

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490844** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2024.05.24**

(22) Дата подачи заявки  
**2022.09.29**

(51) Int. Cl. *A61K 31/70* (2006.01)  
*A61K 31/7088* (2006.01)  
*A61K 31/713* (2006.01)  
*A61K 47/50* (2017.01)  
*A61K 47/51* (2017.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*A61K 31/00* (2006.01)  
*A61K 47/00* (2006.01)

---

(54) **КОНЬЮГИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ**

---

(31) **63/250,135; 63/340,130**

(32) **2021.09.29; 2022.05.10**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/077301**

(87) **WO 2023/056388 2023.04.06**

(71) Заявитель:

**АЙОНИС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US); БАЙСИКЛ ТЭКС  
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:

**Сет Пунит П., Остергард Майкл,  
Каррер Мишель, Тановитц Майкл  
(US), Ригби Майкл, Скиннер Майкл,  
Стэнвей Стивен, Урбонас Людвикас,  
Ван Ритсотен Катерине (GB)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) В данном документе представлены олигомерные соединения, содержащие бициклический лиганд и модифицированный олигонуклеотид. Это соединение может содержать бициклический лиганд в качестве фрагмента, нацеленного на клетку, и может также содержать конъюгирующий линкер для соединения бициклического лиганда и модифицированного олигонуклеотида. Это соединение можно использовать в сочетании с фармацевтически приемлемой солью.

**A1**

**202490844**

**202490844**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580697EA/061

### КОНЬЮГИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

#### Перечень последовательностей

Настоящая заявка подается вместе с Перечнем последовательностей в электронном формате. Перечень последовательностей представлен в виде файла под названием СНЕМ0103WOSEQ.xml, созданного 29 сентября 2022 г., размер которого составляет 3314 КБ. Информация в электронном формате перечня последовательностей включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

#### Область техники

В настоящих вариантах осуществления предложены соединения и способы нацеливания на представляющие интерес клетки посредством олигонуклеотида.

#### Уровень техники

Было показано, что олигомерные соединения, такие как миРНК и одноцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды (АСО), полезны для регулирования экспрессии генов и доказали свою терапевтическую эффективность. Определенные химические модификации олигомерных соединений могут улучшить активность, эффективность и уменьшить нежелательные побочные эффекты олигомерных соединений, позволяя вводить более низкие дозы, снижая вероятность токсичности и снижая общую стоимость терапии. Олигомерные соединения можно модифицировать с помощью конъюгирующей группы, например, лиганда для рецептора, экспрессируемого на представляющей интерес клетке, что приводит к нацеливанию олигомерного соединения на одну или более представляющих интерес тканей.

Рецептор трансферрина 1 типа (TfR1), также известный как CD71, представляет собой трансмембранный гликопротеин, который связывается с железосвязанным трансферрином и интернализует его путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Конъюгаты антитело-лекарственное средство с антителом против TfR1 использовались для доставки лекарственных средств в различные ткани, включая ЦНС и мышцы.

Циклические пептиды способны с высокой аффинностью и специфичностью связываться с белками-мишенями и, следовательно, представляют собой привлекательный класс молекул для разработки терапевтических средств. Фактически, несколько циклических пептидов уже успешно используются в клинической практике, например, антибактериальный пептид ванкомицин, иммунодепрессант циклоспорин или противораковое лекарственное средство октреотид (Driggers et al. (2008), Nat. Rev. Drug. Discov. 7(7), 608-24). Хорошие свойства связывания обусловлены относительно большой поверхностью взаимодействия, образующейся между пептидом и мишенью, а также пониженной конформационной гибкостью циклических структур. Обычно макроциклы связываются с поверхностями площадью в несколько сотен квадратных ангстрем, как, например, антагонист циклического пептида CXCR4 CVX15 (400 Å<sup>2</sup>; Wu et al. (2007), Science 330, 1066-71), циклический пептид с мотивом Arg-Gly-Asp, связывающийся с

интегрином  $\alpha V\beta 3$  (355 Å<sup>2</sup>) (Xiong et al. (2002), Science 296(5565), 151-5) или циклический пептидный ингибитор уапина-1, связывающийся с активатором плазминогена урокиназного типа (603 Å<sup>2</sup>; Zhao et al. (2007), J. Struct. Biol. 160(1), 1-10).

Из-за своей циклической конфигурации пептидные макроциклы менее гибки, чем линейные пептиды, что приводит к меньшей потере энтропии при связывании с мишенями и приводит к более высокой аффинности связывания. Сниженная гибкость также приводит к блокировке специфичных для мишени конформаций, увеличивая специфичность связывания по сравнению с линейными пептидами. Этот эффект был проиллюстрирован мощным и селективным ингибитором матриксной металлопротеиназы 8 (ММР-8), который терял свою селективность по сравнению с другими ММР, когда его кольцо было раскрыто (Cherney et al. (1998), J. Med. Chem. 41(11), 1749-51). Благоприятные связывающие свойства, достигаемые за счет макроциклизации, еще более выражены у мультициклических пептидов, имеющих более одного пептидного кольца, как, например, у ванкомицина, низина и актиномицина.

Различные исследовательские группы ранее связывали полипептиды с остатками цистеина с синтетической молекулярной структурой (Kemp and McNamara (1985), J. Org. Chem; Timmerman et al. (2005), ChemBioChem). Meloen и его коллеги использовали трис(бромметил)бензол и родственные ему молекулы для быстрой и количественной циклизации множества пептидных петель на синтетических каркасах для структурной имитации поверхностей белков (Timmerman et al. (2005), ChemBioChem). Способы получения соединений-кандидатов в лекарственные средства, в которых указанные соединения получают путем связывания цистеинсодержащих полипептидов с молекулярным каркасом, таким как, например, 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА) (Heinis et al.(2014) Angewandte Chemie, International Edition 53(6) 1602-1606).

Были разработаны комбинаторные подходы на основе фагового дисплея для создания и скрининга больших библиотек бициклических пептидов на представляющие интерес мишени (Heinis et al. (2009), Nat. Chem. Biol. 5(7), 502-7 и WO 2009/098450). Вкратце, комбинаторные библиотеки линейных пептидов, содержащих три остатка цистеина и две области шести случайных аминокислот (Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys-(Xaa)<sub>6</sub>-Cys), были экспонированы на фаге и циклизованы путем ковалентного связывания боковых цепей цистеина с каркасом из малых молекул.

### **Сущность изобретения**

Представленные в данном документе варианты осуществления относятся к олигомерным соединениям, которые содержат олигонуклеотид и конъюгирующую группу. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит фрагмент, нацеленный на клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа включает конъюгирующий линкер, который присоединяет фрагмент, нацеленный на клетку, к олигонуклеотиду. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетку, содержит или состоит из

полипептида, содержащего две полипептидные петли, прикрепленные к молекулярному каркасу. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетки, содержит или состоит из бициклического лиганда. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер связывает олигонуклеотид с полипептидом. В общем, линкеры-конъюгаты имеют достаточную длину и/или структуру для разделения олигонуклеотида и бициклического лиганда, так что бициклический лиганд не ингибирует активность олигонуклеотида (например, антисмысловую активность), а олигонуклеотид не ингибирует активность бициклического лиганда (например, связывание рецептора трансферрина).

### **Подробное описание**

Следует понимать, что как предшествующее общее описание, так и последующее подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают заявленные варианты осуществления. В данном документе использование единственного числа включает множественное число, если специально не указано иное. При использовании в данном документе, использование «или» означает «и/или», если не указано иное. Кроме того, в контексте данного изобретения термин «включающий», а также другие формы, например, «включает» и «включенный», не является ограничивающим.

Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничение описываемого объекта изобретения. Все документы или части документов, цитируемые в данной заявке, включая, но не ограничиваясь этим, патенты, заявки на патенты, статьи, книги, монографии, а также записи эталонных последовательностей GenBank, NCBI и ENSEMBL, явно включены в данный документ путем ссылки на эти части обсуждаемого в данной заявке документа, а также в целом.

Понятно, что последовательность, представленная в каждой SEQ ID № олигонуклеотида в примерах, содержащихся в данном документе, не зависит от какой-либо модификации сахарного фрагмента, межнуклеозидной связи или нуклеинового основания. По существу, олигонуклеотиды, определенные SEQ ID №, могут независимо содержать одну или более модификаций фрагмента сахара, межнуклеозидной связи или нуклеинового основания.

Понятно, что во всем описании первая буква в пептидной последовательности представляет собой первую аминокислоту пептида на N-конце, а последняя буква в пептидной последовательности представляет собой последнюю аминокислоту пептида на C-конце, если не указано иное.

### *Определения*

Если не представлены конкретные определения, номенклатура, применяемая в связи с этим, а также процедуры и технологии аналитической, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, являются хорошо известными и общепринятыми в данной области техники. Если это разрешено, все патенты, заявки, опубликованные заявки и другие публикации, а также

другие данные, упомянутые в описании, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Если не указано иное, следующие термины имеют следующие значения:

При использовании в данном документе, «2'-дезоксинуклеозид» означает нуклеозид, содержащий фрагмент 2'-Н(Н)-дезоксифуранозильного сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-дезоксинуклеозид представляет собой 2'-β-D-дезоксинуклеозид и содержит фрагмент 2'-β-D-деоксирибозильного сахара, который имеет β-D рибозильную конфигурацию, обнаруженную в встречающихся в природе дезоксирибонуклеиновых кислотах (ДНК). В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-дезоксинуклеозид может содержать модифицированное нуклеиновое основание или может содержать нуклеиновое основание РНК (урацил).

При использовании в данном документе, «2'-МОЕ» означает группу 2'-ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>ОСН<sub>3</sub> вместо 2'-ОН группы фуранозильного сахарного фрагмента. «Фрагмент 2'-МОЕ сахара» означает фрагмент сахара с группой 2'-ОСН<sub>2</sub>СН<sub>2</sub>ОСН<sub>3</sub> вместо 2'-ОН группы фрагмента фуранозильного сахара. Если не указано иное, фрагмент 2'-МОЕ сахара находится в β-D-рибозильной конфигурации. «МОЕ» означает О-метоксиэтил.

При использовании в данном документе, термин «2'-МОЕ нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий фрагмент 2'-МОЕ сахара.

При использовании в данном документе «2'-ОМе» означает группу 2'-ОСН<sub>3</sub> вместо группы 2'-ОН фуранозильного фрагмента сахара. «Фрагмент 2'-О-метилсахара» или «фрагмент 2'-ОМе сахара» означает фрагмент сахара с группой 2'-ОСН<sub>3</sub> вместо 2'-ОН группы фуранозильного фрагмента сахара. Если не указано иное, фрагмент 2'-ОМе сахара находится в β-D-рибозильной конфигурации.

При использовании в данном документе, термин «2'-ОМе нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий фрагмент 2'-ОМе сахара.

При использовании в данном документе «2'-F» означает группу 2'-F вместо группы 2'-ОН фуранозильного фрагмента сахара. «Фрагмент 2'-фторсахара» или «фрагмент 2'-F сахара» означает фрагмент сахара с группой 2'-F вместо 2'-ОН группы фуранозильного фрагмента сахара. Если не указано иное, фрагмент 2'-F сахара находится в β-D-рибозильной конфигурации.

При использовании в данном документе, термин «2'-F нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий фрагмент 2'-F сахара.

При использовании в данном документе, «2'-NMA» означает группу -О-СН<sub>2</sub>-C(=O)-NH-СН<sub>3</sub> вместо группы 2'-ОН фрагмента рибозильного сахара. «Фрагмент 2'-NMA сахара» представляет собой фрагмент сахара с группой 2'-О-СН<sub>2</sub>-C(=O)-NH-СН<sub>3</sub> вместо 2'-ОН группы фрагмента рибозильного сахара. Если не указано иное, фрагмент 2'-NMA сахара находится в β-D-конфигурации. «NMA» означает О-N-метилацетамид.

При использовании в данном документе, термин «2'-NMA нуклеозид» означает нуклеозид, содержащий фрагмент 2'-NMA сахара.

При использовании в данном документе, термин «2'-замещенный нуклеозид»

означает нуклеозид, содержащий фрагмент 2'-замещенного сахара. При использовании в данном документе, «2'-замещенный» по отношению к фрагменту сахара означает фрагмент сахара, содержащий по меньшей мере одну группу 2'-заместителя, отличную от Н или ОН.

При использовании в данном документе, «5-метилцитозин» означает цитозин, модифицированный метильной группой, присоединенной к 5-положению. 5-метилцитозин представляет собой модифицированное нуклеиновое основание.

При использовании в данном документе, «введение» означает предоставление субъекту олигомерного агента или фармацевтической композиции.

При использовании в данном документе, «алифатическая аминокислота» представляет собой аминокислоту, имеющую боковую цепь, состоящую из Н и С. Алифатические аминокислоты включают, но не ограничиваясь этим, глицин, аланин, лейцин, изолейцин, валин, бета-аланин, 2-аминоизомасляную кислоту.

При использовании в данном документе, термин «аминокислота» представляет собой соединение или мономерную субъединицу полипептида, имеющую аминогруппу, карбоксилатную группу и по меньшей мере один атом углерода, ковалентно связанный с аминогруппой и карбоксилатной группой, который содержит необязательную боковую цепь. « $\alpha$ -аминокислота» содержит ровно один атом углерода между аминогруппой и карбоксилатной группой, которая несет необязательную боковую цепь. « $\beta$ -аминокислота» содержит ровно два необязательно замещенных атома углерода между аминогруппой и карбоксилатной группой.

При использовании в данном документе, термин «аналог аминокислоты» представляет собой соединение или мономерную субъединицу пептидомиметика, имеющую заместитель аминогруппы, заместитель карбоксилатной группы и по меньшей мере один атом углерода, ковалентно связанный с заместителем аминогруппы и заместителем карбоксилатной группы, который содержит необязательную боковую цепь.

При использовании в данном документе, термин «ароматическая аминокислота» представляет собой аминокислоту, имеющую ароматическое кольцо в боковой цепи. Ароматические аминокислоты включают, но не ограничиваясь этим, фенилаланин, тирозин и триптофан.

При использовании в данном документе, «бициклический лиганд» означает лиганд, содержащий полипептид или пептидомиметик, ковалентно связанный с молекулярным каркасом в трех различных сайтах, образуя две полипептидные петли. Как правило, такие пептиды или пептидомиметики содержат полипептид, содержащий природные или неприродные аминокислоты или аналоги аминокислот, включая первую, вторую и третью аминокислоты, содержащие реакционноспособные группы, которые образуют ковалентные связи с каркасом. В некоторых вариантах осуществления изобретения пептиды или пептидомиметики содержат по меньшей мере три остатка цистеина (называемых в данном документе  $C_i$ ,  $C_{ii}$  и  $C_{iii}$ ), которые представляют собой реакционноспособные группы. При использовании в данном документе, «петлевой полипептид» относится к части бициклического лиганда, которая образует две полипептидные петли, включая

реакционноспособные группы, но исключая любые N-концевые или C-концевые удлинения. При использовании в данном документе, «петлевые последовательности» относятся к аминокислотам или аналогам аминокислот между реакционноспособными группами.

При использовании в данном документе, «бициклический нуклеозид» или «BNA» означает нуклеозид, содержащий фрагмент бициклического сахара.

При использовании в данном документе, «бициклический сахар» или «группа бициклического сахара» означает модифицированную группу сахара, содержащую два кольца, причем второе кольцо образовано посредством мостика, соединяющего два атома в первом кольце, образуя тем самым бициклическую структуру. В некоторых вариантах осуществления изобретения первое кольцо бициклического сахарного фрагмента представляет собой фуранозильный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент бициклического сахара не содержит фуранозильный фрагмент.

При использовании в данном документе, «группа, нацеленная на клетку» означает конъюгирующую группу или часть конъюгирующей группы, которая способна связываться с конкретным типом клеток или конкретными типами клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетку, способен связывать рецептор клеточной поверхности или фрагмент клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетку, способен интернализироваться, когда он взаимодействует с или связывает рецептор клеточной поверхности или фрагмент клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетки, содержит бициклический полипептид или бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетки, состоит из бициклического полипептида или бициклического лиганда.

При использовании в данном документе, «фрагмент клеточной поверхности» означает фрагмент, присутствующий на поверхности клетки, который доступен для взаимодействия с веществом, внешним по отношению к клетке. В некоторых вариантах осуществления часть фрагмента клеточной поверхности является неотъемлемой частью клеточной мембраны клетки. Неограничивающими примерами фрагментов клеточной поверхности являются липиды, белки и углеводы. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент клеточной поверхности представляет собой рецептор клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор клеточной поверхности представляет собой рецептор трансферрина.

При использовании в данном документе, «рецептор клеточной поверхности» означает белковый рецептор, экспрессируемый на поверхности клетки, который доступен для взаимодействия с соответствующим лигандом. Лиганд может быть эндогенным или экзогенным. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор клеточной поверхности представляет собой рецептор трансферрина.

При использовании в данном документе, «заряженная аминокислота» представляет собой аминокислоту, имеющую боковую цепь, которая содержит положительный заряд или

отрицательный заряд в растворе при  $pH=7,0$ . «Основная аминокислота» имеет боковую цепь, которая содержит положительный заряд в растворе при  $pH=7,0$ . Основные аминокислоты включают, но не ограничиваясь ими, лизин, аргинин и орнитин. «Кислая аминокислота» имеет боковую цепь, которая содержит отрицательный заряд в растворе при  $pH=7,0$ . Кислые аминокислоты включают, но не ограничиваясь ими, глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту.

При использовании в данном документе, «хирально обогащенная популяция» означает множество молекул с идентичной молекулярной формулой, при этом количество или процент молекул в популяции, которые содержат определенную стереохимическую конфигурацию в конкретном хиральном центре, больше, чем количество или процент молекул, которые, как ожидается, содержат одну и ту же конкретную стереохимическую конфигурацию в одном и том же конкретном хиральном центре в популяции, если конкретный хиральный центр был стереослучайным. Хирально обогащенные популяции молекул, имеющие множество хиральных центров в каждой молекуле, могут содержать один или более стереослучайных хиральных центров. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы представляют собой олигомерные соединения, раскрытые в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения представляют собой антисмысловые соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы представляют собой модифицированные олигонуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулы представляют собой олигомерные соединения, содержащие модифицированные олигонуклеотиды.

При использовании в данном документе, «расщепляемый фрагмент» означает связь или группу атомов, которая расщепляется в физиологических условиях, например, внутри клетки или субъекта.

При использовании в данном документе, «комплементарный» по отношению к олигонуклеотиду означает, что по меньшей мере 70% нуклеиновых оснований олигонуклеотида и нуклеиновых оснований другой нуклеиновой кислоты или одной или более ее областей способны образовывать водородные связи друг с другом, когда последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида и другая нуклеиновая кислота ориентированы в противоположных направлениях. «Комплементарная область» по отношению к области олигонуклеотида означает, что по меньшей мере 70% нуклеиновых оснований этой области и нуклеиновых оснований другой нуклеиновой кислоты или одной или нескольких ее областей способны образовывать водородные связи друг с другом, когда последовательность нуклеиновых оснований олигонуклеотида и другая нуклеиновая кислота ориентированы в противоположных направлениях. Комплементарные нуклеиновые основания означают нуклеиновые основания, способные образовывать водородные связи друг с другом. Дополнительные пары нуклеиновых оснований включают аденин (A) и тимин (T), аденин (A) и урацил (U), цитозин (C) и гуанин (G), 5-метилцитозин (mC) и гуанин (G). Определенные модифицированные нуклеиновые основания, которые



спариваются с природными нуклеиновыми основаниями или с другими модифицированными нуклеиновыми основаниями, известны в данной области техники и не считаются комплементарными нуклеиновыми основаниями, как определено в данном документе, если не указано иное. Например, инозин может спариваться с аденозином, цитозином или урацилом, но не считается комплементарным. Комплементарные олигонуклеотиды и/или нуклеиновые кислоты не обязательно должны иметь комплементарность нуклеиновых оснований по каждому нуклеозиду. Скорее, допускаются некоторые несоответствия. При использовании в данном документе, «полностью комплементарный» или «комплементарный на 100%» по отношению к олигонуклеотидам означает, что олигонуклеотиды комплементарны другому олигонуклеотиду или нуклеиновой кислоте по каждому нуклеозиду олигонуклеотида.

При использовании в данном документе, «конъюгирующая группа» означает группу атомов, которая непосредственно присоединена к олигонуклеотиду. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа включает конъюгирующий фрагмент и конъюгирующий линкер, который присоединяет конъюгирующий фрагмент к олигонуклеотиду. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит бициклический лиганд.

При использовании в данном документе, «конъюгирующий линкер» означает одинарную связь или группу атомов, содержащую по меньшей мере одну связь, которая соединяет конъюгирующий фрагмент с олигонуклеотидом.

При использовании в данном документе, «конъюгирующий фрагмент» означает группу атомов, которая присоединена к олигонуклеотиду через конъюгирующий линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит фрагмент, нацеленный на клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетки, содержит или состоит из бициклического лиганда. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетку, содержит или состоит из бициклического полипептида.

При использовании в данном документе, «смежный» в контексте олигонуклеотида относится к нуклеозидам, нуклеиновым основаниям, фрагментам сахаров или межнуклеозидным связям, которые непосредственно примыкают друг к другу. Например, «смежные нуклеиновые основания» означают нуклеиновые основания, которые непосредственно примыкают друг к другу в последовательности.

При использовании в данном документе, «циклическая аминокислота» представляет собой аминокислоту, боковая цепь которой соединяется с амидом основной цепи с образованием циклической структуры. «Циклическая аминокислота» включает, но не ограничиваясь этим, пролин или гидроксипролин.

При использовании в данном документе, «гэпмер» означает модифицированный олигонуклеотид, содержащий внутреннюю область, содержащую множество нуклеозидов, которые поддерживают расщепление РНКазой H, расположенную между внешними областями, содержащими один или более нуклеозидов, причем нуклеозиды, составляющие

внутреннюю область, химически отличаются от нуклеозида или нуклеозидов, составляющих внешние области. Внутреннюю область можно назвать «гэпом», а внешние области можно назвать «крыльями». Если не указано иное, «гэпмер» относится к мотиву сахара. Если не указано иное, фрагмент сахара каждого нуклеозида гэпа представляет собой 2'-β-D-дезоксирибозильный фрагмент сахара. Таким образом, в качестве примера, термин «гэпмер МОЕ» обозначает гэпмер, имеющий гэп, содержащий 2'-β-D-дезоксинуклеозиды, и крылья, содержащие 2'-МОЕ нуклеозиды. Если не указано иное, гэпмер МОЕ может содержать одну или более модифицированных межнуклеозидных связей и/или модифицированных нуклеиновых оснований, и такие модификации не обязательно соответствуют структуре гэпмеров модификаций сахара.

При использовании в данном документе, «гибридизация» означает отжиг олигонуклеотидов и/или нуклеиновых кислот. Хотя это не ограничивается конкретным механизмом, наиболее распространенный механизм гибридизации включает водородную связь, которая может быть связью Уотсона-Крика, Хугстина или обратной водородной связью Хугстина между комплементарными нуклеиновыми основаниями. В некоторых вариантах осуществления изобретения комплементарные молекулы нуклеиновой кислоты включают, но не ограничиваясь этим, антисмысловое соединение и нуклеиновую кислоту-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения комплементарные молекулы нуклеиновой кислоты включают, но не ограничиваясь этим, олигонуклеотид и нуклеиновую кислоту-мишень.

