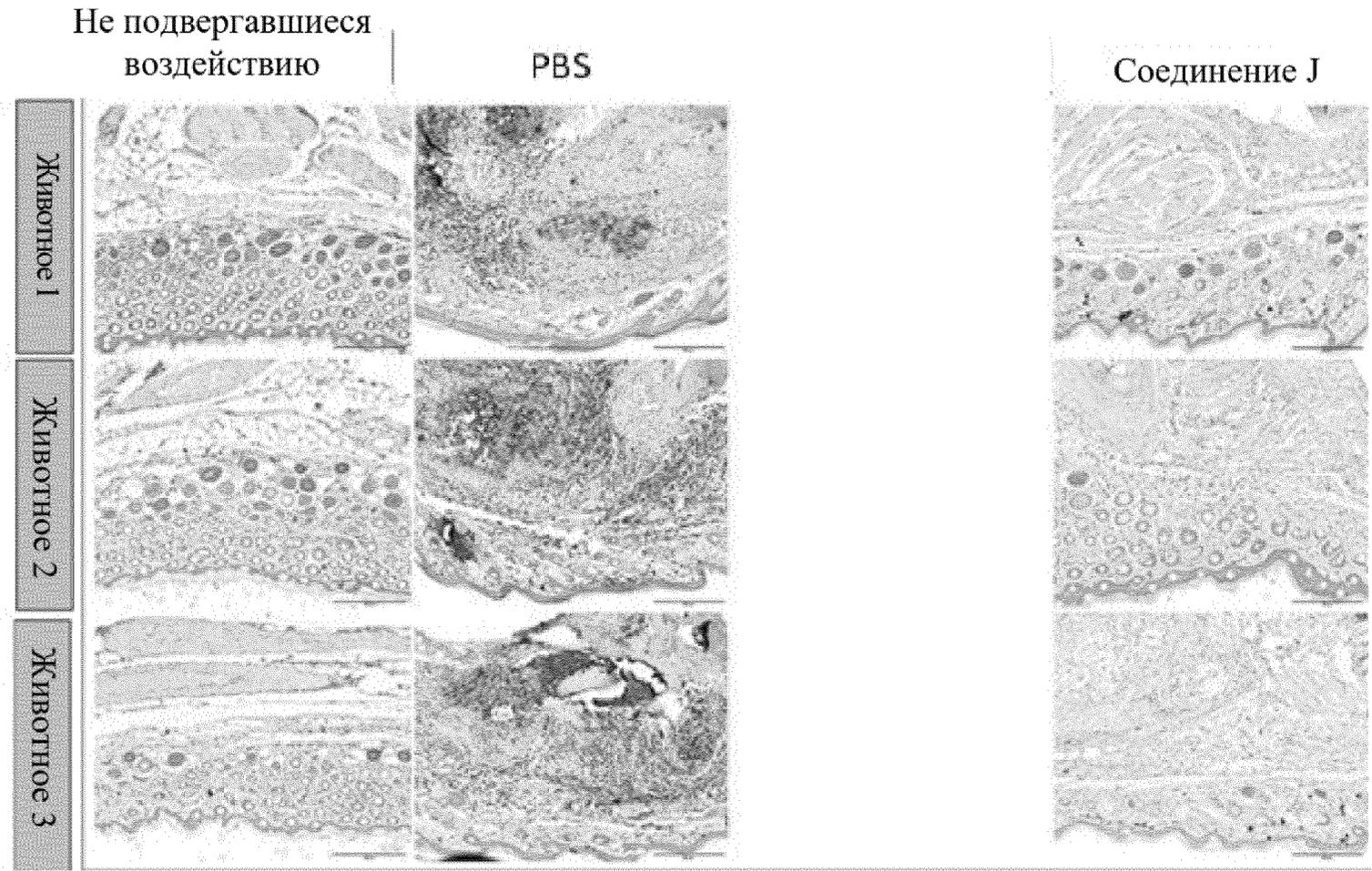
- ◀ Эрозия хрящевой ткани
- ▶ Инфильтрация мононуклеарными клетками