При использовании в данном документе, «идентичный» или «процент идентичности» в отношении аминокислотной последовательности означает процент аминокислот, которые идентичны между двумя аминокислотными последовательностями, когда аминокислотные последовательности выровнены для максимального подобия. «Идентичный» означает, что каждый атом аминокислоты является одним и тем же; то есть аминокислоты с заменами или модификациями не считаются «идентичными» аминокислотами.

При использовании в данном документе, термин «межнуклеозидная связь» представляет собой ковалентную связь между соседними нуклеозидами в олигонуклеотиде. При использовании в данном документе, «модифицированная межнуклеозидная связь» означает любую межнуклеозидную связь, отличную от фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. «Фосфоротиоатная межнуклеозидная связь» представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь, в которой один из немостиковых атомов кислорода фосфодиэфирной межнуклеозидной связи заменен атомом серы.

При использовании в данном документе «небициклический модифицированный фрагмент сахара» означает модифицированный фрагмент сахара, который содержит модификацию, такую как заместитель, который не образует мостик между двумя атомами сахара с образованием второго кольца.

При использовании в данном документе, «N-концевая модификация» или «С-концевая модификация» означает терминальную непептидную химическую модификацию

бициклического лиганда на любой стороне полипептида, такую как ацилирование или амидирование, и которая не становится частью конъюгирующего линкера.

При использовании в данном документе «N-концевое удлинение» или «C-концевое удлинение» означает непептидную химическую модификацию бициклического лиганда на любой стороне полипептида, которая находится между концом полипептида бициклического лиганда и функциональной группой, которая становится частью конъюгирующего линкера при конъюгации с олигонуклеотидом.

При использовании в данном документе, «несоответствие» или «некомплементарный» означает нуклеиновое основание первого олигонуклеотида, которое не комплементарно соответствующему нуклеиновому основанию второго олигонуклеотида или нуклеиновой кислоте-мишени, когда первый и второй олигонуклеотиды выровнены.

При использовании в данном документе, «мотив» означает структуру немодифицированных и/или модифицированных фрагментов сахаров, нуклеиновых оснований и/или межнуклеозидных связей в олигонуклеотиде.

При использовании в данном документе, «природная аминокислота» означает Gly или L-изомер каждого из следующих веществ: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Lys, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val.

При использовании в данном документе, «нейтральная аминокислота» представляет собой аминокислоту, имеющую боковую цепь, которая не содержит положительный заряд или отрицательный заряд в растворе при pH=7,0. Нейтральные аминокислоты включают, но не ограничиваясь ими, глицин, аланин, лейцин, изолейцин, валин, серин, цистеин, метионин, пролин, треонин, тирозин, фенилаланин, триптофан, бета-аланин и 2-аминоизомасляную кислоту.

При использовании в данном документе, «неприродная аминокислота» означает любую аминокислоту, отличную от стандартных двадцати аминокислот, кодируемых генетическим кодом человека, включая D-изомеры каждого из следующих: Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Lys, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val.

При использовании в данном документе, «нуклеиновое основание» означает немодифицированное нуклеиновое основание или модифицированное нуклеиновое основание. Нуклеиновое основание представляет собой гетероциклический фрагмент. При использовании в данном документе, «немодифицированное нуклеиновое основание» представляет собой аденин (A), тимин (T), цитозин (C), урацил (U) или гуанин (G). При использовании в данном документе, «модифицированное нуклеиновое основание» представляет собой группу атомов, отличных от немодифицированных A, T, C, U или G, способных образовывать пары с по меньшей мере одним другим нуклеиновым основанием. «5-метилцитозин» представляет собой модифицированное нуклеиновое основание. Универсальное основание представляет собой модифицированное нуклеиновое основание, которое может образовывать пары с любым из пяти немодифицированных нуклеиновых оснований.

При использовании в данном документе, «последовательность нуклеиновых

оснований» означает порядок смежных нуклеиновых оснований в нуклеиновой кислоте или олигонуклеотиде независимо от какой-либо модификации сахара или межнуклеозидной связи.

При использовании в данном документе, «нуклеозид» означает соединение или фрагмент соединения, включающий нуклеиновое основание и сахарный фрагмент. Нуклеиновое основание и сахарный фрагмент независимо друг от друга являются немодифицированными или модифицированными.

При использовании в данном документе, «молекулярный каркас» означает химическую группу, которая образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида с образованием по меньшей мере двух полипептидных петель, соединенных молекулярным каркасом. В некоторых вариантах осуществления молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА). В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трис(2-бромэтанон) (ТАТВ).

При использовании в данном документе, «олигомерный агент» означает олигомерное соединение и необязательно один или более дополнительных признаков, таких как второе олигомерное соединение. Олигомерный агент может представлять собой одноцепочечное олигомерное соединение или может представлять собой олигомерный дуплекс, образованный двумя комплементарными олигомерными соединениями.

При использовании в данном документе, «олигомерное соединение» означает олигонуклеотид и необязательно один или несколько дополнительных признаков, таких как конъюгирующая группа или концевая группа. Олигомерное соединение может быть спарено со вторым олигомерным соединением, которое комплементарно первому олигомерному соединению, или может быть неспаренным. «Одноцепочечное олигомерное соединение» представляет собой неспаренное олигомерное соединение.

Термин «олигомерный дуплекс» означает дуплекс, образованный двумя олигомерными соединениями, имеющими комплементарные последовательности нуклеиновых оснований.

При использовании в данном документе, «олигонуклеотид» означает цепь связанных нуклеозидов, соединенных межнуклеозидными связями, причем каждая нуклеозидная и межнуклеозидная связь независимо может быть модифицированной или немодифицированной. Если не указано иное, олигонуклеотиды состоят из 8-50 связанных нуклеозидов. При использовании в данном документе, «модифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, в котором модифицирована по меньшей мере одна нуклеозидная или межнуклеозидная связь. При использовании в данном документе, «немодифицированный олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, который не содержит каких-либо нуклеозидных модификаций или межнуклеозидных модификаций.

При использовании в данном документе, «полипептид» или «пептид» означает соединение или фрагмент соединения, состоящий из 3 или более аминокислот, связанных между собой амидными связями. Если не указано иное, полипептиды состоят из 3-50

аминокислот.

При использовании в данном документе, «пептидомиметик» означает соединение или фрагмент соединения, состоящий из 3 или более аминокислот или аналогов аминокислот, связанных вместе, причем по меньшей мере две субъединицы связаны связью, которая не является амидной связью. Если не указано иное, пептидные аналоги состоят из 3-50 аминокислот или аналогов аминокислот.

При использовании в данном документе, «фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель» означает любое вещество, подходящее для применения при введении субъекту. Некоторые такие носители позволяют составлять фармацевтические композиции в виде, например, таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и пастилок для перорального приема субъектом. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель представляет собой стерильную воду, дистиллированную воду для инъекций, стерильный физиологический раствор, стерильный буферный раствор или стерильную искусственную спинномозговую жидкость.

При использовании в данном документе, «фармацевтически приемлемая соль(и)» означает физиологически и фармацевтически приемлемую соль(и) олигомерных соединений. Фармацевтически приемлемые соли сохраняют желаемую биологическую активность исходного соединения и не придают ему нежелательных токсикологических эффектов.

При использовании в данном документе, «фармацевтическая композиция» означает смесь веществ, подходящих для введения субъекту. Например, фармацевтическая композиция может содержать олигомерное соединение и стерильный водный раствор. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция проявляет активность в анализе свободного поглощения в определенных клеточных линиях.

При использовании в данном документе, «пролекарство» означает терапевтический агент в первой форме вне организма, который преобразуется во вторую форму внутри субъекта или его клеток. Обычно превращению пролекарства у субъекта способствует действие фермента (например, эндогенного или вирусного фермента) или химических веществ, присутствующих в клетках или тканях, и/или физиологических условий. В некоторых вариантах осуществления изобретения первая форма пролекарства менее активна, чем вторая форма.

При использовании в данном документе, «реакционноспособная группа» означает атом или группу атомов аминокислоты, которые могут образовывать связи с другим соединением, например, другим атомом или группой атомов другой аминокислоты или другого соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения реакционноспособная группа представляет собой атом серы аминокислоты цистеин.

При использовании в данном документе, термин «самокомплементарный» по отношению к олигонуклеотиду означает олигонуклеотид, который по меньшей мере

частично гибридизуется сам с собой.

При использовании в данном документе, «боковая цепь» имеет свое обычное значение в данной области техники и означает подструктуру аминокислоты, которая не присоединяется к амино- и карбоксилатным группам аминокислоты и присоединяется, например, к альфа- или бета-углероду. аминокислоты.

При использовании в данном документе, «стабилизированная фосфатная группа» относится к 5'-химическому фрагменту, который приводит к стабилизации 5'-фосфатного фрагмента 5'-концевого нуклеозида олигонуклеотида по сравнению со стабильностью немодифицированного 5'-фосфата немодифицированного нуклеозида в биологических условиях. Такая стабилизация 5'-фосфатной группы включает, но не ограничиваясь этим, устойчивость к удалению фосфатазами. Стабилизированные фосфатные группы включают, но не ограничиваясь этим, 5'-винилфосфонаты и 5'-циклопропилфосфонат.

При использовании в данном документе, «стереослучайный хиральный центр» в контексте популяции молекул с идентичной молекулярной формулой означает хиральный центр, имеющий случайную стереохимическую конфигурацию. Например, в популяции молекул, содержащих стереослучайный хиральный центр, количество молекул, имеющих (*S*)-конфигурацию стереослучайного хирального центра, может быть, но не обязательно, таким же, как количество молекул, имеющих (*R*)-конфигурацию стереослучайного хирального центра. Стереохимическая конфигурация хирального центра считается случайной, если она является результатом синтетического метода, не предназначенного для контроля стереохимической конфигурации. В некоторых вариантах осуществления изобретения стереослучайный хиральный центр представляет собой стереослучайную фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

При использовании в данном документе, «стандартный клеточный анализ» означает анализ(ы), описанный(ые) в Примерах, и их разумные вариации.

При использовании в данном документе, «субъект» относится к человеку или животному, отличному от человека, включая, но не ограничиваясь этим, мышей, крыс, кроликов, собак, кошек, свиней и приматов, отличных от человека, включая, но не ограничиваясь этим, обезьян и шимпанзе.

При использовании в данном документе, «фрагмент сахара» означает немодифицированный фрагмент сахара или модифицированный фрагмент сахара. При использовании в данном документе, «немодифицированный фрагмент сахара» означает 2'-ОН(Н) рибозильный фрагмент, обнаруженный в РНК («немодифицированный фрагмент сахара РНК»), или 2'-Н(Н)-дезоксирибозильный фрагмент сахара, обнаруженный в ДНК («немодифицированный фрагмент сахара ДНК»). Немодифицированные фрагменты сахаров содержат по одному водороду в каждом из положений 1', 3' и 4', кислород в положении 3' и два атома водорода в положении 5'. При использовании в данном документе, «модифицированный фрагмент сахара» или «модифицированный сахар» означает модифицированный фуранозильный фрагмент сахара или заменитель сахара.

При использовании в данном документе, «заменитель сахара» означает

модифицированный фрагмент сахара, имеющий фрагмент, отличный от фуранозильного, который может связывать нуклеиновое основание с другой группой, такой как межнуклеозидная связь, конъюгирующая группа или концевая группа в олигонуклеотиде. Модифицированные нуклеозиды, содержащие заменители сахаров, могут быть включены в одно или более положений внутри олигонуклеотида, и такие олигонуклеотиды способны гибридизоваться с комплементарными олигомерными соединениями или нуклеиновыми кислотами-мишенями.

При использовании в данном документе, «нуклеиновая кислота-мишень» и «РНК-мишень» означают нуклеиновую кислоту, на воздействие на которую предназначено олигомерное соединение. РНК-мишень означает транскрипт РНК и включает пре-мРНК и мРНК, если не указано иное.

При использовании в данном документе, «целевая область» означает часть нуклеиновой кислоты-мишени, с которой олигомерное соединение предназначено для гибридизации.

При использовании в данном документе, «концевая группа» означает химическую группу или группу атомов, которые ковалентно связаны с концом олигонуклеотида.

При использовании в данном документе, «рецептор трансферрина», «TfR1» и «CD71» означают рецептор трансферрина 1 типа млекопитающих. «Рецептор трансферрина человека» и «TfR1 человека» означают белок, кодируемый геном, представленным ENSEMBL ID ENSG00000072274 и/или GenBank Gene ID 7037. «Рецептор трансферрина мыши» и «TfR1 мыши» означают белок, кодируемый геном, представленным ENSEMBL ID ENSMUSG00000022797 и/или GenBank Gene ID 22042.

При использовании в данном документе, «антисмысловая активность» означает любое обнаруживаемое и/или измеримое изменение, обусловленное гибридизацией антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая активность представляет собой снижение количества или экспрессии нуклеиновой кислоты-мишени или белка-мишени, кодируемого такой нуклеиновой кислотой-мишенью, по сравнению с уровнями нуклеиновой кислоты-мишени или уровнями белка-мишени в отсутствие антисмыслового соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая активность представляет собой модуляцию сплайсинга пре-мРНК-мишени.

При использовании в данном документе, «антисмысловый агент» означает антисмысловое соединение и необязательно один или более дополнительных признаков, таких как смысловое соединение.

При использовании в данном документе, «антисмысловое соединение» означает антисмысловый олигонуклеотид и необязательно один или несколько дополнительных признаков, таких как конъюгирующая группа.

При использовании в данном документе, «смысловое соединение» означает смысловый олигонуклеотид и необязательно один или несколько дополнительных признаков, таких как конъюгирующая группа.

При использовании в данном документе, «антисмысловой олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, включая олигонуклеотидную часть антисмыслового соединения, который способен гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью и обладает по меньшей мере одной антисмысловой активностью. Антисмысловые олигонуклеотиды включают, но не ограничиваясь этим, антисмысловые олигонуклеотиды РНКи и антисмысловые олигонуклеотиды РНКазы Н.

При использовании в данном документе, «смысловой олигонуклеотид» означает олигонуклеотид, включая олигонуклеотидную часть смыслового соединения, который способен гибридизоваться с антисмысловым олигонуклеотидом.

При использовании в данном документе, «агент РНКи» означает антисмысловой агент, который действует, по меньшей мере частично, через RISC или Ago2, модулируя нуклеиновую кислоту-мишень и/или белок, кодируемый нуклеиновой кислотой-мишенью. Агенты РНКи включают, но не ограничиваясь этим, двухцепочечную миРНК, одноцепочечную РНКи (оцРНКи) и микроРНК, включая аналоги микроРНК. Агенты РНКи могут содержать конъюгирующие группы и/или концевые группы. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент РНКи модулирует количество и/или активность нуклеиновой кислоты-мишени. Термин «агент РНКи» исключает антисмысловые агенты, действующие через РНКазу Н.

При использовании в данном документе, «агент РНКазы Н» означает антисмысловой агент, который действует через РНКазу Н, модулируя нуклеиновую кислоту-мишень и/или белок, кодируемый нуклеиновой кислотой-мишенью. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты РНКазы Н являются одноцепочечными. В некоторых вариантах осуществления изобретения агенты РНКазы Н являются двуцепочечными. Агенты РНКазы Н могут содержать конъюгирующие группы и/или концевые группы. В некоторых вариантах осуществления изобретения агент РНКазы Н модулирует количество и/или активность нуклеиновой кислоты-мишени. Термин «агент РНКазы Н» исключает антисмысловые агенты, которые действуют преимущественно через RISC/Ago2.

При использовании в данном документе, «агент, модулирующий сплайсинг», означает антисмысловой агент, который действует, по меньшей мере частично, путем модуляции сплайсинга нуклеиновой кислоты-мишени. «Агент, модулирующий сплайсинг» включает «олигонуклеотид, модулирующий сплайсинг».

При использовании в данном документе «стерический блокирующий агент» означает антисмысловой агент, который действует, по меньшей мере частично, за счет непосредственного связывания с нуклеиновой кислотой-мишенью, блокируя таким образом взаимодействие нуклеиновой кислоты-мишени с другими нуклеиновыми кислотами или белками.

При использовании в данном документе, «лечение» означает улучшение заболевания или состояния субъекта путем введения олигомерного агента или олигомерного соединения, описанного в данном документе. В некоторых вариантах



осуществления изобретения лечение субъекта улучшает симптом по сравнению с тем же симптомом в отсутствие лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение снижает тяжесть или частоту симптома или задерживает появление симптома, замедляет прогрессирование симптома или замедляет тяжесть или частоту симптома.

При использовании в данном документе, «терапевтически эффективное количество» означает количество олигомерного агента или фармацевтической композиции, которое обеспечивает терапевтическую пользу субъекту. Например, терапевтически эффективное количество улучшает симптом заболевания.

### **НЕКОТОРЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В данном изобретении представлены следующие неограничивающие пронумерованные варианты осуществления:

Вариант осуществления 1. Олигомерное соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и конъюгирующую группу, при этом модифицированный олигонуклеотид состоит из от 10 до 300 связанных нуклеозидов, а конъюгирующая группа содержит бициклический лиганд и конъюгирующий линкер, причем

бициклический лиганд содержит полипептид, состоящий из 13-22 связанных аминокислот или аналогов аминокислот и молекулярный каркас, причем:

Каждая из первой, второй и третьей аминокислоты полипептида содержит реакционноспособную группу, каждая из которых отдельно образует связь с молекулярным каркасом, образуя таким образом две полипептидные петли, прикрепленные к молекулярному каркасу; и

при этом часть бициклического лиганда связывается с трансферриновым рецептором 1 типа; и

модифицированный олигонуклеотид ковалентно связан с бициклическим лигандом посредством конъюгирующего линкера.

Вариант осуществления 2. Олигомерное соединение по варианту осуществления 1, в котором конъюгирующая группа состоит из бициклического лиганда и конъюгирующего линкера.

Вариант осуществления 3. Олигомерное соединение по варианту осуществления 1 или 2, в котором олигомерное соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида и конъюгирующей группы.

Вариант осуществления 4. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-3, в котором каждая из трех реакционноспособных групп представляет собой тиол цистеина.

Вариант осуществления 5. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-4, в котором полипептид имеет следующую формулу от N-конца до C-конца:

$[B]_n-[Z_i]-[J]_m-[Z_{ii}]-[O]_o-[Z_{iii}]-[U]_p$ , при этом:

$Z_i$ ,  $Z_{ii}$  и  $Z_{iii}$  представляют собой первую, вторую и третью аминокислоты,

содержащие реакционноспособную группу;

каждый В, J, O и U представляет собой независимо выбранную аминокислоту или аналог аминокислоты;

n равен от 0 до 5;

m равен от 3 до 7;

o равен от 3 до 7;

p равен от 0 до 5;

при этом сумма m+o составляет менее 12.

Вариант осуществления 6. Олигомерное соединение по варианту осуществления 5, в котором m равен 7 и o равен 3.

Вариант осуществления 7. Олигомерное соединение по варианту осуществления 5, в котором m равен 2 и o равен 9.

Вариант осуществления 8. Олигомерное соединение по варианту осуществления 5, в котором оба m и o равны 6.

Вариант осуществления 9. Олигомерное соединение по варианту осуществления 5, в котором m равен 3 и o равен 8.

Вариант осуществления 10. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 5-9, в котором n равен 0.

Вариант осуществления 11. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 5-9, в котором m равен 3 или 4.

Вариант осуществления 12. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 5-11, в котором p равен 0.

Вариант осуществления 13. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 5-11, в котором r равен 3 или 4.

Вариант осуществления 14. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-13, в котором полипептид имеет N-концевую модификацию.

Вариант осуществления 15. Олигомерное соединение по варианту осуществления 14, в котором N-концевая модификация представляет собой ацетильную группу.

Вариант осуществления 16. Олигомерное соединение по варианту осуществления 14, в котором N-концевая модификация представляет собой азидопропильную группу.

Вариант осуществления 17. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-13, в котором полипептид имеет C-концевую модификацию.

Вариант осуществления 18. Олигомерное соединение по варианту осуществления 14, в котором C-концевая модификация представляет собой амидную группу.

Вариант осуществления 19. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-18, в котором конъюгирующий линкер присоединен к N-концевой аминокислоте бициклического лиганда.

Вариант осуществления 20. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-19, в котором конъюгирующий линкер присоединен к C-концевой аминокислоте бициклического лиганда.

Вариант осуществления 21. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-20, в котором конъюгирующий линкер присоединен к боковой цепи аминокислоты в одной из полипептидных петель бициклического лиганда.

Вариант осуществления 22. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-21, в котором бициклический лиганд содержит C-концевое удлинение.

Вариант осуществления 23. Олигомерное соединение по варианту осуществления 22, в котором C-концевое удлинение выбрано из ПЭГ10 или ПЭГ24.

Вариант осуществления 24. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-23, в котором бициклический лиганд содержит N-концевое удлинение.

Вариант осуществления 25. Олигомерное соединение по варианту осуществления 24, в котором N-концевое удлинение выбрано из ПЭГ10 или ПЭГ24.

Вариант осуществления 26. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором конъюгирующая группа присоединена к 5'-концевому нуклеозиду модифицированного олигонуклеотида.

Вариант осуществления 27. Олигомерное соединение по варианту осуществления 26, в котором конъюгирующая группа присоединена к 5'-положению 5'-концевого нуклеотида модифицированного олигонуклеотида.

Вариант осуществления 28. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором конъюгирующая группа присоединена к 3'-концевому нуклеозиду модифицированного олигонуклеотида.

Вариант осуществления 29. Олигомерное соединение по варианту осуществления 28, в котором конъюгирующая группа присоединена к 3'-положению 3'-концевого нуклеотида модифицированного олигонуклеотида.

Вариант осуществления 30. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором конъюгирующая группа присоединена к внутреннему нуклеозиду модифицированного олигонуклеотида.

Вариант осуществления 31. Олигомерное соединение по варианту осуществления 1-25, в котором конъюгирующая группа присоединена посредством модифицированной межнуклеозидной связи.

Вариант осуществления 32. Олигомерное соединение по варианту осуществления 28-30, в котором конъюгирующая группа присоединена к 2'-модифицированному фуранозильному фрагменту сахара.

Вариант осуществления 33. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-32, в котором бициклический лиганд имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична любой из SEQ ID №: 26-27, 36-56, 58-65, 67-76, 79-88, 90-152 или 192-246.

Вариант осуществления 34. Олигомерное соединение по варианту осуществления 33, в котором бициклический лиганд имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентична любой из SEQ ID №: 26-27, 36-56, 58-65, 67-76, 79-88, 90-152 или 192-246.

Вариант осуществления 35. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 5-34, в котором  $[Z_i]-[J]_m-[Z_{ii}]-[O]_o-[Z_{iii}]$  имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентична любой из SEQ ID №: 26-27, 35-56, 58-65, 67-76, 79-88, 90-152 или 192-246.

Вариант осуществления 36. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 5-35, в котором  $[Z_i]-[J]_m-[Z_{ii}]-[O]_o-[Z_{iii}]$  имеет аминокислотную последовательность CXXDXXXGCISYC (SEQ ID №: 35), где каждый «X» представляет собой независимо выбранную аминокислоту.

Вариант осуществления 37. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-36, в котором бициклический лиганд содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два или по меньшей мере три неприродные аминокислоты.

Вариант осуществления 38. Олигомерное соединение по варианту осуществления 37, в котором по меньшей мере одна неприродная аминокислота выбрана из D-аминокислоты, аллоизолейцина, 2-амино-3-этилпентановой кислоты, аминоизомасляной кислоты, аминамляной кислоты, азетидина, 7-азатриптофана, 6-азидолизина,  $\beta$ -циклобутилаланина,  $\beta$ -метилизольцина, 4,4-бифенилаланина, цис-гидроксипролина, циклобутилглицина, циклогексилглицина, циклопентилаланина, циклопентилглицина, 2,6-диметилтирозина, 3,3-дифенилаланина, 4-транс-гидрокси-L-пролина, 1-нафтилаланина, 2-нафтилаланина, N-метилаланина, 1-метилгистидина, 3-метилгистидина, N-метилтриптофана, пипеколиновой кислоты, 4-пиридилаланина, саркозина, трет-бутилаланина или 3-трет-бутилтирозина.

Вариант осуществления 39. Олигомерное соединение по варианту осуществления 38, в котором по меньшей мере одна аминокислота неприродного происхождения выбрана из 4-транс-гидрокси-L-пролина, 6-азидолизина и трет-бутилглицина.

Вариант осуществления 40. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-39, в котором молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

Вариант осуществления 41. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-39, в котором молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5- триил)трис(2-брометанон) (ТАТВ).

Вариант осуществления 42. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-41, в котором бициклический лиганд не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.

Вариант осуществления 43. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-42, в котором по меньшей мере один нуклеозид модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 44. Олигомерное соединение по варианту осуществления 43, в котором по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара содержит бициклический фрагмент сахара.

Вариант осуществления 45. Олигомерное соединение по варианту осуществления 44, в котором бициклический фрагмент сахара содержит 2'-4' мостик, выбранный из -O-CH<sub>2</sub>-; и -O-CH(CH<sub>3</sub>)-.

Вариант осуществления 46. Олигомерное соединение по варианту осуществления 43-45, в котором по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара содержит небициклический модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 47. Олигомерное соединение по варианту осуществления 46, в котором небициклический модифицированный фрагмент сахара представляет собой фрагмент 2'-МОЕ сахара или фрагмент 2'-ОМе сахара.

Вариант осуществления 48. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 43-47, в котором по меньшей мере один нуклеозид модифицированного олигонуклеотидного соединения содержит заменитель сахара.

Вариант осуществления 49. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-48, в котором модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 50. Олигомерное соединение по варианту осуществления 49, в котором по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 51. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 49-50, в котором каждая межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 52. Олигомерное соединение по варианту осуществления 51, в котором каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 53. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-50, в котором модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 54. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-50 или 53, в котором каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида независимо выбрана из фосфодиэфирной или фосфоротиоатной межнуклеозидной связи.

Вариант осуществления 55. Олигомерное соединение по варианту осуществления 49, в котором по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой мезилфосфорамидатную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 56. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 49-55, в котором каждая межнуклеозидная связь независимо выбрана из фосфодиэфирной, фосфоротиоатной межнуклеозидной или мезилфосфорамидатной межнуклеозидной связи.

Вариант осуществления 57. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 49-55, в котором каждая межнуклеозидная связь независимо выбрана из

фосфоротиоатной межнуклеозидной или мезилфосфорамидатной межнуклеозидной связи.

Вариант осуществления 58. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-57, в котором модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание.

Вариант осуществления 59. Олигомерное соединение по варианту осуществления 58, в котором нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин.

Вариант осуществления 60. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-59, в котором модифицированный олигонуклеотид содержит дезокси-область, состоящую из 5-12 смежных 2'-дезоксинуклеозидов.

Вариант осуществления 61. Олигомерное соединение по варианту осуществления 60, в котором каждый нуклеозид дезокси-области представляет собой 2'-β-D-дезоксинуклеозид.

Вариант осуществления 62. Олигомерное соединение по варианту осуществления 60 или 61, в котором дезокси-область состоит из 7, 8, 9, 10 или 7-10 связанных нуклеозидов.

Вариант осуществления 63. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 60-62, в котором каждый нуклеозид, непосредственно примыкающий к дезокси-области, содержит модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 64. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 60-63, в котором дезокси-область фланкирована на 5'-стороне 5'-областью, состоящей из 1-6 связанных нуклеозидов 5'-области, а на 3'-стороне 3'-областью, состоящей из 1-6 связанных нуклеозидов 3'-области; причем

крайний 3'-нуклеозид 5'-области содержит модифицированный фрагмент сахара; и крайний 5'-нуклеозид 3'-области содержит модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 65. Олигомерное соединение по варианту осуществления 64, в котором каждый нуклеозид 3'-области содержит модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 66. Олигомерное соединение по варианту осуществления 64 или 65, в котором каждый нуклеозид 5'-области содержит модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 67. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-66, в котором модифицированный олигонуклеотид имеет мотив сахара, содержащий:

5'-область, состоящую из 1-6 связанных нуклеозидов 5'-области;

внутреннюю область, состоящую из 6-10 связанных нуклеозидов внутренней области; и

3'-область, состоящую из 1-6 связанных нуклеозидов 3'-области;

причем каждый из нуклеозидов 5'-области и каждый из нуклеозидов 3'-области содержит модифицированный фрагмент сахара; и каждый из нуклеозидов внутренней области выбран из 2'-дезоксинуклеозида и 2'-замещенного нуклеозида.

Вариант осуществления 68. Олигомерное соединение по варианту осуществления

67, в котором модифицированный олигонуклеотид имеет мотив сахара, содержащий:

5'-область, состоящую из 1-6 связанных нуклеозидов 5'-области;

внутреннюю область, состоящую из 6-10 связанных нуклеозидов внутренней области; и

3'-область, состоящую из 1-6 связанных нуклеозидов 3'-области;

причем каждый из нуклеозидов 5'-области и каждый из нуклеозидов 3'-области представляет собой нуклеозид сEt или нуклеозид 2'-МОЕ; и каждый из нуклеозидов внутренней области представляет собой 2'-β-D-дезоксинуклеозид.

Вариант осуществления 69. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-59, в котором каждый нуклеозид модифицированного олигонуклеотида содержит фрагмент 2'-сахара.

Вариант осуществления 70. Олигомерное соединение по варианту осуществления 69, причем каждый фрагмент 2'-сахара выбран из 2'-ОМе, 2'-МОЕ или 2'-NMA.

Вариант осуществления 71. Олигомерное соединение по варианту осуществления 69 или 70, в котором каждый нуклеозид модифицированного олигонуклеотида содержит один и тот же фрагмент 2'-сахара.

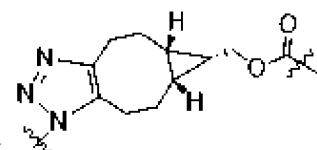
Вариант осуществления 72. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-71, в котором конъюгирующий линкер способен расщепляться.

Вариант осуществления 73. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-72, в котором конъюгирующий линкер содержит 1-3 линкерных нуклеозида.

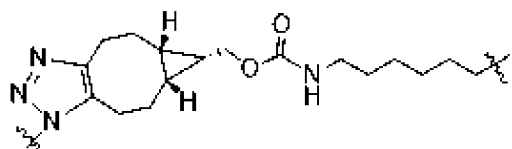
Вариант осуществления 74. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-72, в котором конъюгирующий линкер не содержит каких-либо линкерных нуклеозидов.

Вариант осуществления 75. Олигомерное соединение по любому из вариантов

осуществления 1-74, в котором конъюгирующая группа содержит:



Вариант осуществления 76. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-74, в котором конъюгирующая группа содержит:



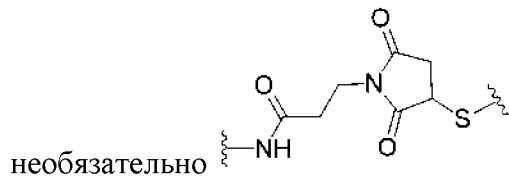
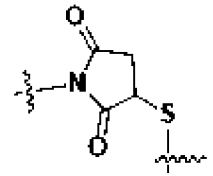
Вариант осуществления 77. Олигомерное соединение по любому из вариантов

осуществления 1-74, в котором конъюгирующая группа содержит:

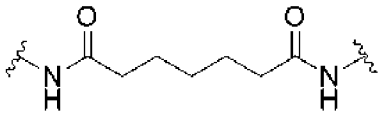


Вариант осуществления 78. Олигомерное соединение по любому из вариантов

осуществления 1-74, в котором конъюгирующая группа содержит:

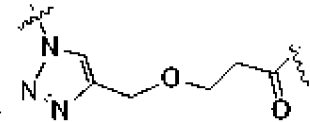


Вариант осуществления 79. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-74, в котором конъюгирующая группа содержит:

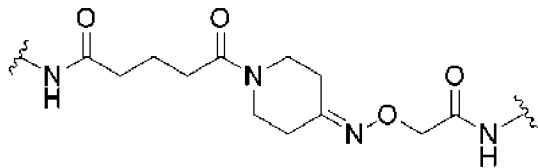


Вариант осуществления 80. Олигомерное соединение по любому из вариантов

осуществления 1-74, в котором конъюгирующая группа содержит:

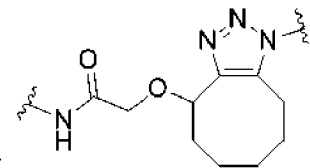


Вариант осуществления 81. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-74, в котором конъюгирующая группа содержит:



Вариант осуществления 82. Олигомерное соединение по любому из вариантов

осуществления 1-74, в котором конъюгирующая группа содержит:



Вариант осуществления 83. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-82, в котором модифицированный олигонуклеотид комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени, экспрессируемой в мышцах.

Вариант осуществления 84. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-83, в котором модифицированный олигонуклеотид способен снижать количество нуклеиновой кислоты-мишени посредством активации РНКазы H.

Вариант осуществления 85. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-83, в котором модифицированный олигонуклеотид способен снижать количество нуклеиновой кислоты-мишени посредством активации RISC/Ago2.

Вариант осуществления 86. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-83, в котором модифицированный олигонуклеотид способен



модулировать сплайсинг нуклеиновой кислоты-мишени.

Вариант осуществления 87. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-83, в котором модифицированный олигонуклеотид представляет собой направляющую РНК, tracrРНК или scoutРНК.

Вариант осуществления 88. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-87, в котором модифицированный олигонуклеотид комплементарен комплементу нуклеиновой кислоты-мишени, экспрессируемой в мышцах.

Вариант осуществления 89. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 83-88, в котором нуклеиновая кислота-мишень связана с заболеванием мышц.

Вариант осуществления 90. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 83-89, в котором нуклеиновая кислота-мишень выбрана из CaMK2d, NLRP3, PLN, DMD, DMPK, DNM2, DUX4 или HPRT.

Вариант осуществления 91. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 83-90, в котором нуклеиновая кислота-мишень в мышцах имеет последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 1-15.

Вариант осуществления 92. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 83-91, в котором нуклеиновая кислота-мишень экспрессируется в по меньшей мере одной из следующих тканей: скелетная мышца (включая, но не ограничиваясь этим, четырехглавую мышцу, икроножную мышцу, переднюю большеберцовую мышцу, трехглавую мышцу, жевательную мышцу, длинный разгибатель пальцев (EDL), камбаловидную мышцу, диафрагму), сердце, седалищный нерв, аорта или печень.

Вариант осуществления 93. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-92, в котором последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида содержит по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 16 непрерывных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований любой SEQ ID №: 167-191.

Вариант осуществления 94. Олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-93, в котором модифицированный олигонуклеотид состоит из от 10 до 25, от 10 до 30, от 12 до 20, от 12 до 25, от 12 до 30, от 13 до 20, от 13 до 25, от 13 до 30, от 14 до 20, от 14 до 25, от 14 до 30, от 15 до 20, от 15 до 25, от 15 до 30, от 16 до 18, от 16 до 20, от 16 до 25, от 16 до 30, от 17 до 20, от 17 до 25, от 17 до 30, от 18 до 20, от 18 до 25, от 18 до 30, от 19 до 20, от 19 до 25, от 19 до 30, от 20 до 25, от 20 до 30, от 21 до 25, от 21 до 30, от 21 до 50, от 22 до 25, от 22 до 30, от 23 до 25, от 23 до 30, от 20 до 100, от 40 до 100, от 50 до 100, от 50 до 200, от 100 до 300, 150-300 или 200-300 связанных нуклеозидов.

Вариант осуществления 95. Олигомерный дуплекс, содержащий первое олигомерное соединение, содержащее первый модифицированный олигонуклеотид, и второе олигомерное соединение, содержащее второй модифицированный олигонуклеотид,

состоящий из 16-30 связанных нуклеозидов, причем последовательность нуклеиновых оснований второго модифицированного олигонуклеотида содержит комплементарную область, состоящую из по меньшей мере 12 нуклеиновых оснований, которые на по меньшей мере 90% комплементарны участку равной длины первого модифицированного олигонуклеотида, а второе олигомерное соединение представляет собой олигомерное соединение по любому из вариантов осуществления 1-86 или 89-94.

Вариант осуществления 96. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 95, в котором первый модифицированный олигонуклеотид комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени в мышцах.

Вариант осуществления 97. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 96, в котором дуплекс способен снижать количество нуклеиновой кислоты-мишени посредством активации RISC/Ago2.

Вариант осуществления 98. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-97, в котором по меньшей мере один нуклеозид второго модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 99. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 98, в котором модифицированный фрагмент сахара второго модифицированного олигонуклеотида содержит бициклический фрагмент сахара.

Вариант осуществления 100. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 99, в котором бициклический фрагмент сахара второго модифицированного олигонуклеотида содержит 2'-4'-мостик, выбранный из -O-CH<sub>2</sub>-; и -O-CH(CH<sub>3</sub>)-.

Вариант осуществления 101. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 100, в котором модифицированный фрагмент сахара второго модифицированного олигонуклеотида содержит небциклический модифицированный фрагмент сахара.

Вариант осуществления 102. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 101, в котором небциклический модифицированный фрагмент сахара второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой фрагмент 2'-МОЕ сахара, фрагмент 2'-F сахара или фрагмент 2'-ОМе сахара.

Вариант осуществления 103. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-102, в котором по меньшей мере один нуклеозид второго модифицированного олигонуклеотида содержит заменитель сахара.

Вариант осуществления 104. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-102, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 105. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 104, в котором по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 106. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов

осуществления 95-105, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 107. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-104 или 106, в котором каждая межнуклеозидная связь второго модифицированного олигонуклеотида независимо выбрана из фосфодиэфирной или фосфоротиоатной межнуклеозидной связи.

Вариант осуществления 108. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-107, в котором второй модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание.

Вариант осуществления 109. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 108, в котором модифицированное нуклеиновое основание второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5-метилцитозин.

Вариант осуществления 110. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-109, в котором первое олигомерное соединение содержит 5'-стабилизированную фосфатную группу.

Вариант осуществления 111. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-109, в котором второе олигомерное соединение содержит 5'-стабилизированную фосфатную группу.

Вариант осуществления 112. Олигомерный дуплекс по варианту осуществления 110 или 111, в котором стабилизированная фосфатная группа содержит циклопропилфосфонат или винилфосфонат.

Вариант осуществления 113. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-112, в котором первый модифицированный олигонуклеотид содержит заменитель сахара гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA).

Вариант осуществления 114. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-113, в котором первый модифицированный олигонуклеотид содержит фрагмент 2'-NMA сахара.

Вариант осуществления 115. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-114, в котором второй модифицированный олигонуклеотид содержит заменитель сахара гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA).

Вариант осуществления 116. Олигомерный дуплекс по любому из вариантов осуществления 95-115, в котором второе модифицированное олигонуклеотидное соединение содержит фрагмент 2'-NMA сахара.

Вариант осуществления 117. Способ модуляции нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта, включающий введение субъекту олигомерного соединения по любому из вариантов осуществления 1-94 или олигомерного дуплекса по любому из вариантов осуществления 95-116.

Вариант осуществления 118. Способ по варианту осуществления 117, в котором нуклеиновая кислота-мишень экспрессируется в по меньшей мере одной из скелетных

мышц (включая, но не ограничиваясь этим, четырехглавую мышцу, икроножную мышцу, переднюю большеберцовую мышцу, трехглавую мышцу, жевательную мышцу, длинный разгибатель пальцев (EDL), камбаловидную мышцу, диафрагму), сердца, седалищного нерва, аорты или печени.

Вариант осуществления 119. Способ по варианту осуществления 117 или 118, в котором введение олигомерного соединения по любому из вариантов осуществления 1-94 или олигомерного дуплекса по любому из вариантов осуществления 95-116 приводит к уменьшению количества нуклеиновой кислоты-мишени.

Вариант осуществления 120. Способ по варианту осуществления 117 или 118, в котором введение олигомерного соединения по любому из вариантов осуществления 1-94 или олигомерного дуплекса по любому из вариантов осуществления 95-116 приводит к изменению сплайсинга нуклеиновой кислоты-мишени.

Вариант осуществления 121. Способ по любому из вариантов осуществления 117-120, в котором олигомерное соединение или олигомерный дуплекс вводят посредством внутривенного или подкожного введения.

Вариант осуществления 122. Способ по любому из вариантов осуществления 117-120, в котором олигомерное соединение или олигомерный дуплекс вводят в дозе 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг, 140 мг, 145 мг, 150 мг, 155 мг, 160 мг, 165 мг, 170 мг, 175 мг, 180 мг, 185 мг, 190 мг, 195 мг, 200 мг, 205 мг, 210 мг, 215 мг, 220 мг, 225 мг, 230 мг, 235 мг, 240 мг, 245 мг, 250 мг, 255 мг, 260 мг, 265 мг, 270 мг, 275 мг, 280 мг, 285 мг, 290 мг, 295 мг, 300 мг, 305 мг, 310 мг, 315 мг, 320 мг, 325 мг, 330 мг, 335 мг, 340 мг, 345 мг или 350 мг.

Вариант осуществления 123. Способ по любому из вариантов осуществления 117-122, включающий введение олигомерного соединения или олигомерного дуплекса один раз в 4 недели, один раз в 6 недель, один раз в 8 недель, один раз в 12 недель, один раз в 16 недель, один раз в 20 недель, один раз в 24 недели, один раз в 6 месяцев или один раз в год.

Вариант осуществления 124. Бициклический лиганд, специфичный для рецептора трансферрина 1 (TfR1), который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWK (SEQ ID №: 245, именуемую в данном документе как BCY21757) и CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWC (SEQ ID №: 246, именуемую в данном документе как BCY21758), где HyP представляет собой транс-4-гидрокси-L-пролин, а tBuGly представляет собой трет-бутилглицин.

Вариант осуществления 125. Бициклический лиганд по варианту осуществления 124, который содержит N-концевую ацетильную группу и C-концевую группу CONH<sub>2</sub>.

Вариант осуществления 126. Бициклический лиганд по варианту осуществления 124 или 125, который представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

Вариант осуществления 127. Фармацевтическая соль по варианту осуществления 126, причем фармацевтически приемлемая соль выбрана из натриевой, калиевой, кальциевой или аммониевой соли.

Вариант осуществления 128. Бициклический лиганд по варианту осуществления 124, в котором первый, второй и третий остатки цистеина в указанных пептидных лигандах ковалентно связаны с молекулярным каркасом, так что на указанном молекулярном каркасе образуются две полипептидные петли.

Вариант осуществления 129. Бициклический лиганд по варианту осуществления 125, в котором молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

### **Некоторые соединения**

В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении предложены соединения, содержащие один или более олигонуклеотидов и одну или более конъюгирующих групп. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид представляет собой немодифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединения содержат олигонуклеотид, фрагмент, нацеленный на клетку, и конъюгирующий линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения содержат олигонуклеотид, бициклический лиганд и конъюгирующий линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения содержат олигонуклеотид, полипептид, конъюгирующий линкер и, необязательно, N-концевые или C-концевые модификации полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения содержат олигонуклеотид, два или более полипептидов, разветвляющую группу, конъюгирующий линкер и, необязательно, N-концевые или C-концевые модификации полипептидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер соединяет полипептид и/или бициклический лиганд с олигонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения N-конец бициклического лиганда ковалентно связан с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно связан с 3'-концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения C-конец бициклического лиганда ковалентно связан с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно связан с 3'-концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения внутренняя аминокислота бициклического лиганда ковалентно связана с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно связан с 3'-концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения N-конец бициклического лиганда ковалентно связан с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно связан с 5'-концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения C-конец бициклического лиганда ковалентно связан с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно связан с 5'-концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения внутренняя аминокислота бициклического лиганда ковалентно связана с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно

связан с 5'-концом олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения N-конец бициклического лиганда ковалентно связан с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно связан по внутреннему положению олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения C-конец бициклического лиганда ковалентно связан с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно связан по внутреннему положению олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения внутренняя аминокислота бициклического лиганда ковалентно связана с конъюгирующим линкером, а конъюгирующий линкер ковалентно связан по внутреннему положению олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения внутреннее положение олигонуклеотида представляет собой 2'-положение модифицированного фрагмента сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения внутреннее положение олигонуклеотида представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

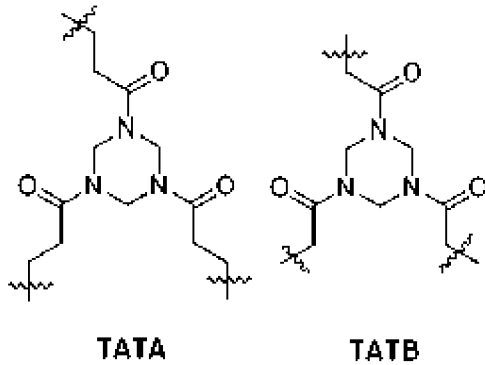
### **Некоторые конъюгирующие группы**

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие фрагменты модифицируют одно или более свойств присоединенного олигонуклеотида, включая, но не ограничиваясь этим, фармакодинамику, фармакокинетику, стабильность, связывание, абсорбцию, распределение в тканях, клеточное распределение, клеточное поглощение, заряд и клиренс. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие фрагменты придают новое свойство присоединенному олигонуклеотиду.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит конъюгирующий фрагмент и конъюгирующий линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит или состоит из фрагмента, нацеленного на клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетку, способен связывать рецептор клеточной поверхности или фрагмент клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение, содержащее фрагмент, нацеленный на клетку, способно интернализироваться, когда оно взаимодействует с или связывает рецептор клеточной поверхности или фрагмент клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетки, содержит бициклический полипептид или бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент, нацеленный на клетки, состоит из бициклического полипептида или бициклического лиганда.