ФИГ. 19



КОНФИД

ФИГ. 20



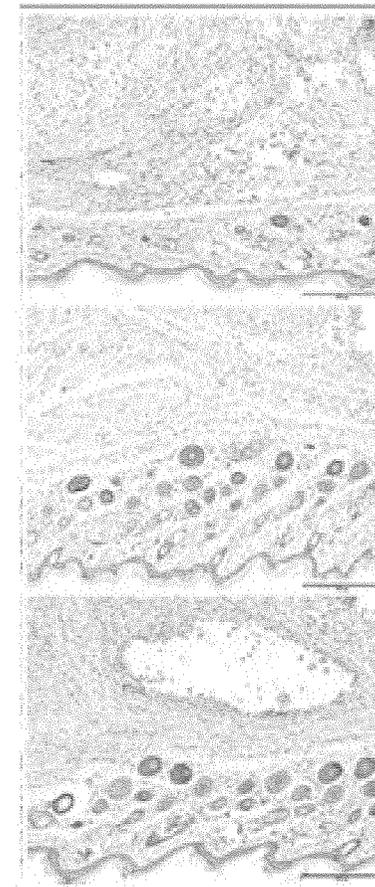
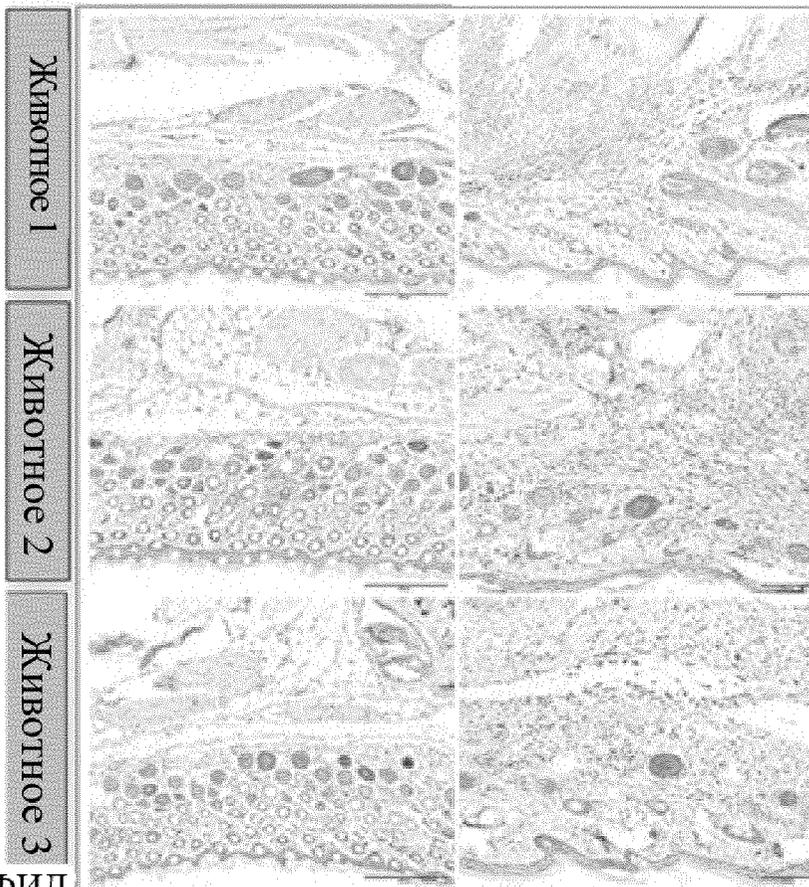
Масштабная метка = 200 мкм