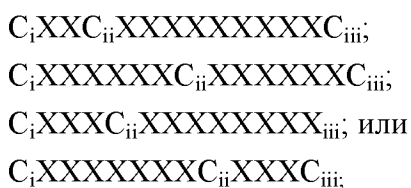
В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит полипептид, содержащий по меньшей мере три реакционноспособные группы, разделенные по меньшей мере двумя петлевыми последовательностями, и молекулярный каркас, который образует ковалентные связи с реакционноспособными группами полипептида, так что на молекулярном каркасе образуются по меньшей мере две полипептидные петли. В некоторых вариантах осуществления молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА). В некоторых вариантах осуществления изобретения молекулярный каркас представляет

собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трис(2-бромэтанон) (TATB).



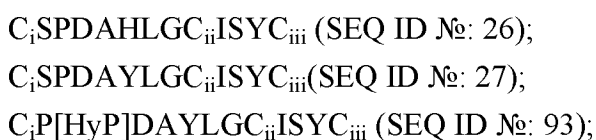
В некоторых вариантах осуществления изобретения реакционноспособные группы представляют собой цистеины. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности петель содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенные двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 2 аминокислот, а вторая из 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенные двумя последовательностями петель, каждая из которых состоит из 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенные двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 3 аминокислот, а вторая из 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности петель содержат три остатка цистеина, разделенные двумя последовательностями петель, первая из которых состоит из 7 аминокислот, а вторая из 3 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из:



где  $C_i$ ,  $C_{ii}$  и  $C_{iii}$  представляют первый, второй и третий цистеиновые остатки, соответственно, и каждый «X» представляет независимо выбранную природную или не природную аминокислоту или ее фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд дополнительно содержит N-концевое удлинение и/или C-концевое удлинение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичную любой из следующих последовательностей:



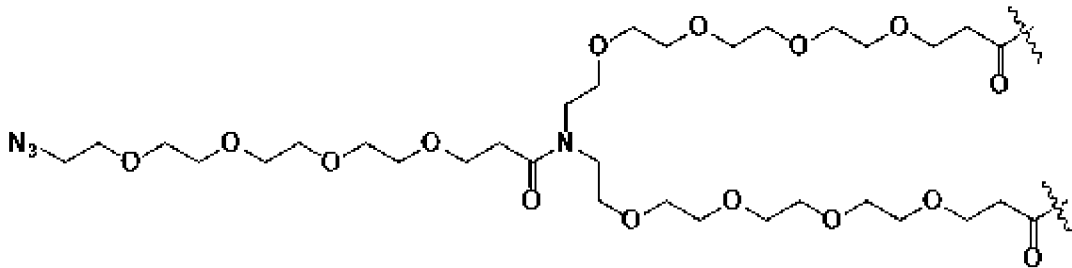
$C_i$ S[HyP]DAHLGC<sub>ii</sub>ISYC<sub>iii</sub> (SEQ ID №: 95);  
 $C_i$ S[Aze]DAHLGC<sub>ii</sub>ISYC<sub>iii</sub> (SEQ ID №: 128);  
 $C_i$ P[HyP]DAYLGC<sub>ii</sub>[tBuGly]SYC<sub>iii</sub> (SEQ ID №: 86);  
 $C_i$ [K(N<sub>3</sub>)]PDAHLGC<sub>ii</sub>ISYC<sub>iii</sub> (SEQ ID №: 150);  
 $C_i$ S[K(N<sub>3</sub>)]DAHLGC<sub>ii</sub>ISYC<sub>iii</sub> (SEQ ID №: 151); или  
 $C_i$ SPD[K(N<sub>3</sub>)]HLGC<sub>ii</sub>ISYC<sub>iii</sub> (SEQ ID №: 152);

$C_i$ ,  $C_{ii}$  и  $C_{iii}$  представляют первый, второй и третий цистеины, соответственно; [HyP] представляет 4-транс-гидрокси-L-пролин; [Aze] представляет азетидин; [tBuGly] представляет трет-бутилглицин; и [K(N<sub>3</sub>)] представляет 6-азидолизин. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд дополнительно содержит N-концевое удлинение и/или C-концевое удлинение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит аминокислотную последовательность:

$C_i$ XXDXXXGC<sub>ii</sub>ISYC<sub>iii</sub> (SEQ ID №: 35); где каждый X независимо выбран из природной или неприродной аминокислоты или ее фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд дополнительно содержит N-концевое удлинение и/или C-концевое удлинение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит два или более бициклических лигандов, присоединенных через конъюгирующий линкер, включающий двухвалентный линкер, включающий разветвленную группу. В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентный линкер содержит один или более повторов ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления изобретения двухвалентный линкер показан в структуре ниже:



В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд способен взаимодействовать с рецептором клеточной поверхности на клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд способен взаимодействовать с фрагментом клеточной поверхности на клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд способен связываться с рецептором клеточной поверхности на клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд способен связываться с фрагментом клеточной поверхности на клетке. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд способен интернализироваться клеткой, когда он взаимодействует или связывается с рецептором клеточной поверхности или фрагментом клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор клеточной поверхности не экспрессируется повсеместно (например,



рецептор клеточной поверхности не обнаруживается по меньшей мере в одной ткани человека), а бициклический лиганд избирательно доставляет олигонуклеотид в представляющую интерес ткань или клетку. В качестве неограничивающего примера представляющей интерес тканью может быть любая ткань головного мозга, спинного мозга, сетчатки, сердца, почек, печени, легких, скелетных мышц, сердечной мышцы, гладких мышц, жировой ткани, белой жировой ткани, бурой жировой ткани, селезенки, кости, кишечника, толстой кишки, яичек, молочной железы, яичников, плаценты, матки, мочевого пузыря, поджелудочной железы, гипофиза, простаты, кожи, надпочечников и щитовидной железы. В качестве неограничивающего примера представляющая интерес клетка может представлять собой любую из миоцитов, адипоцитов, гепатоцитов, кардиомиоцитов, гладкомышечных клеток сосудов, эндотелиальных клеток, нейронов, клеток крови, макрофагов, лимфоцитов, раковых клеток и иммунных клеток.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд способен взаимодействовать или связываться с рецептором клеточной поверхности. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор клеточной поверхности способен интернализировать бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор клеточной поверхности способен интернализировать олигонуклеотид, связанный с бициклическим лигандом через конъюгирующий линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецептор клеточной поверхности представляет собой рецептор трансферрина человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд представлен формулой  $[B]_n-[Z_i]-[J]_m-[Z_{ii}]-[O]_o-[Z_{iii}]-[U]_p$ , где:

$Z_i$ ,  $Z_{ii}$  и  $Z_{iii}$  представляют собой первую, вторую и третью аминокислоты, содержащие реакционноспособную группу;

каждый B, J, O и U представляет собой независимо выбранную аминокислоту или аналог аминокислоты;

n равен от 0 до 5;

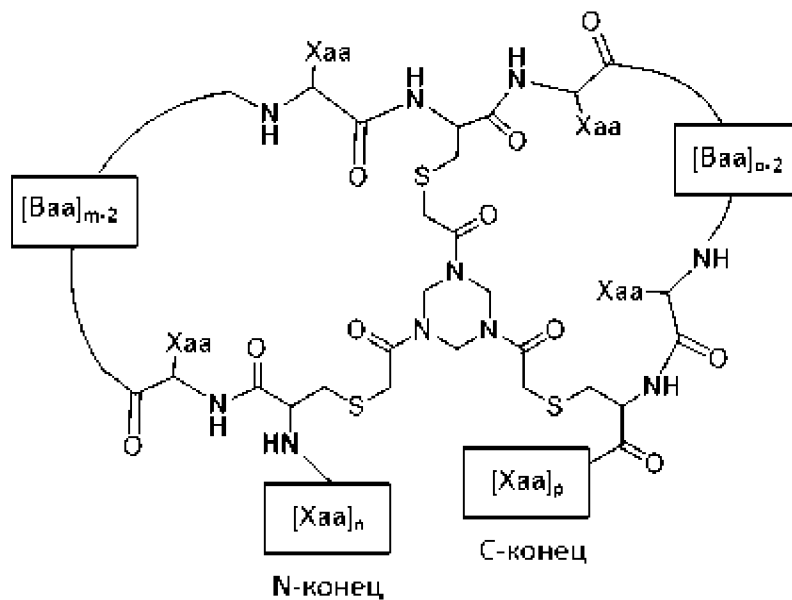
m равен от 3 до 7;

o равен от 3 до 7;

p равен от 0 до 5;

при этом сумма  $m+o$  составляет менее 12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит следующую структуру,



**Бициклический лиганд**

где каждый Хаа представляет собой независимо выбранную боковую цепь аминокислоты;

каждый Ваа представляет собой независимо выбранную аминокислоту или аналог аминокислоты;

n равен от 0 до 5;

m равен от 3 до 7;

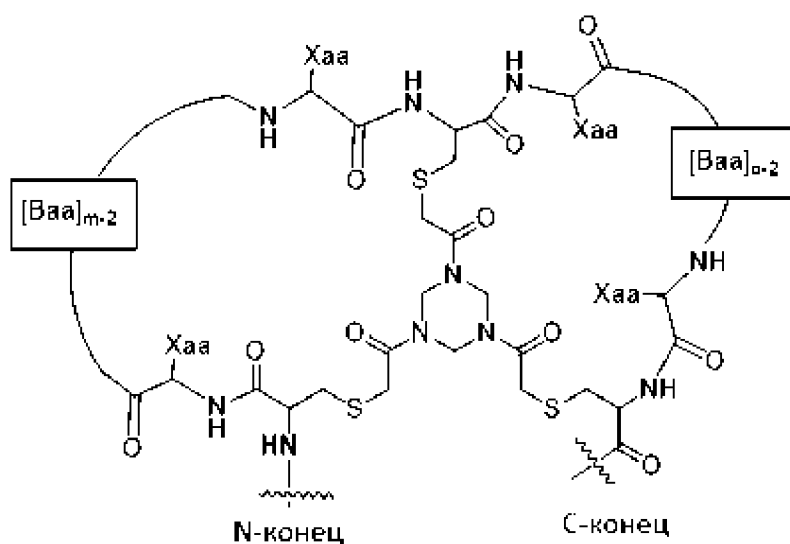
o равен от 3 до 7;

p равен от 0 до 5;

при этом сумма m+o составляет менее 12.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер присоединен через N-конец, C-конец или через одну из аминокислот петли.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд включают формулу  $[Z_i]-[J]_m-[Z_{ii}]-[O]_o-[Z_{iii}]$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд включает следующую структуру:



Полипептид в виде петли

где каждый Хаа представляет собой независимо выбранную боковую цепь аминокислоты, каждый Ваа представляет собой независимо выбранную аминокислоту или аналог аминокислоты;

m равен от 3 до 7, и;

o равен от 3 до 7.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд дополнительно содержит N-концевое удлинение и/или C-концевое удлинение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер присоединен через N-конец, C-конец или через одну из аминокислот петли.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит или состоит из последовательности, выбранной из следующей таблицы:

Таблица 1 Бициклические лиганды

Количество бициклов	N-концевая мод.	Последовательность	SEQ ID №:
BCY13983	нет	ACSADDWLGCIWCA	36
BCY14474	нет	ACSADDWLGCIWCA[ <i>Sar</i> ] <sub>6</sub> [K-F1]	37
BCY13986	нет	ACSSDAYLGCISWCA	38
BCY14475	нет	ACSSDAYLGCISWCA[ <i>Sar</i> ] <sub>6</sub> [K-F1]	39
BCY15466	нет	ACPPDAHLGCISWCA	40
BCY15889	Ac	CPPDAHLGCISWC	41
BCY15467	нет	ACPQDAYLGCISWCA	42
BCY15890	Ac	CPQDAYLGCISWC	43
BCY13989	нет	ACPPDSWQGCISYCA	44
BCY14476	нет	ACPPDSWQGCISYCA[ <i>Sar</i> ] <sub>6</sub> [K-F1]	45
BCY15468	нет	ACSPDAHLGCISYCA	46
BCY15768	нет	ACSPDAHLGCISYC[ <i>Sar</i> ] <sub>6</sub> [K-F1]	192

Количество бициклов	N-концевая мод.	Последовательность	SEQ ID №:
BCY15934	нет	CSPDAHLGCISYC[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	47
BCY15937	Ac	CSPDAHLGCISYCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	48
BCY15938	Ac	CSPDAHLGCISYC[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	47
BCY15940	нет	[FI-G][Sar] <sub>5</sub> ACSPDAHLGCISYCA	49
BCY18030	нет	N[1NaI]NCSPDAHLGCISYC	50
BCY18039	Ac	CSPDAHLGCISYCE[Pip]W	51
BCY17994	Ac	CSPDAHLGCISYCEPW	52
BCY18029	нет	NWNCSPDAHLGCISYC	53
BCY17109	нет	NWNCSPDAHLGCISYCA	54
BCY18037	Ac	CSPDAHLGCISYCE[Aze]W	55
BCY17992	Ac	NWNCSPDAHLGCISYC	53
BCY18038	Ac	CSPDAHLGCISYCE[dP]W	56
BCY18034	Ac	N[1NaI]NCSPDAHLGCISYC	57
BCY18031	нет	N[dW]NCSPDAHLGCISYC	58
BCY18035	Ac	N[dW]NCSPDAHLGCISYC	58
BCY17110	нет	HWMCSPDAHLGCISYCA	59
BCY17115	нет	ACSPDAHLGCISYCPHP	60
BCY17114	нет	ACSPDAHLGCISYCEPW	61
BCY17112	нет	NEVCSPDAHLGCISYCA	62
BCY17120	нет	ACSPDAHLGCISYCPIVH	63
BCY15891	Ac	CSPDAHLGCISYC	26
BCY17111	нет	HTSCSPDAHLGCISYCA	64
BCY18036	Ac	N[NMeTrp]NCSPDAHLGCISYC	65
BCY18032	нет	N[NMeTrp]NCSPDAHLGCISYC	65
BCY15939	Ac	ACSPDAHLGCISYCA	66
BCY17119	нет	ACSPDAHLGCISYCEHQE	67
BCY17113	нет	ESFCSPDAHLGCISYCA	68
BCY17870	нет	NWNCSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	69
BCY17871	Ac	NWNCSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	69
BCY17872	AzPro	NWNCSPDAHLGCISYC	53
BCY17873	Ac	CSPDAHLGCISYCEPW[K(N <sub>3</sub> )]	70
BCY17874	AzPro	CSPDAHLGCISYCEPW	52
BCY17868	Ac	CSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	71
BCY17869	AzPro	CSPDAHLGCISYC	26
BCY17882	Ac	N[dY]NCSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	72
BCY17890	Ac	CSPDAHLGCISYCE-[dP]W[K(N <sub>3</sub> )]	73
BCY17892	Ac	CSPDAHLGCISYCE-[Aze]W[K(N <sub>3</sub> )]	74
BCY17894	Ac	CSPDAHLGCISYCE-[Pip]W[K(N <sub>3</sub> )]	75
BCY17906	Ac	CSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )(PYA-малеимид)]	76

Количество бициклов	N-концевая мод.	Последовательность	SEQ ID №:
BCY19405	Ac	CSPDAHLGCISYCEPW[PEG10][K(N <sub>3</sub> )]	77
BCY19406	Ac	CSPDAHLGCISYCEPW[ПЭГ24][K(N <sub>3</sub> )]	78
BCY19407	Ac	CSPDAHLGCISYCEPWGGSGGS[K(N <sub>3</sub> )]	79
BCY15469	нет	ACPGDAHLGCISYCA	80
BCY15892	Ac	CPGDAHLGCISYC	81
BCY15470	нет	ACPPDShLGCISYCA	82
BCY15893	Ac	CPPDShLGCISYC	83
BCY15471	нет	ACSADDWLGCSYCA	84
BCY15894	Ac	CSADDWLGCSYC	85
BCY17991	Ac	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYC	86
BCY17995	Ac	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPW	87
BCY17993	Ac	NWNCP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYC	88
BCY16754	нет	ACP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCA	89
BCY18033	нет	NWNCP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYC	88
BCY17896	Ac	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYC[K(N <sub>3</sub> )]	90
BCY17899	Ac	NWNCP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYC[K(N <sub>3</sub> )]	91
BCY17901	Ac	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPW[K(N <sub>3</sub> )]	92
BCY17990	Ac	CP[HyP]DAYLGCISYC	93
BCY17875	Ac	CP[HyP]DAYLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	94
BCY17876	AzPro	CP[HyP]DAYLGCISYC	93
BCY17989	Ac	CS[HyP]DAHLGCISYC	95
BCY16047	нет	ACS[HyP]DAHLGCISYCA	96
BCY17877	Ac	CS[HyP]DAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	97
BCY17878	AzPro	CS[HyP]DAHLGCISYC	95
BCY16962	нет	ACP[Aib]DAHLGC[tBuGly]SYCA	98
BCY17117	нет	TYMNCPPDAHLGCISYCA	99
BCY16048	нет	ACPPDAHLGCISYCA	100
BCY16963	нет	ACP[Aib]DAYLGC[tBuGly]SYCA	101
BCY17987	Ac	CSADAHLGCISYC	102
BCY16753	нет	ACS[Aib]DAHLGC[tBuGly]SYCA	103
BCY16046	нет	ACSPDAHLGC[EPA]SYCA	104
BCY16964	нет	ACPPDAYLGC[tBuGly]SYCA	105
BCY16965	нет	ACS[Aib]DAYLGC[tBuGly]SYCA	106
BCY17986	Ac	CAPDAHLGCISYC	107
BCY16550	нет	ACP[Aib]DAHLGCISYCA	108
BCY16966	нет	ACSPDAYLGC[tBuGly]SYCA	109
BCY16051	нет	ACSPDAHLGC[tBuGly]SYCA	110
BCY17118	нет	IDSNCPNDAHLGCISYCA	111
BCY17116	нет	WGKSCPDAHLGCISYCA	112

Количество бициклов	N-концевая мод.	Последовательность	SEQ ID №:
BCY16053	нет	ACSPDAYLGCISYCA	113
BCY16557	нет	ACPPDAYLGCISYCA	114
BCY16035	нет	ACS[Aib]DAHLGCISYCA	115
BCY16043	нет	ACSPDAHLGC[Chg]SYCA	116
BCY15769	нет	ACAPDAHLGCISYCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	117
BCY15648	нет	ACYLPDW[tBuAla]CGDEYCA	118
BCY16031	нет	ACSPDAHLGCIS[2Nal]CA	119
BCY16079	нет	ACSPDAHLGCIS[ <sub>3</sub> tBuTyr]CA	120
BCY16036	нет	ACSPD[Aib]HLGCISYCA	121
BCY16029	нет	ACSPDAHLGCIS[1Nal]CA	122
BCY16089	нет	ACSPDAH[tBuAla]GCISYCA	123
BCY16088	нет	ACSPDAH[Cba]GCISYCA	124
BCY16052	нет	ACSPDAHLGCISWCA	125
BCY16033	нет	ACSPD[Abu]HLGCISYCA	126
BCY16039	нет	ACS[Aze]DAHLGCISYCA	127
BCY17988	Ac	CS[Aze]DAHLGCISYC	128
BCY17879	Ac	CS[Aze]DAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	129
BCY17880	AzPro	CS[Aze]DAHLGCISYC	128
BCY16038	Ac	ACSPDDHLGCISYCA	130
BCY16050	нет	ACSPDSHLGCISYCA	131
BCY16034	нет	ACSPDAH[Abu]GCISYCA	132
BCY16032	нет	ACSPDAHLGCIS[4Pal]CA	133
BCY16049	нет	ACP[dA]DAHLGCISYCA	134
BCY16558	нет	ACSPDAYLGC[tBuAla]SYCA	135
BCY16041	нет	ACSPDAHLGC[C5g]SYCA	136
BCY16042	нет	ACSPDAHLGC[Cbg]SYCA	137
BCY16045	нет	ACSPDAHL[dA]CISYCA	138
BCY16037	нет	ACSPDAH[Aib]GCISYCA	139
BCY16044	нет	ACSPDAHLGC[Cpg]SYCA	140
BCY16040	нет	ACSPDAHLGC[B-Melle]SYCA	141
BCY15771	нет	ACSADAHLGCISYCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	142
BCY15772	нет	ACSPAHLGCISYCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	143
BCY15773	нет	ACSPDAALGCISYCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	144
BCY15774	нет	ACSPDAHAGCISYCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	145
BCY15775	нет	ACSPDAHLACISYCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	146
BCY15776	нет	ACSPDAHLGCASYCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	147
BCY15777	нет	ACSPDAHLGCIA YCA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	148
BCY15770	нет	ACSPDAHLGCISACA[Sar] <sub>6</sub> [K-FI]	149
BCY17903	Ac	C[K(N <sub>3</sub> )]PDAHLGCISYC	150

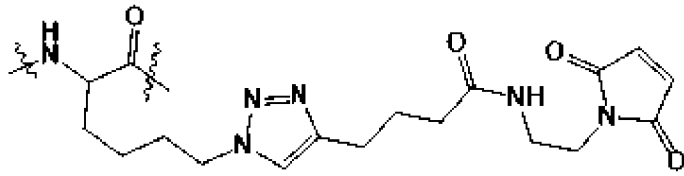
Количество бициклов	N-концевая мод.	Последовательность	SEQ ID №:
BCY17904	Ac	CS[K(N <sub>3</sub> )]DAHLGCISYC	151
BCY17905	Ac	CSPD[K(N <sub>3</sub> )]HLGCISYC	152
BCY23180	нет	C[HyP][HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPW	195
BCY21757	Ac	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWK	245
BCY21758	Ac	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWC	246
BCY23181	нет	C[Oxa][HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPW	196
BCY23182	нет	C[Cis-HyP][HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPW	197
BCY23183	нет	CP[Oxa]DAYLGC[tBuGly]SYCEPW	198
BCY23184	нет	CP[Cis-HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPW	199
BCY23185	нет	CP[HyP]DA[DOPA]LGC[tBuGly]SYCEPW	200
BCY23186	нет	CP[HyP]DA[pCaPhe]LGC[tBuGly]SYCEPW	201
BCY23187	нет	CP[HyP]DA[pCoPhe]LGC[tBuGly]SYCEPW	202
BCY23188	нет	CP[HyP]DA[hTyr]LGC[tBuGly]SYCEPW	203
BCY23189	нет	CP[HyP]DAYL[dS]C[tBuGly]SYCEPW	204
BCY23190	нет	CP[HyP]DAYL[dT]C[tBuGly]SYCEPW	205
BCY23191	нет	CP[HyP]DAYL[dD]C[tBuGly]SYCEPW	206
BCY23192	нет	CP[HyP]DAYL[dE]C[tBuGly]SYCEPW	207
BCY23193	нет	CP[HyP]DAYL[dN]C[tBuGly]SYCEPW	208
BCY23194	нет	CP[HyP]DAYL[dQ]C[tBuGly]SYCEPW	209
BCY23195	нет	CP[HyP]DAYL[dY]C[tBuGly]SYCEPW	210
BCY23196	нет	CP[HyP]DAYLSC[tBuGly]SYCEPW	211
BCY23197	нет	CP[HyP]DAYLDC[tBuGly]SYCEPW	212
BCY23198	нет	CP[HyP]DAYLYC[tBuGly]SYCEPW	213
BCY23199	нет	CP[HyP]DAYLNC[tBuGly]SYCEPW	214
BCY23200	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]S[DOPA]CEPW	215
BCY23201	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]S[pCaPhe]CEPW	216
BCY23202	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]S[pCoPhe]CEPW	217
BCY23203	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]S[hTyr]CEPW	218
BCY23204	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCE[HyP]W	219
BCY23205	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCE[Oxa]W	220
BCY23206	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCE[Cis-HyP]W	221
BCY23207	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPY	222
BCY23208	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEP[DOPA]	223
BCY23209	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEP[pCaPhe]	224
BCY23210	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEP[pCoPhe]	225
BCY23211	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEP[hTyr]	226
BCY23216	нет	CP[HyP]EAYLGC[tBuGly]SYCEPW	227
BCY23217	нет	CP[HyP][Gla]AYLGC[tBuGly]SYCEPW	228
BCY23218	нет	CP[HyP]DAYSGC[tBuGly]SYCEPW	229

Количество бициклов	N-концевая мод.	Последовательность	SEQ ID №:
BCY23219	нет	CP[HyP]DAYTGC[tBuGly]SYCEPW	230
BCY23220	нет	CP[HyP]DAYDGC[tBuGly]SYCEPW	231
BCY23221	нет	CP[HyP]DAYEGC[tBuGly]SYCEPW	232
BCY23222	нет	CP[HyP]DAYNGC[tBuGly]SYCEPW	233
BCY23223	нет	CP[HyP]DAYQGC[tBuGly]SYCEPW	234
BCY23224	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly][HSer]YCEPW	235
BCY23225	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]TYCEPW	236
BCY23226	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]DYCEPW	237
BCY23227	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]EYCEPW	238
BCY23228	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]NYCEPW	239
BCY23229	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]QYCEPW	240
BCY23230	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCDPW	241
BCY23231	нет	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYC[Gla]PW	242
BCY23514	нет	CP[HyP]DAYLGCYSYCEPW	243
BCY23515	нет	CP[HyP]DAYLGC[3HyV]SYCEPW	244

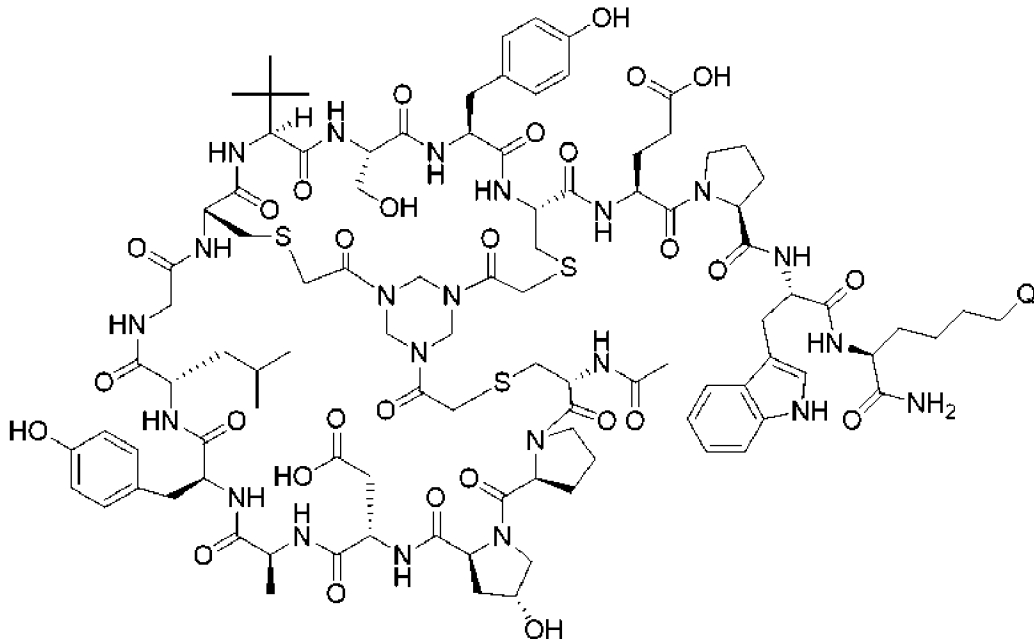
где Ac представляет ацетил, AzPro представляет азидопропил, Abu представляет аминокислоту, Aib представляет аминокислоту, Aze представляет азетидин, B-Melle представляет бета-метилизолейцин, C5g представляет циклопентилглицин, Cba представляет β-циклобутилаланин, Cbg представляет циклобутилглицин, Chg представляет циклогексилглицин, Crg представляет циклопропилглицин, EPA представляет 2-амино-3-этилпентановую кислоту, HyP представляет транс-4-гидрокси-L-пролин, K(N<sub>3</sub>) представляет 6-азидолизин, 1Nal представляет 1-нафтилаланин, 2Nal представляет 2-нафтилаланин, 4Pal представляет 4-пиридилаланин, Pip представляет пипеколиновую кислоту; tBuAla представляет трет-бутилаланин, tBuGly представляет трет-бутилглицин, 3tBuTyr представляет 3-трет-бутилтирозин, Sar представляет саркозин, K-Fl представляет флуоресцеин, присоединенный в 6-положении лизина, Fl-G представляет флуоресцеин, присоединенный к N-концу глицина, NMeTrp представляет N-метилтриптофан, dP представляет D-пролин, dA представляет D-аланин, dW представляет D-триптофан, dS представляет D-серин, dT представляет D-треонин, dD представляет D-аспарагиновую кислоту, dN представляет D-аспарагин, dQ представляет D-глутамин, cis-HyP представляет cis-L-4-гидроксипролин, DOPA представляет 3,4-дигидроксифенилаланин, Gla представляет L-γ-карбоксиглутаминовую кислоту, HSer представляет гомосерин, hTyr представляет гомотирозин, 3HyV представляет 3-гидрокси-L-валин, Oxa представляет оксазолидин-4-карбоновую кислоту, pCaPhe представляет L-4-карбамоилфенилаланин, pCoPhe



представляет 4-карбоксит-L-фенилаланин и  $[K(N_3)(PYA\text{-малеимид})]$  представляет модифицированный лизин, имеющий следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд имеет структуру:



или ее соль, где Q представляет собой  $N_3$  (BCY17901, SEQ ID №: 92),  $NH_2$  (BCY21758, SEQ ID №: 245), SH (BCY21758, SEQ ID №: 246), конъюгирующий линкер или конъюгирующий линкер, ковалентно связанный с олигонуклеотидом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит аминокислотную последовательность, выбранную из CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWK (SEQ ID №: 245, именуемую в данном документе как BCY21757) и CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWC (SEQ ID №: 246, именуемую в данном документе как BCY21758), где HyP представляет собой транс-4-гидрокси-L-пролин, а tBuGly представляет собой трет-бутилглицин. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит N-концевую ацетильную группу и C-концевую группу  $CONH_2$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения первый, второй и третий остатки цистеина в составе бициклического лиганда ковалентно связаны с молекулярным каркасом, так что на молекулярном каркасе образуются две полипептидные петли. В некоторых вариантах осуществления молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

#### *Рецептор трансферрина*

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд способен взаимодействовать рецептором трансферрина 1 типа. В некоторых вариантах

осуществления изобретения бициклический лиганд способен связываться с рецептором трансферрина 1 типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд способен связываться с рецептором трансферрина 1 типа, не препятствуя при этом связыванию природного лиганда трансферрина. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд ингибирует связывание природного лиганда трансферрина.

#### **Некоторые конъюгирующие линкеры**

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения содержат олигонуклеотид и конъюгирующую группу, причем конъюгирующая группа содержит конъюгирующий фрагмент и конъюгирующий линкер. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер связывает конъюгирующий фрагмент с олигонуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер представляет собой одинарную химическую связь (т.е. конъюгирующий фрагмент присоединен непосредственно к олигонуклеотиду посредством одинарной связи). В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит один или более атомов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит химическую группу. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит цепную структуру, такую как гидрокарбильная цепь, или олигомер повторяющихся звеньев, таких как этиленгликоль, нуклеозиды или аминокислотные звенья. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид представляет собой модифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент представляет собой бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит две полипептидные петли, прикрепленные к молекулярному каркасу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит одну или более групп, выбранных из алкила, amino, оксо, амида, дисульфида, полиэтиленгликоля, простого эфира, тиоэфира и гидроксиламино. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит группы, выбранные из алкильных, amino, оксо, амидных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит группы, выбранные из алкильных и амидных групп. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит группы, выбранные из алкильных и простых эфирных групп. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит по меньшей мере один фосфорный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер содержит по меньшей мере одну фосфатную группу. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий линкер включает по меньшей мере одну нейтральную связывающую группу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры,

включая конъюгирующие линкеры, описанные выше, представляют собой бифункциональные связывающие фрагменты, например, те, которые известны в данной области техники как полезные для присоединения конъюгирующих фрагментов к исходным соединениям, таким как олигонуклеотиды, представленные в данном документе. В общем, бифункциональный связывающий фрагмент содержит по меньшей мере две функциональные группы. Одну из функциональных групп выбирают для реакции с конкретным сайтом исходного соединения, а другую выбирают для реакции с пептидным удлинителем. Примеры функциональных групп, используемых в бифункциональном связывающем фрагменте, включают, но не ограничиваясь этим, электрофилы для взаимодействия с нуклеофильными группами и нуклеофилы для взаимодействия с электрофильными группами. В некоторых вариантах осуществления изобретения бифункциональные связывающие фрагменты содержат одну или более групп, выбранных из амина, гидроксила, карбоновой кислоты, тиола, алкила, алкенила и алкинила.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры содержат химические группы, которые образуются в результате реакции между первой функциональной группой и второй функциональной группой. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид присоединяется к первой функциональной группе во время синтеза, а конъюгирующий фрагмент присоединяется ко второй функциональной группе во время синтеза. Затем два соединения смешивают в определенных условиях с получением конечного олигомерного соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент представляет собой бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит две полипептидные петли, прикрепленные к молекулярному каркасу. Такие реакции, совместимые с химией как олигонуклеотидов, так и пептидов, были описаны ранее и часто называются реакциями «биокоъюгации». Эти реакции включают стимулированное штаммом азидоалкиновое циклоприсоединение (SPAAC), катализируемую медью клик-реакцию (CuAAC), коъюгацию активного сложного эфира с аминомодифицированным олигонуклеотидом, присоединение малеимида-тиола по Михаэлю, лигирование кетол/гидроксиламин, лигирование Штаудингера, восстановительное аминирование, образование тиоэфира, образование дисульфида, восстановительное алкилирование, N-арилирование без катализатора, клик-реакция обмена фторида серы (SuFEx) и обратная реакция Дильса-Альдера. Некоторые такие реакции описаны, например, в Jbara, et al., “Oligonucleotide Bioconjugation with Bifunctional Palladium Reagents”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2021, 60(21):12109-12115; Dong, et al., “Sulfur(VI) Fluoride Exchange (SuFEx): Another Good Reaction for Click Chemistry,” *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, 53(36):9430-9448.4; Zhang, et al., “Arylation Chemistry for Bioconjugation,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019; 58(15): 4810-4839; Walsh, et al., “Site-selective modification strategies in antibody-drug conjugates” *Chem. Soc. Rev.*, 2021, 50: 1305-1353; Tiefenbrunn, et al., “Chemoselective ligation techniques: modern applications of time-honored chemistry”, *Biopolymers*, 2010, 94(1):95-106; Drake, et al., *Bioconjug. Chem.* 2014,

25(7):1331-1341; Bode, *Acc. Chem. Res.*, 2017, 50, 9, 2104-2115; J. Magano, B. Bock, et al, *Org. Proc. Res. Dev.* 2014, 18:142-151; Craig S. McKay and M.G. Finn, "Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation", *Chemistry & Biology* 2014; Mitchell P. Christy et al., *Org. Lett.* 2020, 22: 2365; Ren et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009, 48, 9658-9662; Rohrbacher, F. et al., *Helv. Chim. Acta.* 2018, 101; Baalman, et al, "A Bioorthogonal Click Chemistry Toolbox for Targeted Synthesis of Branched and Well-Defined Protein-Protein Conjugates", *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020 (59): 12885-12893; Lang, et al, "Biorthogonal Reactions for Labeling Proteins", *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 9(1):16-20; Nair, et al., "The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry", *Chem. Mater.* 2013 26(1):724-744; Kalia and Raines, "Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47:7523-7526.

Примеры конъюгирующий линкеров включают, но не ограничиваясь ими, пирролин, 8-амино-3,6-диоксооктановую кислоту (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) и 6-аминогексановую кислоту (АНЕХ или АНА). Другие конъюгирующие линкеры включают, но не ограничиваясь ими, замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил, замещенный или незамещенный C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенил или замещенный или незамещенный C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкинил, причем неограничивающий список предпочтительных замещающих групп включает гидроксил, amino, алкокси, карбокси, бензил, фенил, нитро, тиол, тиоалкокси, галоген, алкил, арил, алкенил и алкинил.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит N-концевую или C-концевую удлиняющую азидную группу, которая необязательно может быть присоединена к олигомерному соединению путем циклоприсоединения с бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-илметилкарбамат-олиго или 2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамид-олиго. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит удлиняющую N-концевую или C-концевую амидную группу, которая необязательно может быть присоединена к олигомерному соединению путем сочетания с олиго-7-амидо-7-оксогептановой кислотой. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит удлиняющую N-концевую или C-концевую 2-(аминоокси)ацетамидную группу, которая необязательно может быть присоединена к олигомерному соединению путем конденсации с 5-оксо-5-(4-оксопиперидин-1-ил)пентанамид-олиго. В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклический лиганд содержит удлиняющую N-концевую или C-концевую тиольную группу, которая необязательно может быть присоединена к олигомерному соединению путем добавления к 3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропенамид-олиго.

В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры содержат 1-10 линкер-нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры содержат 2-5 линкер-нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры содержат точно 3 линкер-нуклеозида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры

содержат мотив ТСА. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие линкер-нуклеозиды представляют собой модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения такие линкер-нуклеозиды содержат модифицированный сахарный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер-нуклеозиды являются немодифицированными. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер-нуклеозиды содержат необязательно защищенное гетероциклическое основание, выбранное из пурина, замещенного пурина, пиримидина или замещенного пиримидина. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой нуклеозид, выбранный из урацила, тимина, цитозина, 4-N-бензоилцитозина, 5-метилцитозина, 4-N-бензоил-5-метилцитозина, аденина, 6-N-бензоиладенина, гуанина и 2-N-изобутирилгуанина. Обычно желательно, чтобы линкер-нуклеозиды отщеплялись от олигомерного соединения после того, как оно достигнет ткани-мишени. Соответственно, линкер-нуклеозиды обычно связаны друг с другом и с остальной частью олигомерного соединения посредством расщепляемых связей. В некоторых вариантах осуществления изобретения такими расщепляемыми связями являются фосфодизфирные связи.

В данном документе линкер-нуклеозиды не считаются частью олигонуклеотида. Соответственно, в вариантах осуществления, в которых олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, состоящий из определенного количества или диапазона связанных нуклеозидов и/или определенного процента комплементарности эталонной нуклеиновой кислоте, и олигомерное соединение также содержит конъюгирующий линкер, содержащий линкер-нуклеозиды, эти линкер-нуклеозиды не учитываются при расчете длины олигонуклеотида и не используются при определении процента комплементарности олигонуклеотида эталонной нуклеиновой кислоте. Например, олигомерное соединение может содержать (1) олигонуклеотид, состоящий из 8-30 нуклеозидов, и (2) конъюгирующий линкер, содержащий 1-10 линкер-нуклеозидов, которые смежные с нуклеозидами олигонуклеотида. Общее количество смежных связанных нуклеозидов в таком олигомерном соединении составляет более 30. Альтернативно, олигомерное соединение может содержать олигонуклеотид, состоящий из 8-30 нуклеозидов и не содержащий конъюгирующего линкера. Общее количество смежных связанных нуклеозидов в таком олигомерном соединении составляет не более 30. Если не указано иное, конъюгирующие линкеры содержат не более 10 линкер-нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры содержат не более 5 линкер-нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры содержат не более 3 линкер-нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры содержат не более 2 линкер-нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующие линкеры содержат не более 1 линкер-нуклеозида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения желательно, чтобы конъюгирующий фрагмент был отщеплен от олигонуклеотида. Например, в определенных

обстоятельствах олигомерные соединения, содержащие конкретный конъюгирующий фрагмент, лучше усваиваются определенным типом клеток, но как только олигомерное соединение поглощено, желательно, чтобы конъюгирующий фрагмент был расщеплен с высвобождением неконъюгированного или исходного олигонуклеотида. Таким образом, некоторые конъюгирующие линкеры могут содержать один или более расщепляемых фрагментов. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемую связь. В некоторых вариантах реализации расщепляемый фрагмент представляет собой группу атомов, содержащую по меньшей мере одну расщепляемую связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент содержит группу атомов, содержащую одну, две, три, четыре или более четырех расщепляемых связей. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент избирательно расщепляется внутри клетки или субклеточного компартмента, такого как лизосома. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент селективно расщепляется эндогенными ферментами, такими как нуклеазы.

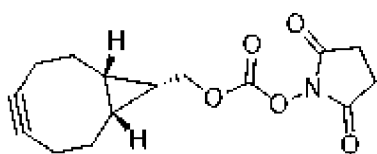
В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемую связь выбирают из: амида, сложного эфира, простого эфира, одного или обоих сложных эфиров фосфодиэфира, сложного фосфатного эфира, карбамата или дисульфида. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемая связь представляет собой один или оба сложных эфира фосфодиэфира. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент содержит фосфат или фосфодиэфир. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент представляет собой фосфодиэфирную связь между олигонуклеотидом и конъюгирующим фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент содержит или состоит из одного или более линкер-нуклеозидов. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения один или более линкер-нуклеозидов связаны друг с другом и/или с остальной частью олигомерного соединения посредством расщепляемых связей. В некоторых вариантах осуществления изобретения такими расщепляемыми связями являются немодифицированные фосфодиэфирные связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксинуклеозид, который присоединен либо к 3'-, либо к 5'-концевому нуклеозиду олигонуклеотида посредством фосфатной межнуклеозидной связи и ковалентно присоединен к остатку конъюгирующего линкера или конъюгирующего фрагмента посредством фосфатной или фосфоротиоатной связи. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой 2'-дезоксаденозин.

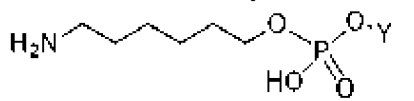
В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения, раскрытые в данном документе, содержат олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем олигомерное соединение получают с использованием клик-химии, известной в данной области техники. Соединения

были получены с использованием клик-химии, причем алкинилфосфонатные межнуклеозидные связи на олигомерном соединении, прикрепленном к твердой основе, превращают в 1,2,3-триазилилфосфонатные межнуклеозидные связи, а затем отщепляют от твердой основы (Krishna *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*(28), 11618-11631), который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Дополнительные конъюгирующие линкеры, подходящие для использования в нескольких вариантах осуществления, можно получить с помощью клик-химии, описанной в “Click Chemistry for Biotechnology and Materials Science” Ed. Joerg Laham, Wiley 2009, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

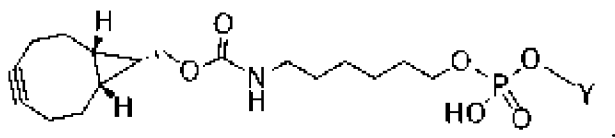
В некоторых вариантах осуществления изобретения для соединения конъюгирующего фрагмента и олигонуклеотида можно использовать клик-реакцию путем приведения в контакт:



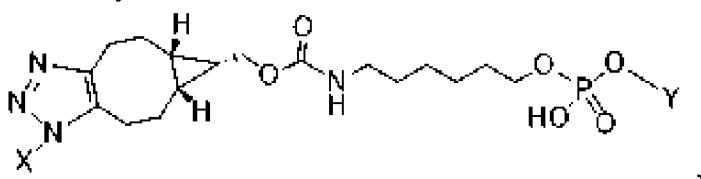
с олигонуклеотидом, содержащим терминальный амин, включая, но не ограничиваясь этим, следующие соединения:



где Y представляет собой оставшуюся часть олигонуклеотида, чтобы получить:

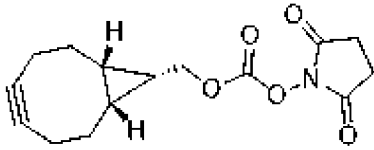


который можно приводить в контакт с конъюгирующим фрагментом, содержащим азид, чтобы получить:

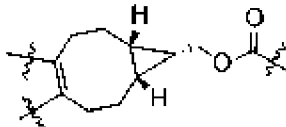


где N-N=N образуется из азидо-группы конъюгирующего фрагмента, и X представляет оставшуюся часть конъюгирующего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к боковой цепи аминокислоты полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к N-концу полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа заменяет аминогруппу лизина полипептида.

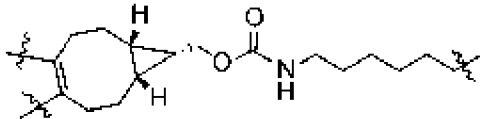
В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер получен из следующего соединения:



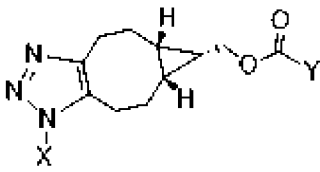
В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:



В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:



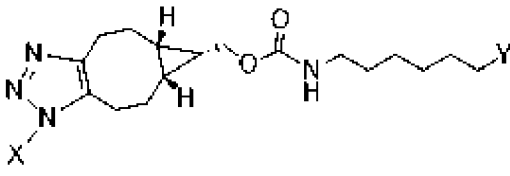
В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем соединение содержит:



где N-N=N образуется из азидо-группы конъюгирующего фрагмента; X представляет оставшуюся часть конъюгирующего фрагмента; и Y представляет часть олигомерного соединения, содержащего олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к боковой цепи аминокислоты полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к N-концу полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа заменяет аминогруппу лизина полипептида.

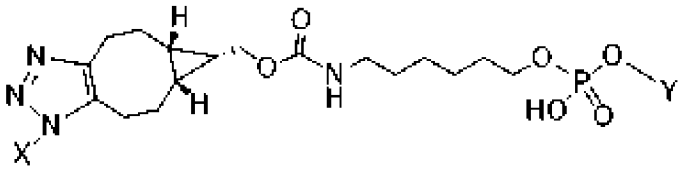
В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем олигомерное соединение содержит:





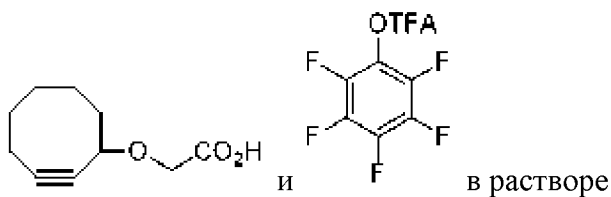
где N-N=N образуется из азидо-группы конъюгирующего фрагмента; X представляет оставшуюся часть конъюгирующего фрагмента; и Y представляет оставшуюся часть олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к боковой цепи аминокислоты полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к N-концу полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа заменяет аминогруппу лизина полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем олигомерное соединение содержит:

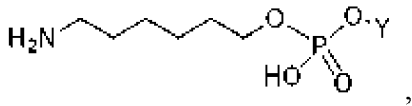


где N-N=N образуется из азидо-группы конъюгирующего фрагмента; X представляет оставшуюся часть конъюгирующего фрагмента; и Y представляет оставшуюся часть олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к боковой цепи аминокислоты полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к N-концу полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа заменяет аминогруппу лизина полипептида.