ФИГ. 21

Не подвергавшиеся
воздействию

PBS

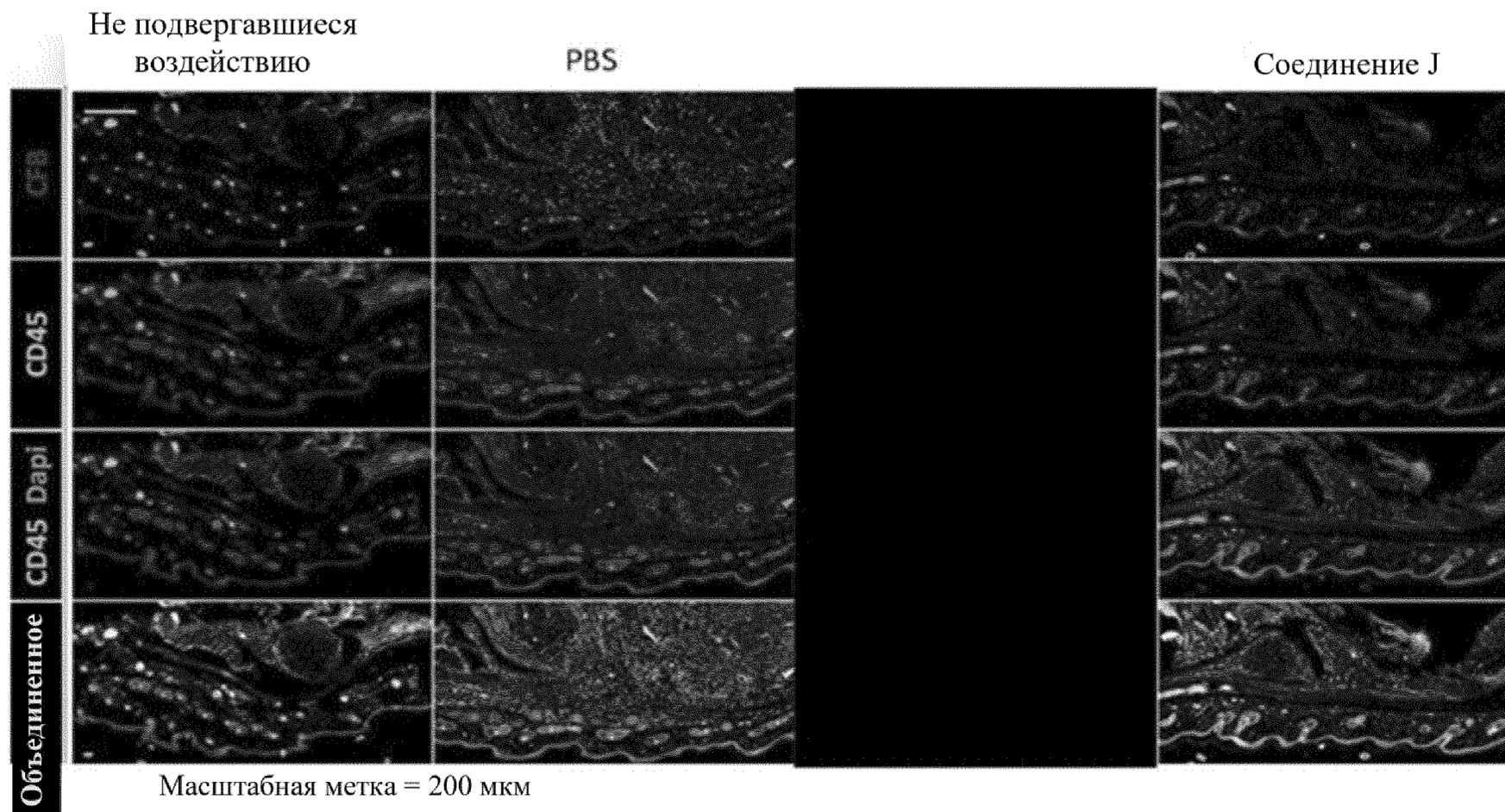
Соединение J



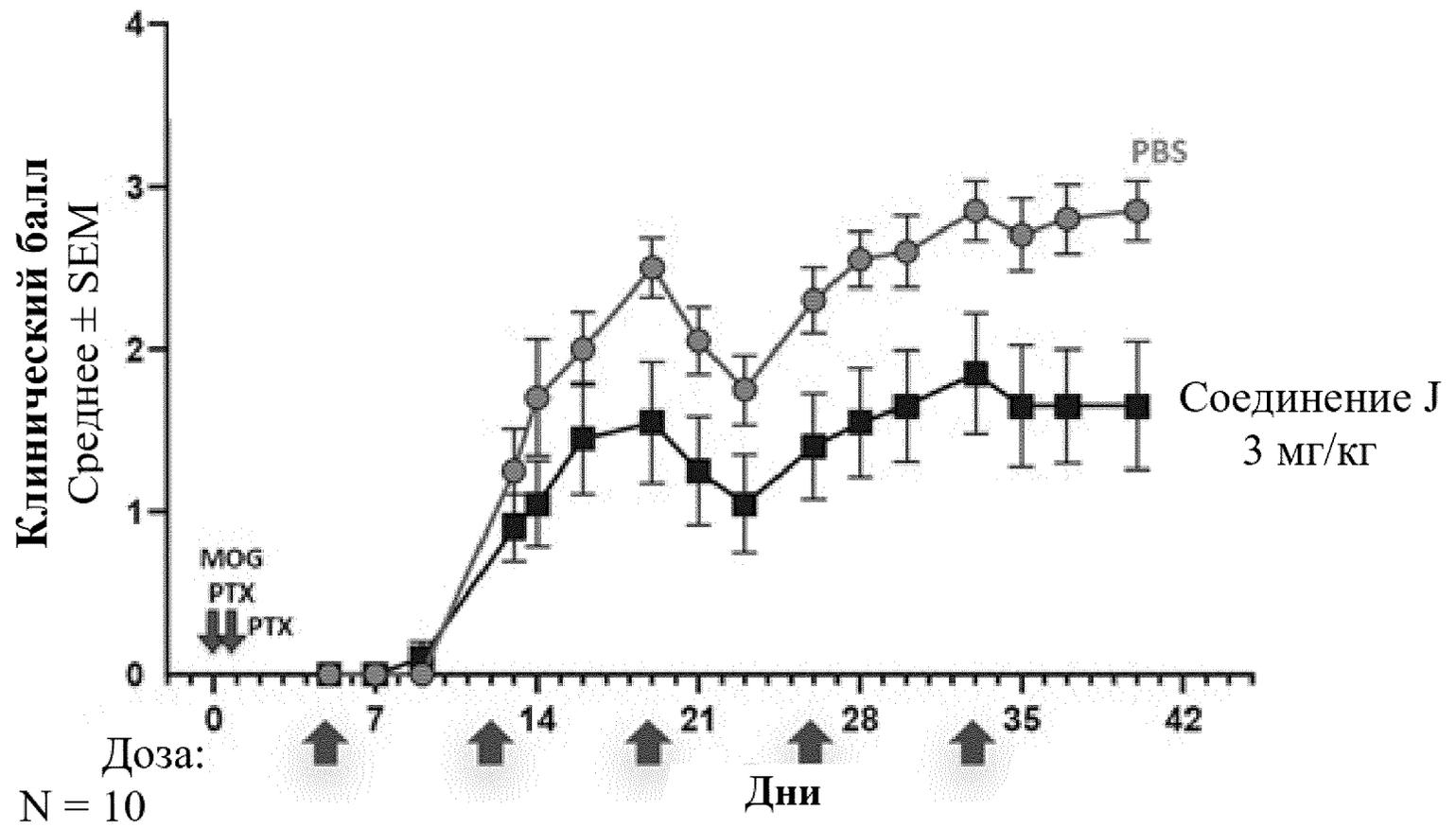