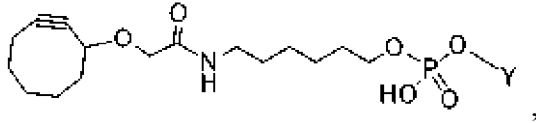
В некоторых вариантах осуществления изобретения для соединения конъюгирующего фрагмента и олигонуклеотида можно использовать клик-реакцию путем приведения в контакт:



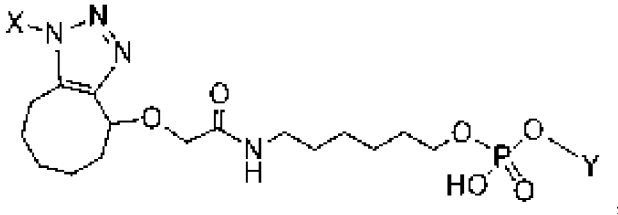
с олигонуклеотидом, содержащим терминальный амин, включая, но не ограничиваясь этим, следующие соединения:



где Y представляет собой оставшуюся часть олигонуклеотида, чтобы получить:

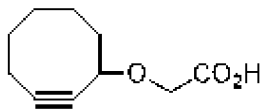


который можно приводить в контакт с конъюгирующим фрагментом, содержащим азид, чтобы получить:

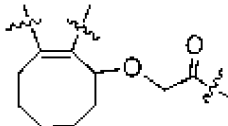


где N-N=N образуется из азидо-группы конъюгирующего фрагмента, и X представляет оставшуюся часть конъюгирующего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к боковой цепи аминокислоты полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к N-концу полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа заменяет аминогруппу лизина полипептида.

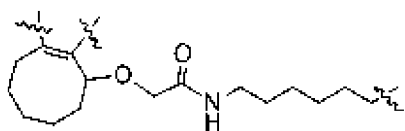
В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер получен из следующего соединения:



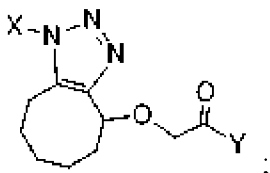
В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:



В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:

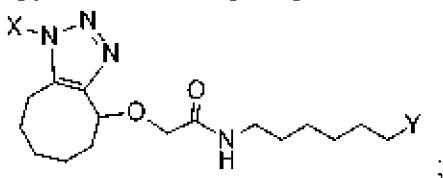


В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем соединение содержит:



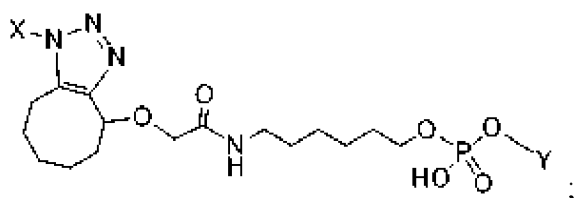
где N-N=N образуется из азидо-группы конъюгирующего фрагмента; X представляет оставшуюся часть конъюгирующего фрагмента; и Y представляет часть олигомерного соединения, содержащего олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к боковой цепи аминокислоты полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к N-концу полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа заменяет аминогруппу лизина полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем олигомерное соединение содержит:



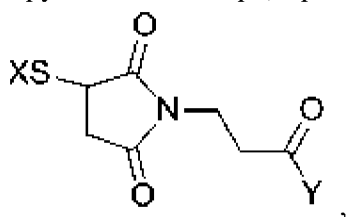
где N-N=N образуется из азидо-группы конъюгирующего фрагмента; X представляет оставшуюся часть конъюгирующего фрагмента; и Y представляет оставшуюся часть олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к боковой цепи аминокислоты полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к N-концу полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа заменяет аминогруппу лизина полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем олигомерное соединение содержит:



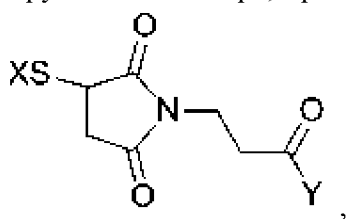
где N-N=N образуется из азидо-группы конъюгирующего фрагмента; X представляет оставшуюся часть конъюгирующего фрагмента; и Y представляет оставшуюся часть олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит бициклический лиганд. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующий фрагмент содержит полипептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к боковой цепи аминокислоты полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа присоединена к N-концу полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения азидо-группа заменяет аминогруппу лизина полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем олигомерное соединение содержит:



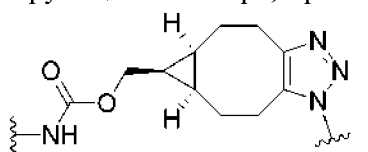
где X содержит конъюгирующий фрагмент; и Y содержит олигонуклеотид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем олигомерное соединение содержит:



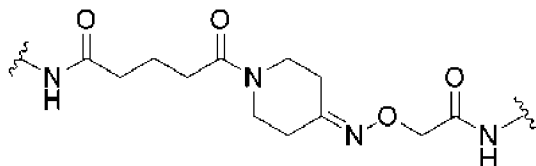
где X содержит олигонуклеотид; и Y содержит конъюгирующий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:

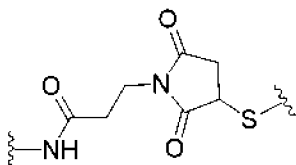


В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством

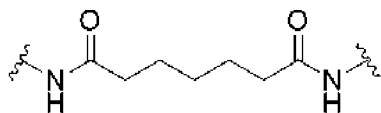
конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:



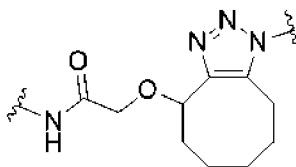
В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:



В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:



В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение содержит олигонуклеотид, связанный с конъюгирующим фрагментом посредством конъюгирующего линкера, причем конъюгирующий линкер содержит:



Синтетические способы, описывающие получение вышеприведенных исходных материалов и промежуточных соединений, можно найти в одном или более из следующего списка: Agard, et al., “A Strain-Promoted [3+2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems.” *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126:15046- 15047; Lang, et al, “Biorthogonal Reactions for Labeling Proteins”, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 9(1):16-20; Nair, et al., “The Thiol-Michael Addition Click Reaction: A Powerful and Widely Used Tool in Materials Chemistry”, *Chem. Mater.* 2013 26(1):724-744; WO2011/136645; Kömel and Kool, “Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis, *Chem. Rev.*, 2017, 117:10358-10376; Wang, et al., “Polyfluorophenyl Ester-Terminated Homobifunctional CrossLinkers for Protein Conjugation”, *Synlett*, 2017, 28: 1934-1938; Kishimoto, et al, “Site-Specific Chemical Conjugation of Antibodies by Using Affinity Peptide for the Development of Therapeutic Antibody Format”, *Bioconj. Chem.*, 2019, 30:698-702.

#### **Некоторые олигонуклеотиды**

В некоторых вариантах осуществления в данном документе представлены олигомерные соединения, содержащие олигонуклеотиды, которые состоят из связанных

нуклеозидов. Олигонуклеотиды могут представлять собой немодифицированные олигонуклеотиды (РНК или ДНК) или могут представлять собой модифицированные олигонуклеотиды. Модифицированные олигонуклеотиды содержат по меньшей мере одну модификацию по сравнению с немодифицированной РНК или ДНК. Следовательно, модифицированные олигонуклеотиды содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеозид (содержащий модифицированный сахарный фрагмент и/или модифицированное нуклеиновое основание) и/или по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

#### **Некоторые модифицированные нуклеозиды**

Модифицированные нуклеозиды включают модифицированный сахарный фрагмент или модифицированное нуклеиновое основание, или как модифицированный сахарный фрагмент, так и модифицированное нуклеиновое основание.

#### **Некоторые фрагменты сахара**

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные фрагменты сахара представляют собой небциклические модифицированные фрагменты сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные фрагменты сахаров представляют собой бициклические или трициклические фрагменты сахаров. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные фрагменты сахаров представляют собой заменители сахаров. Такие заменители сахаров могут содержать одну или более замен, соответствующих заменам других типов модифицированных фрагментов сахаров.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные фрагменты сахаров представляют собой небциклические модифицированные фрагменты сахаров, содержащие фуранозильное кольцо с одной или более замещающими группами, ни одна из которых не соединяет два атома фуранозильного кольца с образованием бициклической структуры. Такие немостиковые заместители могут находиться в любом положении фуранозила, включая, но не ограничиваясь этим, заместители в положениях 2', 4' и/или 5'. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более немостиковых заместителей в небциклических модифицированных фрагментах сахаров являются разветвленными. Примеры 2'-заместителей, подходящих для небциклических модифицированных фрагментов сахаров, включают, но не ограничиваясь этим: 2'-F, 2'-OCH<sub>3</sub> («ОМе» или «О-метил») и 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> («МОЕ»). В некоторых вариантах осуществления изобретения группы 2'-заместителей выбраны из: галогена, аллила, амина, азидо, SH, CN, OCN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкокси, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> замещенного алкокси, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкила, O-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> замещенного алкила, S-алкила, N(R<sub>m</sub>)-алкила, O-алкенила, S-алкенила, N(R<sub>m</sub>)-алкенила, O-алкинила, S-алкинила, N(R<sub>m</sub>)-алкинила, O-алкиленил-O-алкила, алкинила, алкарила, аралкила, O-алкарила, O-аралкила, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>) или OCH<sub>2</sub>C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), где каждый R<sub>m</sub> и R<sub>n</sub> независимо представляет собой H, аминоксильную группу или замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил, и группы 2'-заместителей описаны в Cook et al., патент США № 6531584; Cook et al., патент США №

5859221; и Cook et al., патент США № 6005087. Некоторые варианты осуществления этих групп 2'-заместителей могут быть дополнительно замещены одной или более группами заместителей, независимо выбранными из: гидроксила, амина, алкокси, карбокси, бензила, фенила, нитро (NO<sub>2</sub>), тиола, тиоалкокси, тиоалкила, галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила. Примеры групп 4'-заместителей, подходящих для небциклических модифицированных фрагментов сахаров, включают, но не ограничиваясь этим, алкокси (например, метокси), алкил и группы, описанные в Manoharan et al., WO 2015/106128. Примеры 5'-заместителей, подходящих для небциклических модифицированных фрагментов сахаров, включают, но не ограничиваясь этим: 5'-метил (R или S), 5'-винил и 5'-метокси. В некоторых вариантах реализации небциклические модифицированные фрагменты сахаров содержат более одного немостикового заместителя сахара, например, 2'-F-5'-метилсахарные фрагменты, а также модифицированные сахарные фрагменты и модифицированные нуклеозиды, описанные в Migawa et al., WO 2008/101157 и Rajeev et al., US2013/0203836.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-замещенный небциклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиковую группу 2'-заместителя, выбранную из: F, NH<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и N-замещенного ацетамида (OCH<sub>2</sub>C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>)), где каждый R<sub>m</sub> и R<sub>n</sub> независимо представляет собой H, амина-защитную группу или замещенный или незамещенный C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкил.

В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-замещенный небциклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиковую группу 2'-заместителя, выбранную из: F, OCF<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и OCH<sub>2</sub>C(=O)-N(H)CH<sub>3</sub> («NMA»).

В некоторых вариантах осуществления изобретения 2'-замещенный небциклический модифицированный нуклеозид содержит сахарный фрагмент, содержащий немостиковую группу 2'-заместителя, выбранную из: F, OCH<sub>3</sub> и OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>.

Некоторые модифицированные фрагменты сахаров содержат заместитель, который соединяет в виде мостика два атома фуранозильного кольца с образованием второго кольца, в результате чего образуется бициклический фрагмент сахара. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения бициклический фрагмент сахара содержит мостик между 4'- и 2'-атомами фуранозного кольца. Примеры таких 4'-2'-мостиковых заместителей сахаров включают, но не ограничиваясь этим: 4'-CH<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-2' («LNA»), 4'-CH<sub>2</sub>-S-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' («ENA»), 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' (именуемый «ограниченный этил» или «cEt»), 4'-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-2', 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2', 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2' («ограниченный МОЕ» или «сМОЕ») и его аналоги (см., например, Seth et al., U.S. 7399845, Bhat et al., U.S. 7569686, Swayze et al., U.S. 7741457, и Swayze et al., U.S. 8022193), 4'-

$C(CH_3)(CH_3)-O-2'$  и его аналоги (см., например, Seth et al., U.S. 8278283),  $4'-CH_2-N(OCH_3)-2'$  и его аналоги (см., например, Prakash et al., U.S. 8278425),  $4'-CH_2-O-N(CH_3)-2'$  (см., например, Allerson et al., U.S. 7696345 и Allerson et al., U.S. 8124745),  $4'-CH_2-C(H)(CH_3)-2'$  (см., например, Zhou, *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134),  $4'-CH_2-C(=CH_2)-2'$  и его аналоги (см., например, Seth et al., U.S. 8278426),  $4'-C(-R_aR_b)-N(R)-O-2'$ ,  $4'-C(R_aR_b)-O-N(R)-2'$ ,  $4'-CH_2-O-N(R)-2'$  и  $4'-CH_2-N(R)-O-2'$ , причем каждый R,  $R_a$  и  $R_b$  независимо представляет собой H, защитную группу или  $C_1-C_{12}$  алкил (см., например, Imanishi et al., U.S. 7427672).

В некоторых вариантах осуществления изобретения такие  $4'-2'$  мостики независимо содержат от 1 до 4 связанных групп, независимо выбранных из:  $-[C(R_a)(R_b)]_n-$ ,  $-[C(R_a)(R_b)]_n-O-$ ,  $-C(R_a)=C(R_b)-$ ,  $-C(R_a)=N-$ ,  $C(=NR_a)-$ ,  $-C(=O)-$ ,  $-C(=S)-$ ,  $-O-$ ,  $-Si(R_a)_2-$ ,  $-S(=O)_x-$  и  $-N(R_a)-$ ;

где: x равен 0, 1 или 2; n равен 1, 2, 3 или 4; каждый  $R_a$  и  $R_b$  независимо представляет собой H, защитную группу, гидроксил,  $C_1-C_{12}$  алкил, замещенный  $C_1-C_{12}$  алкил,  $C_2-C_{12}$  алкенил, замещенный  $C_2-C_{12}$  алкенил,  $C_2-C_{12}$  алкинил, замещенный  $C_2-C_{12}$  алкинил,  $C_5-C_{20}$  арил, замещенный  $C_5-C_{20}$  арил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал, гетероарил, замещенный гетероарил,  $C_5-C_7$  алициклический радикал, замещенный  $C_5-C_7$  алициклический радикал, галоген,  $OJ_1$ ,  $NJ_1J_2$ ,  $SJ_1$ ,  $N_3$ ,  $COOJ_1$ , ацил ( $C(=O)-H$ ), замещенный ацил,  $CN$ , сульфонил ( $S(=O)_2-J_1$ ) или сульфоксил ( $S(=O)-J_1$ ); и

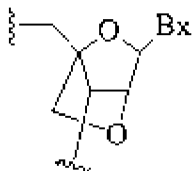
каждый  $J_1$  и  $J_2$  независимо представляет собой H,  $C_1-C_{12}$  алкил, замещенный  $C_1-C_{12}$  алкил,  $C_2-C_{12}$  алкенил, замещенный  $C_2-C_{12}$  алкенил,  $C_2-C_{12}$  алкинил, замещенный  $C_2-C_{12}$  алкинил,  $C_5-C_{20}$  арил, замещенный  $C_5-C_{20}$  арил, ацил ( $C(=O)-H$ ), замещенный ацил, гетероциклический радикал, замещенный гетероциклический радикал,  $C_1-C_{12}$  аминоалкил, замещенный  $C_1-C_{12}$  аминоалкил или защитную группу.

Дополнительные бициклические фрагменты сахаров известны в данной области техники, см., например: Freier *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(22), 4429-4443, Albaek *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2006, 71, 7731-7740, Singh *et al.*, *Chem. Commun.*, 1998, 4, 455-456; Koshkin *et al.*, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630; Kumar *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222; Singh *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039; Srivastava *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 20017, 129, 8362-8379; Wengel *et al.*, U.S. 7053207; Imanishi *et al.*, U.S. 6268490; Imanishi *et al.* U.S. 6770748; Imanishi *et al.*, U.S. RE44779; Wengel *et al.*, U.S. 6794499; Wengel *et al.*, U.S. 6670461; Wengel *et al.*, U.S. 7034133; Wengel *et al.*, U.S. 8080644; Wengel *et al.*, U.S. 8034909; Wengel *et al.*, U.S. 8153365; Wengel *et al.*, U.S. 7572582; и Ramasamy *et al.*, U.S. 6525191; Torsten *et al.*, WO 2004/106356; Wengel *et al.*, WO 1999/014226; Seth *et al.*, WO 2007/134181; Seth *et al.*, U.S. 7547684; Seth *et al.*, U.S. 7666854; Seth *et al.*, U.S. 8088746; Seth *et al.*, U.S. 7750131; Seth *et al.*, U.S. 8030467; Seth *et al.*, U.S. 8268980; Seth *et al.*, U.S. 8546556; Seth *et al.*, U.S. 8530640; Migawa *et al.*, U.S. 9012421; Seth *et al.*, U.S. 8501805; и патентные публикации США № Allerson *et al.*, US2008/0039618 и Migawa *et al.*, US2015/0191727.

В некоторых вариантах осуществления изобретения бициклические фрагменты сахаров и нуклеозиды, включающие такие бициклические фрагменты сахаров, дополнительно определяются по изомерной конфигурации. Например, нуклеозид LNA (описанный в данном документе) может находиться в конфигурации  $\alpha-L$  или в



конфигурации  $\beta$ -D.



LNA ( $\beta$ -D-конфигурация)  $\alpha$ -L-LNA ( $\alpha$ -L-конфигурация)

мостик = 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'



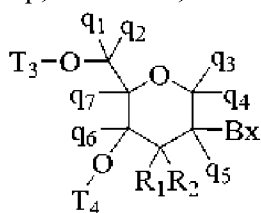
мостик = 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'

Бициклические нуклеозиды  $\alpha$ -L-метиленокси (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') или  $\alpha$ -L-LNA были включены в олигонуклеотиды, которые проявляли антисмысловую активность (Frieden et al., *Nucleic Acids Research*, 2003, 21, 6365-6372). В данном документе общие описания бициклических нуклеозидов включают обе изомерные конфигурации. Когда положения конкретных бициклических нуклеозидов (например, LNA или cEt) идентифицируются в приведенных в качестве примера вариантах осуществления, они находятся в конфигурации  $\beta$ -D, если не указано иное.

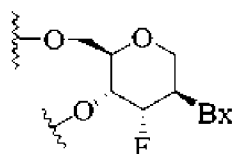
В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные фрагменты сахаров содержат один или более немостиковых заместителей сахара и один или более мостиковых заместителей сахара (например, 5'-замещенные и 4'-2'-мостиковые сахара).

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные фрагменты сахаров представляют собой заменители сахаров. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения атом кислорода фрагмента сахара заменен, например, атомом серы, углерода или азота. В некоторых таких вариантах осуществления такие модифицированные фрагменты сахаров также содержат мостиковые и/или немостиковые заместители, как описано в данном документе. Например, некоторые заменители сахара содержат 4'-атом серы и замену в 2'-положении (см., например, Bhat et al., U.S. 7875733 и Bhat et al., U.S. 7939677) и/или в 5'-положении.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заменители сахара содержат кольца, содержащие иное количество, чем 5 атомов. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения заменитель сахара содержит шестичленный тетрагидропиран («ТНР»). Такие тетрагидропираны могут быть дополнительно модифицированы или замещены. Нуклеозиды, содержащие такие модифицированные тетрагидропираны, включают, но не ограничиваясь этим, гекситолнуклеиновую кислоту («HNA»), анитолнуклеиновую кислоту («ANA»), манитолнуклеиновую кислоту («MNA») (см., например, Leumann, *CJ. Bioorg. & Med. Chem.* 2002, 10, 841-854), фтор-HNA:



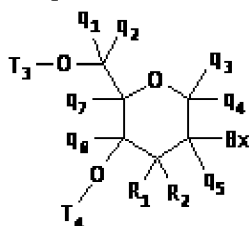
VII



F-HNA

(«F-HNA»), см., например, Swayze et al., U.S. 8088904; Swayze et al., U.S. 8440803;

Swayze et al., U.S. 8796437; и Swayze et al., U.S. 9005906; F-HNA также может именоваться как F-ТНР или 3'-фтортетрагидропиран), и нуклеозиды, содержащие дополнительные модифицированные соединения ТНР, имеющие формулу:



причем независимо для каждого из указанных модифицированных нуклеозидов ТНР:

Vx представляет собой фрагмент нуклеинового основания;

каждый из T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> независимо представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую модифицированный нуклеозид ТНР с остатком олигонуклеотида, или один из T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> представляет собой межнуклеозидную связывающую группу, связывающую модифицированный нуклеозид ТНР с остатком олигонуклеотида, а другой из T<sub>3</sub> и T<sub>4</sub> представляет собой H, защитную группу для гидроксила, связанный конъюгирующий фрагмент или 5'- или 3'-концевую группу;

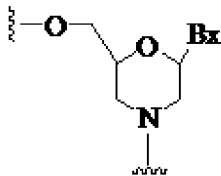
q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub>, каждый независимо, представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, замещенный C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил или замещенный C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> алкинил; и

каждый из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> независимо выбран из: водорода, галогена, замещенного или незамещенного алкокси, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, NJ<sub>3</sub>C(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub> и CN, где X представляет собой O, S или NJ<sub>1</sub>, и каждый J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub> и J<sub>3</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил.

В некоторых вариантах осуществления представлены модифицированные нуклеозиды ТНР, причем каждый из q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub> представляет собой H. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub> отличен от H. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один из q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> и q<sub>7</sub> представляет собой метил. В некоторых вариантах осуществления представлены модифицированные нуклеозиды ТНР, в которых один из R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> представляет собой F. В некоторых вариантах осуществления изобретения R<sub>1</sub> представляет собой F и R<sub>2</sub> представляет собой H, в некоторых вариантах осуществления изобретения R<sub>1</sub> представляет собой метокси, а R<sub>2</sub> представляет собой H, а в некоторых вариантах осуществления R<sub>1</sub> представляет собой метоксиэтокси и R<sub>2</sub> представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заменители сахара содержат кольца, содержащие более 5 атомов и более одного гетероатома. Например, сообщалось о нуклеозидах, содержащих морфолиносахарные фрагменты, и их использовании в олигонуклеотидах (см., например, Braasch et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510 и Summerton et al., U.S. 5698685; Summerton et al., U.S. 5166315; Summerton et al., U.S. 5185444; и Summerton et al., U.S. 5034506). При использовании в данном документе, термин

«морфолино» означает заменитель сахара, имеющий следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления изобретения морфолино можно модифицировать, например, путем добавления или изменения различных групп заместителей из вышеуказанной структуры морфолино. Такие заменители сахара называют в данном документе «модифицированными морфолино».

В некоторых вариантах осуществления изобретения заменители сахара содержат ациклические фрагменты. Примеры нуклеозидов и олигонуклеотидов, содержащих такие заменители ациклических сахаров, включают, но не ограничиваясь этим: пептидную нуклеиновую кислоту («ПНК»), ациклическую бутилнуклеиновую кислоту (см., например, Kumar et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 5853-5865), а также нуклеозиды и олигонуклеотиды, описанные в Manoharan et al., WO2011/133876.

В данной области известны многие другие бициклические и трициклические системы колец сахаров и заместителей сахаров, которые можно использовать в модифицированных нуклеозидах (см., например, обзорную статью: Leumann, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10, 841-854).

#### **Некоторые модифицированные нуклеиновые основания**

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, содержащих немодифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, содержащих модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более нуклеозидов, не содержащих нуклеиновых оснований, называемых нуклеозидами с удаленным основанием.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные нуклеиновые основания выбраны из: 5-замещенных пиримидинов, 6-азапиримидинов, алкил- или алкинилзамещенных пиримидинов, алкилзамещенных пуринов и N-2, N-6 и O-6 замещенных пуринов. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные нуклеиновые основания выбраны из: 2-аминопропиладенина, 5-гидроксиметилцитозина, ксантина, гипоксантина, 2-аминоаденина, 6-N-метилгуанина, 6-N-метиладенина, 2-пропиладенина, 2-тиоурацила, 2-тиотимина и 2-тиоцитозина, 5-пропинил-(-C≡C-CH<sub>3</sub>) урацила, 5-пропинилцитозина, 6-азоурацила, 6-азоцитозина, 6-азотимина, 5-рибозилурацила (псевдоурацила), 4-тиоурацила, 8-галогена, 8-амино, 8-тиола, 8-тиоалкила, 8-гидроксила, 8-аза и других 8-замещенных пуринов, 5-галогена, особенно 5-брома, 5-трифторметила, 5-галогенурацила и 5-галогенцитозина, 7-метилгуанина, 7-метиладенина, 2-F-аденина, 2-аминоаденина, 7-деазагуанина, 7-деазааденина, 3-деазагуанина, 3-

дезааденина, 6-N-бензоиладенина, 2-N-изобутирилгуанина, 4-N-бензоилцитозина, 4-N-бензоилурацила, 5-метил-4-N-бензоилцитозина, 5-метил-4-N-бензоилурацила, универсальных оснований, гидрофобных оснований, неизбирательных оснований, оснований увеличенного размера и фторированных оснований. Дополнительные модифицированные нуклеиновые основания включают трициклические пиримидины, такие как 1,3-диазафеноксазин-2-он, 1,3-диазафенотиазин-2-он и 9-(2-аминоэтоксид)-1,3-диазафеноксазин-2-он (G-зажим). Модифицированные нуклеиновые основания могут также включать те, в которых пуриновое или пиримидиновое основание заменено другими гетероциклами, например 7-дезааденином, 7-дезагуанозином, 2-аминопиридином и 2-пиридином. Дополнительные нуклеиновые основания включают те, которые раскрыты в Merigan et al., патент США 3687808, те, которые раскрыты в *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. and Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; и те, которые раскрыты в главах 6 и 15, *Antisense Drug Technology*, Crooke S.T., Ed., CRC Press, 2008, 163-166 and 442-443.

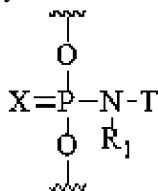
Публикации, в которых описано получение некоторых из вышеупомянутых модифицированных нуклеиновых оснований, а также других модифицированных нуклеиновых оснований, включают, без ограничения, Manoharan et al., US2003/0158403; Manoharan et al., US2003/0175906; Dinh et al., U.S. 4845205; Spielvogel et al., U.S. 5130302; Rogers et al., U.S. 5134066; Bischofberger et al., U.S. 5175273; Urdea et al., U.S. 5367066; Benner et al., U.S. 5432272; Matteucci et al., U.S. 5434257; Gmeiner et al., U.S. 5457187; Cook et al., U.S. 5459255; Froehler et al., U.S. 5484908; Matteucci et al., U.S. 5502177; Hawkins et al., U.S. 5525711; Haralambidis et al., U.S. 5552540; Cook et al., U.S. 5587469; Froehler et al., U.S. 5594121; Switzer et al., U.S. 5596091; Cook et al., U.S. 5614617; Froehler et al., U.S. 5645985; Cook et al., U.S. 5681941; Cook et al., U.S. 5811534; Cook et al., U.S. 5750692; Cook et al., U.S. 5948903; Cook et al., U.S. 5587470; Cook et al., U.S. 5457191; Matteucci et al., U.S. 5763588; Froehler et al., U.S. 5830653; Cook et al., U.S. 5808027; Cook et al., 6166199; и Matteucci et al., U.S. 6005096.

### **Некоторые модифицированные межнуклеозидные связи**

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеозиды модифицированных олигонуклеотидов могут быть связаны друг с другом с использованием любой межнуклеозидной связи. Два основных класса межнуклеозидных связывающих групп определяются наличием или отсутствием атома фосфора. Типичные фосфорсодержащие межнуклеозидные связи включают, но не ограничиваясь этим, фосфодизэфиры («P=O») (также называемые немодифицированными или встречающимися в природе связями или фосфатными связями), фосфотриэфиры, метилфосфонаты, фосфорамидаты и фосфоротиоаты («P=S»), и фосфородитиоаты («HS-P=S»). Типичные, не содержащие фосфор межнуклеозидные связывающие группы включают, но не ограничиваясь этим, метиленметилямино (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>-), тиодизэфир,

тионокарбамат (-O-C(=O)(NH)-S-); силоксан (-O-SiH<sub>2</sub>-O-); и N, N'-диметилгидразин (-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-). Модифицированные межнуклеозидные связи по сравнению с встречающимися в природе фосфодиэфирными связями можно использовать для изменения, обычно повышения, нуклеазной устойчивости олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения межнуклеозидные связи, имеющие хиральный атом, можно получить в виде рацемической смеси или в виде отдельных энантиомеров. Способы получения фосфорсодержащих и не содержащих фосфор межнуклеозидных связей хорошо известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой любую из описанных в WO2021/030778, включенных в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированная межнуклеозидная связь включает формулу:



где независимо для каждой межнуклеозидной связывающей группы модифицированного олигонуклеотида:

X выбран из O или S;

R<sub>1</sub> выбран из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила; и

T выбран из SO<sub>2</sub>R<sub>2</sub>, C(=O)R<sub>3</sub> и P(=O)R<sub>4</sub>R<sub>5</sub>, где:

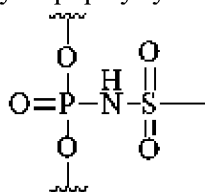
R<sub>2</sub> выбран из арила, замещенного арила, гетероцикла, замещенного гетероцикла, ароматического гетероцикла, замещенного ароматического гетероцикла, диазола, замещенного диазола, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкокси, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкинила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкенила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкинила и конъюгирующей группы;

R<sub>3</sub> выбран из арила, замещенного арила, CH<sub>3</sub>, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub> и конъюгирующей группы;

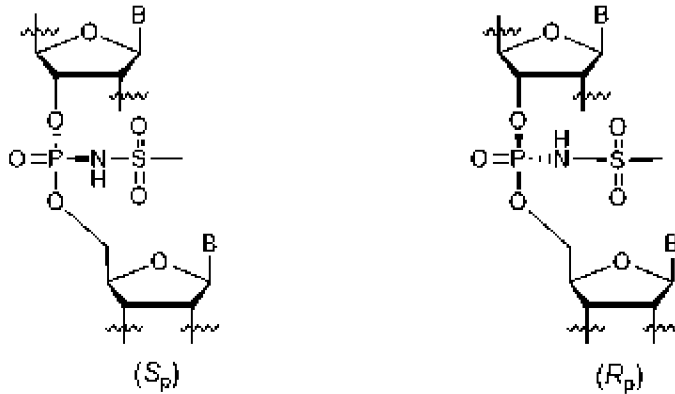
R<sub>4</sub> выбран из OCH<sub>3</sub>, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила, замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и конъюгирующей группы; и

R<sub>5</sub> выбран из OCH<sub>3</sub>, OH, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила и замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкила.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированная межнуклеозидная связь содержит мезилфосфорамидатную связывающую группу, имеющую формулу:

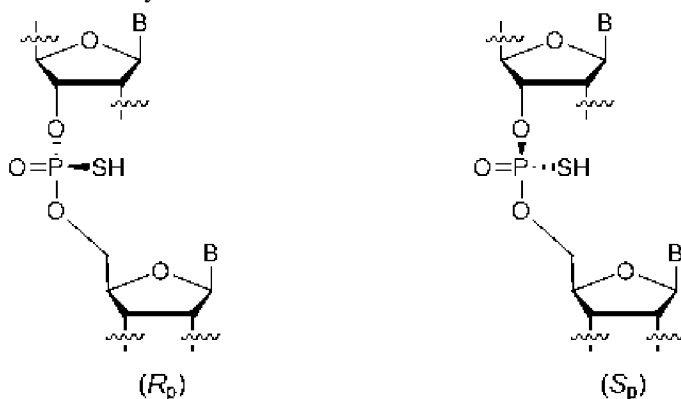


В некоторых вариантах осуществления изобретения мезилфосфорамидатная межнуклеозидная связь может содержать хиральный центр. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды, содержащие (*R<sub>p</sub>*) и/или (*S<sub>p</sub>*) мезилфосфорамидаты, содержат одну или более из следующих формул, соответственно, где «В» обозначает нуклеиновое основание:



Типичные межнуклеозидные связи, имеющие хиральный центр, включают, но не ограничиваясь этим, алкилфосфонаты, мезилфосфорамидаты и фосфоротиоаты. Модифицированные олигонуклеотиды, содержащие межнуклеозидные связи, имеющие хиральный центр, могут быть получены как популяции модифицированных олигонуклеотидов, содержащих стереослучайные межнуклеозидные связи, или как популяции модифицированных олигонуклеотидов, содержащих фосфоротиоатные или другие связи, содержащие хиральные центры в определенных стереохимических конфигурациях. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяции модифицированных олигонуклеотидов содержат тиофосфатные межнуклеозидные связи, причем все тиофосфатные межнуклеозидные связи являются стереослучайными. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяции модифицированных олигонуклеотидов содержат мезилфосфорамидатные межнуклеозидные связи, причем все мезилфосфорамидатные межнуклеозидные связи являются стереослучайными. Такие модифицированные олигонуклеотиды можно получить с помощью синтетических методов, которые приводят к случайному выбору стереохимической конфигурации каждой фосфоротиоатной или мезилфосфорамидатной связи. Тем не менее, каждый отдельный фосфоротиоат или мезилфосфорамидат каждой отдельной молекулы олигонуклеотида имеет определенную стереоконфигурацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяции модифицированных олигонуклеотидов обогащены модифицированными олигонуклеотидами, содержащими одну или более конкретных фосфоротиоатных или мезилфосфорамидатных межнуклеозидных связей в конкретной, независимо выбранной стереохимической конфигурации. В некоторых вариантах осуществления изобретения конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной или мезилфосфорамидатной связи присутствует в по меньшей мере 65% молекул в популяции. В некоторых вариантах осуществления изобретения конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной или мезилфосфорамидатной связи присутствует в по меньшей мере 70%

молекул в популяции. В некоторых вариантах осуществления изобретения конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной или мезилфосфорамидатной связи присутствует в по меньшей мере 80% молекул в популяции. В некоторых вариантах осуществления изобретения конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной или мезилфосфорамидатной связи присутствует в по меньшей мере 90% молекул в популяции. В некоторых вариантах осуществления изобретения конкретная конфигурация конкретной фосфоротиоатной или мезилфосфорамидатной связи присутствует в по меньшей мере 99% молекул в популяции. Такие хирально обогащенные популяции модифицированных олигонуклеотидов можно получить с использованием синтетических методов, известных в данной области техники, например, способов, описанных в Oka et al., *JACS* 125, 8307 (2003), Wan et al. *Nuc. Acid. Res.* 42, 13456 (2014), и WO 2017/015555. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция модифицированных олигонуклеотидов обогащена модифицированными олигонуклеотидами, имеющими по меньшей мере один указанный фосфоротиоат или мезилфосфорамидат в (*Sp*)-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяция модифицированных олигонуклеотидов обогащена модифицированными олигонуклеотидами, имеющими по меньшей мере один фосфоротиоат или мезилфосфорамидат в (*Rp*)-конфигурации. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды, содержащие (*Rp*) и/или (*Sp*) фосфоротиоаты, содержат одну или более из следующих формул, соответственно, где «В» обозначает нуклеиновое основание:

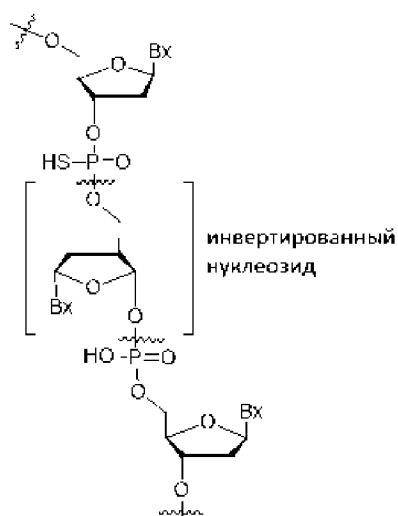


Если не указано иное, хиральные межнуклеозидные связи модифицированных олигонуклеотидов, описанных в данном документе, могут быть стереослучайными или иметь определенную стереохимическую конфигурацию.

Нейтральные межнуклеозидные связи включают, без ограничения, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, MMI (3'-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-5'), амид-3 (3'-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(H)-5'), амид-4 (3'-CH<sub>2</sub>-N(H)-C(=O)-5'), формацеталь (3'-O-CH<sub>2</sub>-O-5'), метоксипропил (MOP) и тиоформацеталь (3'-S-CH<sub>2</sub>-O-5'). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи включают неионные связи, содержащие силоксан (диалкилсилоксан), карбоксилатный эфир, карбоксамид, сульфид, сульфонатный эфир и амиды (см., например: *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S. Sanghvi and P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Chapters 3 and 4, 40-65). Дополнительные нейтральные межнуклеозидные связи

включают неионные связи, содержащие смешанные части компонентов N, O, S и CH<sub>2</sub>.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более инвертированных нуклеозидов, как показано ниже:



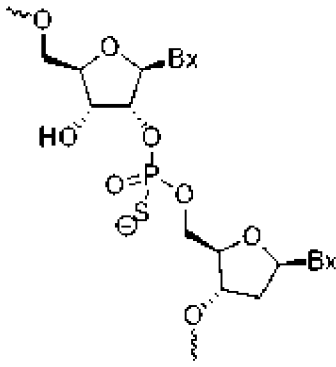
где каждый Bx независимо представляет собой любое нуклеиновое основание.

В некоторых вариантах осуществления изобретения инвертированный нуклеозид является концевым (т.е. последний нуклеозид на одном конце олигонуклеотида), и поэтому будет присутствовать только одна межнуклеозидная связь, представленная выше. В некоторых таких вариантах осуществления к инвертированному нуклеозиду могут быть присоединены дополнительные признаки (например, конъюгирующая группа). Такие терминальные инвертированные нуклеозиды могут быть присоединены к одному или обоим концам олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения такие группы лишены нуклеинового основания и называются в данном документе остатками инвертированного сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент инвертированного сахара является концевым (т.е. присоединенный к последнему нуклеозиду на одном конце олигонуклеотида), и поэтому будет присутствовать только одна межнуклеозидная связь выше. В некоторых таких вариантах осуществления к фрагменту инвертированного сахара могут быть присоединены дополнительные признаки (например, конъюгирующая группа). Такие терминальные фрагменты инвертированного сахара могут быть присоединены к одному или обоим концам олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновые кислоты могут быть связаны 2'-5', а не стандартной связью 3'-5'. Такая связь проиллюстрирована ниже.





где каждый Bx представляет любое нуклеиновое основание.

### **Некоторые мотивы**

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированный фрагмент сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат один или более модифицированных нуклеозидов, содержащих модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат одну или более модифицированных межнуклеозидных связей. В таких вариантах осуществления изобретения модифицированные, немодифицированные и различным образом модифицированные фрагменты сахара, нуклеиновые основания и/или межнуклеозидные связи модифицированного олигонуклеотида определяют структуру или мотив. В некоторых вариантах осуществления изобретения структуры фрагментов сахара, нуклеиновых оснований и межнуклеозидных связей не зависят друг от друга. Таким образом, модифицированный олигонуклеотид может быть описан по его мотиву сахара, мотиву нуклеиновых оснований и/или мотиву межнуклеозидных связей (при использовании в данном документе мотив нуклеиновых оснований описывает модификации нуклеиновых оснований независимо от последовательности нуклеиновых оснований).

### **Некоторые мотивы сахаров**

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды содержат один или более типов модифицированного сахара и/или немодифицированного фрагмента сахара, расположенного вдоль олигонуклеотида или его области в определенном порядке или мотиве сахара. В некоторых случаях такие сахарные мотивы включают, но не ограничиваясь этим, любую из обсуждаемых в данном документе модификаций сахара.

### *Гэпмеры*

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из участка, имеющего мотив гэпмера, который определяется двумя внешними участками или «крыльями» и центральным или внутренним участком или «гэпом». Указанные три области гэпмерного мотива (5'-крыло, гэп и 3'-крыло) образуют непрерывную последовательность нуклеозидов, в которой по меньшей мере некоторые фрагменты сахаров нуклеозидов каждого из крыльев отличаются от по меньшей

мере некоторых фрагментов сахаров нуклеозидов гэта. В частности, по меньшей мере фрагменты сахаров нуклеозидов каждого крыла, которые находятся ближе всего к гэпу (самый крайний 3'-нуклеозид 5'-крыла и самый крайний 5'-нуклеозид 3'-крыла), отличаются от фрагмента сахара соседних нуклеозидов гэта, таким образом определяя границу между крыльями и гэпом (т.е. соединение крыло/гэп). В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагменты сахара внутри гэта являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления изобретения гэп включает один или более нуклеозидов, имеющих фрагмент сахара, который отличается от фрагмента сахара одного или более других нуклеозидов гэта. В некоторых вариантах осуществления изобретения мотивы сахара двух крыльев одинаковы (симметричный гэпмер). В некоторых вариантах осуществления изобретения мотив сахара 5'-крыла отличается от мотива сахара 3'-крыла (асимметричный гэпмер).

В некоторых вариантах осуществления изобретения крылья гэпмера содержат 1-5 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид каждого крыла гэпмера представляет собой модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один нуклеозид каждого крыла гэпмера представляет собой модифицированный нуклеозид. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере два нуклеозида каждого крыла гэпмера представляют собой модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере три нуклеозида каждого крыла гэпмера представляют собой модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере четыре нуклеозида каждого крыла гэпмера представляют собой модифицированные нуклеозиды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гэп гэпмера содержит 7-12 нуклеозидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид гэта гэпмера представляет собой немодифицированный 2'-дезоксинуклеозид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гэпмер представляет собой дезоксигэпмер. В вариантах осуществления изобретения нуклеозиды на стороне гэта каждого соединения крыло/гэп представляют собой немодифицированные 2'-дезоксинуклеозиды, а нуклеозиды на сторонах крыла каждого соединения крыло/гэп представляют собой модифицированные нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид гэта представляет собой немодифицированный 2'-дезоксинуклеозид. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид каждого крыла гэпмера представляет собой модифицированный нуклеозид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из участка, имеющего полностью модифицированный мотив сахара. В таких вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид полностью модифицированной области модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный фрагмент сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид полностью модифицированного олигонуклеотида

содержит модифицированный фрагмент сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат или состоят из участка, имеющего полностью модифицированный мотив сахара, причем каждый нуклеозид в полностью модифицированном участке содержит один и тот же модифицированный фрагмент сахара, называемый в данном документе равномерно модифицированным мотивом сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения полностью модифицированный олигонуклеотид представляет собой равномерно модифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый нуклеозид равномерно модифицированного содержит одну и ту же 2'-модификацию.

В данном документе длины (количество нуклеозидов) трех областей гэтамера могут быть указаны с использованием обозначения [количество нуклеозидов в 5'-крыле] - [количество нуклеозидов в гэпе] - [количество нуклеозидов в 3'-крыле]. Таким образом, гэтамер 5-10-5 состоит из 5 связанных нуклеозидов в каждом крыле и 10 связанных нуклеозидов в гэпе. Если за такой номенклатурой следует конкретная модификация, эта модификация представляет собой модификацию каждого фрагмента сахара каждого крыла, а нуклеозиды гэпа включают немодифицированные дезокси-нуклеозидные сахара. Таким образом, гэтамер 5-10-5 МОЕ состоит из 5 связанных модифицированных нуклеозидов МОЕ в 5'-крыле, 10 связанных дезокси-нуклеозидов в гэпе и 5 связанных нуклеозидов МОЕ в 3'-крыле.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды представляют собой гэтамеры 5-10-5 МОЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды представляют собой гэтамеры 3-10-3 ВНА. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды представляют собой гэтамеры 3-10-3 сEt. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды представляют собой гэтамеры 3-10-3 LNA.

#### **Некоторые мотивы нуклеиновых оснований**

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды содержат модифицированные и/или немодифицированные нуклеиновые основания, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области по определенной структуре или мотиву. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждое нуклеиновое основание является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения ни одно из нуклеиновых оснований не является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый пуриновый или каждый пиримидиновый является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый аденин является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый гуанин является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый тимин является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый урацил является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый цитозин является модифицированным. В некоторых

вариантах осуществления изобретения некоторые или все нуклеиновые основания цитозина в модифицированном олигонуклеотиде представляют собой 5-метилцитозины. В некоторых вариантах осуществления изобретения все нуклеиновые основания цитозина представляют собой 5-метилцитозины, а все другие нуклеиновые основания модифицированного олигонуклеотида представляют собой немодифицированные нуклеиновые основания.

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды содержат блок модифицированных нуклеиновых оснований. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения блок находится на 3'-конце олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения блок находится в пределах 3 нуклеозидов от 3'-конца олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения блок находится на 5'-конце олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения блок находится в пределах 3 нуклеозидов от 5'-конца олигонуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды, имеющие мотив гэпмера, содержат нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения один нуклеозид, содержащий модифицированное нуклеиновое основание, находится в центральной гэпе олигонуклеотида, имеющего мотив гэпмера. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения фрагмент сахара указанного нуклеозида представляет собой 2'-дезоксирибозильный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированное нуклеиновое основание выбрано из: 2-тиопиримидина и 5-пропинпиримидина.