КОНФИД

Масштабная метка = 200 мкм

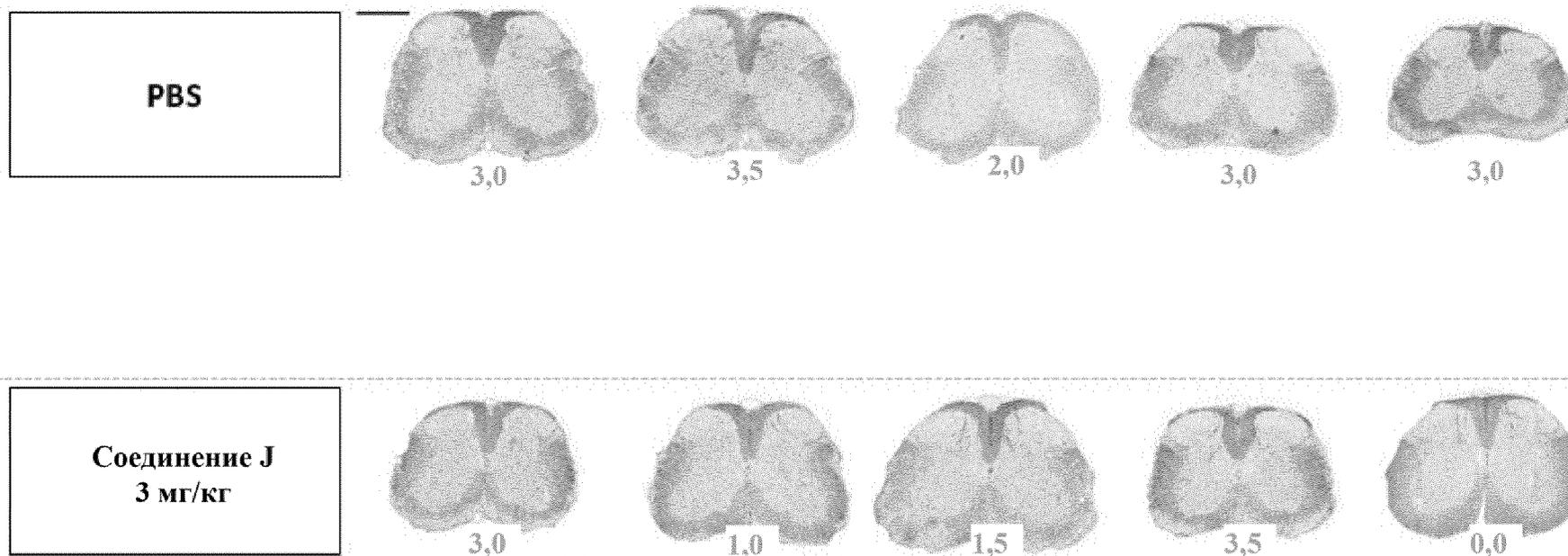
ФИГ. 22



ФИГ. 23



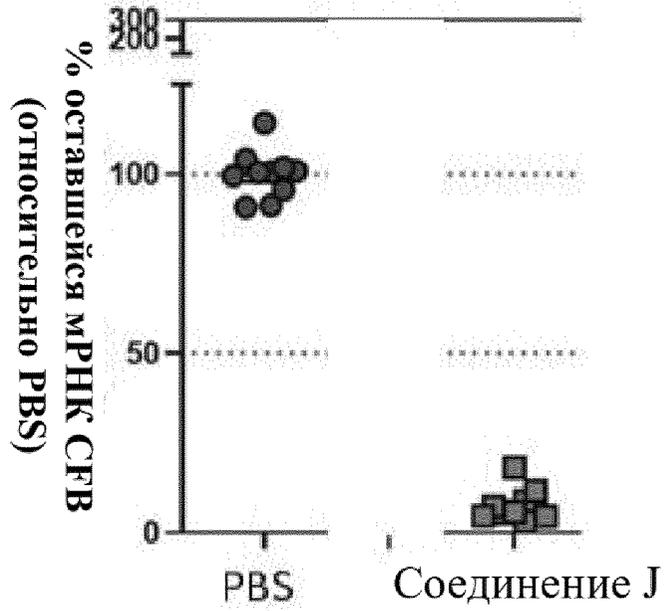
ФИГ. 24



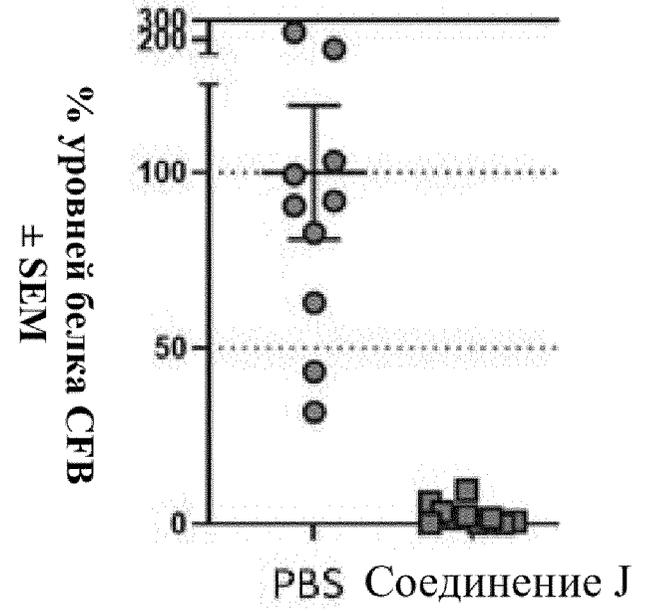
Масштабная метка = 500 мкм

Число представляет клинический балл в конечный момент времени

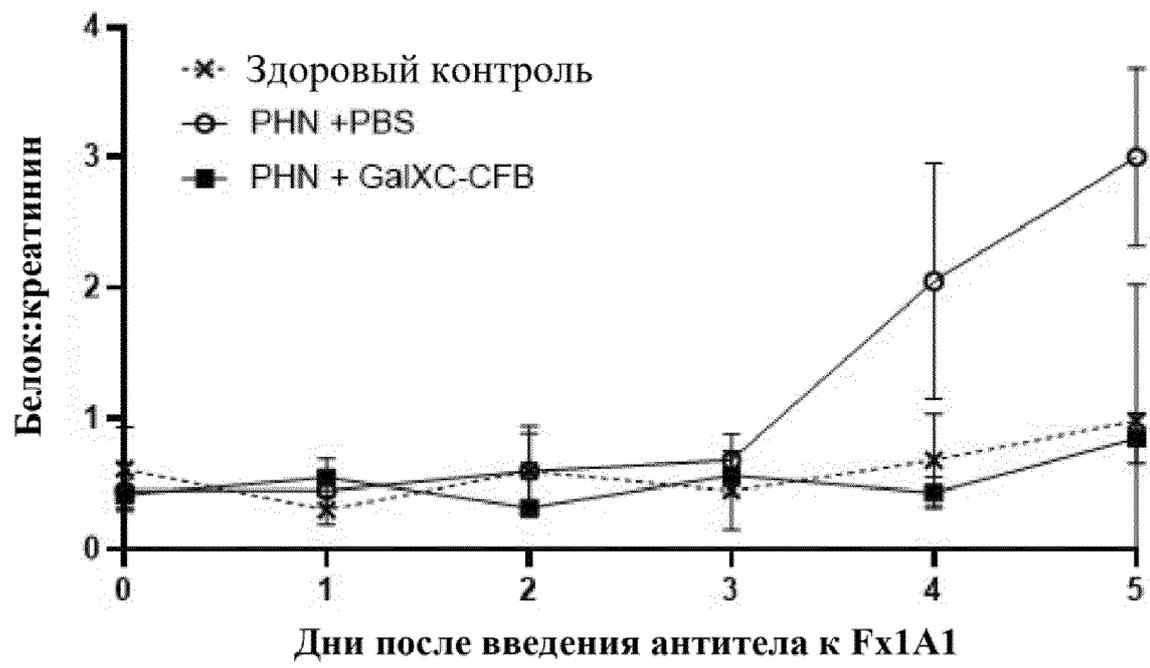
ФИГ. 25А



ФИГ. 25В



ФИГ. 26



ФИГ. 27