#### **Некоторые мотивы межнуклеозидных связей**

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды содержат модифицированные и/или немодифицированные межнуклеозидные связи, расположенные вдоль олигонуклеотида или его области по определенной структуре или мотиву. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая межнуклеозидная связывающая группа представляет собой фосфодиэфирную межнуклеозидную связь (P=O). В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая межнуклеозидная связывающая группа модифицированного олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь (P=S). В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида независимо выбрана из фосфоротиоатной межнуклеозидной связи и фосфодиэфирной межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая фосфоротиоатная межнуклеозидная связь независимо выбрана из стереослучайного фосфоротиоата, (*Sp*) фосфоротиоата и (*Rp*) фосфоротиоата. В некоторых вариантах осуществления изобретения мотив сахара модифицированного олигонуклеотида представляет собой гэпмер, и все межнуклеозидные связи внутри гэпа модифицированы. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения некоторые или все межнуклеозидные связи в крыльях представляют собой немодифицированные фосфодиэфирные межнуклеозидные связи. В

некоторых вариантах осуществления изобретения концевые межнуклеозидные связи являются модифицированными. В некоторых вариантах осуществления изобретения мотив сахара модифицированного олигонуклеотида представляет собой гЭпмер, а мотив межнуклеозидной связи содержит по меньшей мере одну фосфодиэфирную межнуклеозидную связь в по меньшей мере одном крыле, причем по меньшей мере одна фосфодиэфирная связь не является концевой межнуклеозидной связью, а оставшиеся межнуклеозидные связи представляют собой фосфоротиоатные межнуклеозидные связи. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения все фосфоротиоатные связи являются стереослучайными. В некоторых вариантах осуществления изобретения все фосфоротиоатные связи в крыльях представляют собой (Sp) фосфоротиоаты, а гЭп содержит по меньшей мере один мотив Sp, Sp, Rp. В некоторых вариантах осуществления изобретения популяции модифицированных олигонуклеотидов обогащены модифицированными олигонуклеотидами, содержащими такие мотивы межнуклеозидных связей.

### **Некоторые длины**

Возможно увеличивать или уменьшать длину олигонуклеотида без ухудшения активности. Например, в Woolf et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992), протестировали ряд олигонуклеотидов длиной 13-25 нуклеиновых оснований относительно их способности вызывать расщепление РНК-мишени в модели инъекирования ооцитов. Олигонуклеотиды длиной 25 нуклеиновых оснований с 8 или 11 основаниями несовпадений вблизи концов олигонуклеотидов были способны направлять специфическое расщепление РНК-мишени, хотя и в меньшей степени, чем олигонуклеотиды, не содержащие несовпадений. Аналогичным образом целевое специфическое расщепление было достигнуто с использованием олигонуклеотидов из 13 нуклеиновых оснований, включая те, которые имеют 1 или 3 несовпадения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды (включая модифицированные олигонуклеотиды) могут иметь любую длину из множества диапазонов длин. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды состоят из от X до Y связанных нуклеозидов, где X представляет собой наименьшее количество нуклеозидов в диапазоне, а Y представляет собой наибольшее количество нуклеозидов в диапазоне. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения каждый из X и Y независимо выбран из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50; при условии что  $X \leq Y$ . Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды состоят из от 12 до 13, от 12 до 14, от 12 до 15, от 12 до 16, от 12 до 17, от 12 до 18, от 12 до 19, от 12 до 20, от 12 до 21, от 12 до 22, от 12 до 23, от 12 до 24, от 12 до 25, от 12 до 26, от 12 до 27, от 12 до 28, от 12 до 29, от 12 до 30, от 13 до 14, от 13 до 15, от 13 до 16, от 13 до 17, от 13 до 18, от 13 до 19, от 13 до 20, от 13 до 21, от 13 до 22, от 13 до 23, от 13 до 24, от 13 до 25, от 13 до 26, от 13 до 27, от 13 до 28, от 13 до 29, от 13 до 30, от 14 до 15, от 14 до 16, от 14 до 17, от 14 до 18, от 14 до 19, от 14 до 20, от 14 до 21, от 14 до

22, от 14 до 23, от 14 до 24, от 14 до 25, от 14 до 26, от 14 до 27, от 14 до 28, от 14 до 29, от 14 до 30, от 15 до 16, от 15 до 17, от 15 до 18, от 15 до 19, от 15 до 20, от 15 до 21, от 15 до 22, от 15 до 23, от 15 до 24, от 15 до 25, от 15 до 26, от 15 до 27, от 15 до 28, от 15 до 29, от 15 до 30, от 16 до 17, от 16 до 18, от 16 до 19, от 16 до 20, от 16 до 21, от 16 до 22, от 16 до 23, от 16 до 24, от 16 до 25, от 16 до 26, от 16 до 27, от 16 до 28, от 16 до 29, от 16 до 30, от 17 до 18, от 17 до 19, от 17 до 20, от 17 до 21, от 17 до 22, от 17 до 23, от 17 до 24, от 17 до 25, от 17 до 26, от 17 до 27, от 17 до 28, от 17 до 29, от 17 до 30, от 18 до 19, от 18 до 20, от 18 до 21, от 18 до 22, от 18 до 23, от 18 до 24, от 18 до 25, от 18 до 26, от 18 до 27, от 18 до 28, от 18 до 29, от 18 до 30, от 19 до 20, от 19 до 21, от 19 до 22, от 19 до 23, от 19 до 24, от 19 до 25, от 19 до 26, от 19 до 27, от 19 до 28, от 19 до 29, от 19 до 30, от 20 до 21, от 20 до 22, от 20 до 23, от 20 до 24, от 20 до 25, от 20 до 26, от 20 до 27, от 20 до 28, от 20 до 29, от 20 до 30, от 21 до 22, от 21 до 23, от 21 до 24, от 21 до 25, от 21 до 26, от 21 до 27, от 21 до 28, от 21 до 29, от 21 до 30, от 22 до 23, от 22 до 24, от 22 до 25, от 22 до 26, от 22 до 27, от 22 до 28, от 22 до 29, от 22 до 30, от 23 до 24, от 23 до 25, от 23 до 26, от 23 до 27, от 23 до 28, от 23 до 29, от 23 до 30, от 24 до 25, от 24 до 26, от 24 до 27, от 24 до 28, от 24 до 29, от 24 до 30, от 25 до 26, от 25 до 27, от 25 до 28, от 25 до 29, от 25 до 30, от 26 до 27, от 26 до 28, от 26 до 29, от 26 до 30, от 27 до 28, от 27 до 29, от 27 до 30, от 28 до 29, от 28 до 30 или от 29 до 30 связанных нуклеозидов.

#### **Некоторые модифицированные олигонуклеотиды**

В некоторых вариантах осуществления изобретения вышеуказанные модификации (сахар, нуклеиновое основание, межнуклеозидная связь) включены в модифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды характеризуются своими мотивами модификаций и общими длинами. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждый из таких параметров не зависит от других. Таким образом, если не указано иное, каждая межнуклеозидная связь олигонуклеотида, имеющего мотив сахара с гэтмером, может быть модифицирована или немодифицирована и может следовать или не следовать структуре модификации гэтмера модификаций сахара. Например, межнуклеозидные связи внутри областей крыльев гэтмера сахара могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга и могут быть такими же или отличаться от межнуклеозидных связей в области гэта мотива сахара. Аналогичным образом, такие олигонуклеотиды с гэтмерами сахаров могут содержать одно или более модифицированных нуклеиновых оснований независимо от структуры гэтмеров модификаций сахаров. Если не указано иное, все модификации не зависят от последовательности нуклеиновых оснований.

#### **Некоторые популяции модифицированных олигонуклеотидов**

Популяции модифицированных олигонуклеотидов, в которых все модифицированные олигонуклеотиды популяции имеют одинаковую молекулярную формулу, могут представлять собой стереослучайные популяции или хирально обогащенные популяции. Все хиральные центры всех модифицированных олигонуклеотидов являются стереослучайными в стереослучайной популяции. В хирально

обогащенной популяции по меньшей мере один конкретный хиральный центр не является стереослучайным в модифицированных олигонуклеотидах популяции. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды хирально обогащенной популяции обогащены фрагментами  $\beta$ -D рибозильного сахара, и все фосфоротиоатные межнуклеозидные связи являются стереослучайными. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные олигонуклеотиды хирально обогащенной популяции обогащены как фрагментами  $\beta$ -D рибозильного сахара, так и по меньшей мере одной конкретной фосфоротиоатной межнуклеозидной связью в конкретной стереохимической конфигурации.

#### **Последовательность нуклеиновых оснований**

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды (немодифицированные или модифицированные олигонуклеотиды) дополнительно описываются по их последовательности нуклеиновых оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды имеют последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна второму олигонуклеотиду или идентифицированной эталонной нуклеиновой кислоте, такой как нуклеиновая кислота-мишень. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения область олигонуклеотида имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая комплементарна второму олигонуклеотиду или идентифицированной эталонной нуклеиновой кислоте, такой как нуклеиновая кислота-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновых оснований области или всей длины олигонуклеотида комплементарна на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% второму олигонуклеотиду или нуклеиновой кислоте, такой как нуклеиновая кислота-мишень.

#### **Олигомерные дуплексы**

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения, описанные в данном документе, содержат олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную последовательности нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение объединяется со вторым олигомерным соединением с образованием олигомерного дуплекса. Такие олигомерные дуплексы содержат первое олигомерное соединение, имеющее область, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени, и второе олигомерное соединение, имеющее область, комплементарную первому олигомерному соединению. В некоторых вариантах осуществления изобретения первое олигомерное соединение олигомерного дуплекса содержит или по существу состоит из модифицированного или немодифицированного олигонуклеотида, конъюгирующего линкера и конъюгирующего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения первое олигомерное соединение олигомерного дуплекса содержит или по существу состоит из модифицированного или немодифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах

осуществления изобретения второе олигомерное соединение олигомерного дуплекса содержит или по существу состоит из модифицированного или немодифицированного олигонуклеотида, конъюгирующего линкера и конъюгирующего фрагмента. Одно или оба олигомерных соединения олигомерного дуплекса могут содержать конъюгирующий линкер и конъюгирующий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерное соединение напрямую связано с конъюгирующим линкером, причем конъюгирующий линкер напрямую связан с конъюгирующим фрагментом. Олигонуклеотиды каждого олигомерного соединения олигомерного дуплекса могут включать некомплементарные выступающие нуклеозиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения выступающий нуклеозид может быть комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения выступающий нуклеозид не относится к нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения два олигонуклеотида имеют по меньшей мере одно несоответствие относительно друг друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерный дуплекс представляет собой антисмысловый агент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первое олигомерное соединение представляет собой антисмысловое соединение. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый модифицированный олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения второе олигомерное соединение представляет собой смысловое соединение. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй модифицированный олигонуклеотид представляет собой смысловый олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый модифицированный олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид РНКи. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй модифицированный олигонуклеотид представляет собой смысловый олигонуклеотид РНКи. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновых оснований второго модифицированного олигонуклеотида содержит комплементарную область, содержащую по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20 или 21 нуклеиновых оснований, которая на по меньшей мере 90% комплементарна последовательности нуклеиновых оснований равной части первого модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновых оснований второго модифицированного олигонуклеотида содержит комплементарную область, содержащую по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15, по меньшей мере 16, по меньшей мере по меньшей мере 17, по меньшей мере 18, по меньшей мере 19, по меньшей мере 20 или 21 нуклеиновых оснований, которая на по меньшей мере 95% комплементарна последовательности нуклеиновых оснований



равной части первого модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность нуклеиновых оснований второго модифицированного олигонуклеотида содержит комплементарную область, содержащую по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 11, 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, по меньшей мере 20 или 21 нуклеиновое основание, которая на по меньшей мере 100% комплементарна последовательности нуклеиновых оснований равной части первого модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерный дуплекс представляет собой антисмысловый агент. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый модифицированный олигонуклеотид представляет собой антисмысловый олигонуклеотид РНКи, имеющий длину 21-23 олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй модифицированный олигонуклеотид представляет собой смысловый олигонуклеотид РНКи, имеющий длину 19-21 олигонуклеотидов.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, по меньшей мере один нуклеозид первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может содержать модифицированный фрагмент сахара. Примеры подходящих модифицированных сахарных фрагментов включают, но не ограничиваясь этим, бициклический фрагмент сахара, такой как 2'-4'-мостик, выбранный из -O-CH<sub>2</sub>-; и -O-CH(CH<sub>3</sub>)-, и небциклический фрагмент сахара, такой как фрагмент сахара 2'-МОЕ, фрагмент сахара 2'-F, фрагмент сахара 2'-ОМе или фрагмент сахара 2'-NМА. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один нуклеозид первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может содержать немодифицированный 2'-дезоксирибозильный фрагмент сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100% нуклеозидов первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида содержат модифицированный фрагмент сахара, выбранный из 2'-F и 2'-ОМе. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более 2'-F фрагментов сахара имеют конформацию, отличную от 2'-β-D-рибозила. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более 2'-F фрагментов сахара находятся в конформации 2'-β-D-ксилозила.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, по меньшей мере один нуклеозид первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может содержать заменитель сахаров. Примеры подходящих заместителей сахаров включают, но не ограничиваясь этим, морфолино, гекситол-нуклеиновую кислоту (HNA), фторгекситол-нуклеиновую кислоту (F-HNA), заместители сахара гликолевой нуклеиновой кислоты (GNA) и незамкнутую нуклеиновую кислоту (UNA). В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один нуклеозид первого модифицированного олигонуклеотида содержит заменитель сахара,

который может представлять собой GNA.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, по меньшей мере одна нуклеозидная связь первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может содержать модифицированную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из первых, вторых или третьих межнуклеозидных связей с 5'-конца и/или 3'-конца первого модифицированного олигонуклеотида содержит фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из первых, вторых или третьих межнуклеозидных связей с 5'-конца и/или 3'-конца второго модифицированного олигонуклеотида содержит фосфоротиоатную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой мезилфосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из первых или вторых межнуклеозидных связей с 5'-конца и/или 3'-конца первого модифицированного олигонуклеотида содержит мезилфосфорамидатную межнуклеозидную связь. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна из первых или вторых межнуклеозидных связей с 5'-конца и/или 3'-конца второго модифицированного олигонуклеотида содержит мезилфосфорамидатную межнуклеозидную связь.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, по меньшей мере одна нуклеозидная связь первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может содержать фосфодизфирную межнуклеозидную связь.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, каждая межнуклеозидная связь первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может быть независимо выбрана из фосфодизфирной, фосфоротиоатной или мезилфосфорамидатной межнуклеозидной связи.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, каждая межнуклеозидная связь первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может быть независимо выбрана из фосфодизфирной или фосфоротиоатной межнуклеозидной связи.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, каждая межнуклеозидная связь первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может быть независимо выбрана из фосфодизфирной или мезилфосфорамидатной межнуклеозидной связи.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, мотив межнуклеозидной связи первого модифицированного олигонуклеотида может представлять собой ssooooooooooooooooooss, где каждый «s» представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, а каждый «o» представляет собой

фосфодиэфирную межнуклеозидную связь. В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, мотив межнуклеозидной связи второго модифицированного олигонуклеотида может представлять собой ssooooooooooooooooooss, где каждый «s» представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, а каждый «o» представляет собой фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, по меньшей мере одно нуклеиновое основание первого модифицированного олигонуклеотида и/или второго модифицированного олигонуклеотида может представлять собой модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированное нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, первый модифицированный олигонуклеотид может содержать стабилизированную фосфатную группу, прикрепленную к 5'-положению самого крайнего 5'-нуклеозида. В некоторых вариантах осуществления изобретения стабилизированная фосфатная группа содержит циклопропилфосфонат или (*E*)-винилфосфонат.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерный дуплекс имеет мотив, описанный в международной публикации № WO 2022/174053.

В любом из олигомерных дуплексов, описанных в данном документе, первый модифицированный олигонуклеотид и/или второй модифицированный олигонуклеотид может содержать конъюгирующую группу. Предпочтительно второй модифицированный олигонуклеотид содержит конъюгирующую группу. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит конъюгирующий линкер и конъюгирующий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена к первому модифицированному олигонуклеотиду на 5'-конце первого модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена к первому модифицированному олигонуклеотиду на 3'-конце модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена к первому модифицированному олигонуклеотиду во внутреннем положении. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена к первому модифицированному олигонуклеотиду посредством 2'-модификации фуранозильного фрагмента сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена к первому модифицированному олигонуклеотиду посредством модифицированной межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена ко второму модифицированному олигонуклеотиду на 5'-конце модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена ко второму модифицированному олигонуклеотиду на 3'-конце модифицированного олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена

ко второму модифицированному олигонуклеотиду во внутреннем положении. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена ко второму модифицированному олигонуклеотиду посредством 2'-модификации фуранозильного фрагмента сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа присоединена ко второму модифицированному олигонуклеотиду посредством модифицированной межнуклеозидной связи. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит фрагмент, нацеленный на клетки, обладающий сродством к рецептору трансферрина (TfR), также известному как TfR1 и CD71. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит антитело против TfR1 или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа содержит белок или пептид, способный связывать TfR1. В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгирующая группа представляет собой бициклический пептид, способный связывать TfR1.

#### **Антисмысловая активность**

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения и олигомерные дуплексы способны гибридизоваться с нуклеиновой кислотой-мишенью, что приводит к по меньшей мере одной антисмысловой активности; такие олигомерные соединения и олигомерные дуплексы представляют собой антисмысловые соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловые соединения обладают антисмысловой активностью, когда они уменьшают или ингибируют количество или активность целевой нуклеиновой кислоты на 25% или более в стандартном клеточном анализе. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловые соединения избирательно воздействуют на одну или более нуклеиновых кислот-мишеней. Такие антисмысловые соединения содержат последовательность нуклеиновых оснований, которая гибридизуется с одной или более нуклеиновыми кислотами-мишенями, что приводит к одной или более желаемым антисмысловым активностям, и не гибридизуется с одной или более нецелевыми нуклеиновыми кислотами или не гибридизуется с одной или более нецелевыми нуклеиновыми кислотами таким образом, что это приводит к значительной нежелательной антисмысловой активности.

При определенных антисмысловых активностях гибридизация антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит к рекрутингу белка, который расщепляет нуклеиновую кислоту-мишень. Например, некоторые антисмысловые соединения приводят к опосредованному РНКазой Н расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени. РНКазы Н представляют собой клеточную эндонуклеазу, которая расщепляет цепь РНК дуплекса РНК:ДНК. ДНК в таком дуплексе РНК:ДНК не обязательно должна быть немодифицированной ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловые соединения, описанные в данном документе, являются достаточно «ДНК-подобными», чтобы вызывать активность РНКазы Н. В некоторых вариантах осуществления изобретения допускается присутствие одного или более не-ДНК-подобных нуклеозидов в гэпе гэпмера.

При определенных антисмысловых активностях антисмысловое соединение или часть антисмыслового соединения загружается в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), что в конечном итоге приводит к расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени. Например, некоторые антисмысловые соединения приводят к расщеплению нуклеиновой кислоты-мишени аргонавтом. Антисмысловые соединения, которые загружаются в RISC, представляют собой соединения РНКи. Соединения РНКи могут быть двухцепочечными (миРНК) или одноцепочечными (оцРНК).

В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридизация антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью не приводит к рекрутингу белка, который расщепляет указанную нуклеиновую кислоту-мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридизация антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит к изменению сплайсинга нуклеиновой кислоты-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридизация антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит к ингибированию взаимодействия связывания между нуклеиновой кислотой-мишенью и белком или другой нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления изобретения гибридизация антисмыслового соединения с нуклеиновой кислотой-мишенью приводит к изменению трансляции нуклеиновой кислоты-мишени.

Антисмысловая активность может наблюдаться прямо или косвенно. В некоторых вариантах осуществления изобретения наблюдение или обнаружение антисмысловой активности включает наблюдение или обнаружение изменения количества нуклеиновой кислоты-мишени или белка-мишени, кодируемого такой нуклеиновой кислотой-мишенью, изменение соотношения сплайс-вариантов нуклеиновой кислоты или белка и/или фенотипическое изменение в клетке или у субъекта.

#### **Определенные нуклеиновые кислоты-мишени**

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения содержат или состоят из олигонуклеотида, содержащего область, комплементарную нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень представляет собой эндогенную молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень кодирует белок. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень выбрана из: зрелой мРНК и пре-мРНК, включая интронные, экзонные и нетранслируемые области. В некоторых вариантах осуществления изобретения РНК-мишень представляет собой зрелую мРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень представляет собой пре-мРНК. В некоторых таких вариантах осуществления изобретения целевая область полностью находится внутри интрона. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая область охватывает соединение интрон/экзон. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая область составляет по меньшей мере 50% интрона. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень представляет собой продукт транскрипции РНК

ретрогена. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень представляет собой некодирующую РНК. В некоторых таких вариантах осуществления целевую некодирующую РНК выбирают из: длинной некодирующей РНК, короткой некодирующей РНК, молекулы интронной РНК.

*Комплементарность/несоответствие нуклеиновой кислоте-мишени*

Вводить несовпадающие основания можно, не устраняя активности. Например, Gautschi et al (*J. Natl. Cancer Inst.* 93:463-471, March 2001) продемонстрировали способность олигонуклеотида, на 100% комплементарного мРНК bcl-2 и имеющего 3 несовпадения с мРНК bcl-xL, снижать экспрессию как bcl-2, так и bcl-xL *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, этот олигонуклеотид продемонстрировал мощную противоопухолевую активность *in vivo*. Maher and Dolnick (*Nuc. Acid. Res.* 16:3341-3358, 1988) протестировали серию тандемных олигонуклеотидов из 14 нуклеиновых оснований и олигонуклеотидов из 28 и 42 нуклеиновых оснований, состоящих из последовательности двух или трех тандемных олигонуклеотидов, соответственно, относительно их способности блокировать трансляцию человеческого DHFR в анализе ретикулоцитов кролика. Каждый из трех олигонуклеотидов из 14 нуклеиновых оснований по отдельности был способен ингибировать трансляцию, хотя и на более низком уровне, чем олигонуклеотиды из 28 или 42 нуклеиновых оснований.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды комплементарны нуклеиновой кислоте-мишени по всей длине олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды на 99%, 95%, 90%, 85% или 80% комплементарны нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды по меньшей мере на 80% комплементарны нуклеиновой кислоте-мишени по всей длине олигонуклеотида и содержат область, которая на 100% или полностью комплементарна нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения длина области полной комплементарности составляет от 6 до 20, от 10 до 18 или от 18 до 20 нуклеиновых оснований.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигонуклеотиды содержат одно или более несовпадающих нуклеотидных оснований по отношению к нуклеиновой кислоте-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения антисмысловая активность против мишени снижается из-за такого несоответствия, но активность против отличного от мишени соединения снижается в большей степени. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения селективность олигонуклеотида улучшается. В некоторых вариантах осуществления изобретения несовпадение специфически расположено внутри олигонуклеотида, имеющего мотив гэпмера. В некоторых вариантах осуществления изобретения несовпадение находится в положении 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 от 5'-конца области гэта. В некоторых вариантах осуществления изобретения несовпадение находится в положении 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 от 3'-конца области гэта. В некоторых вариантах осуществления изобретения несовпадение находится в положении 1, 2, 3 или 4 от 5'-конца области крыла. В некоторых вариантах осуществления изобретения несовпадение находится в положении 4, 3, 2 или 1 от 3'-конца области крыла.

*Определенные нуклеиновые кислоты-мишени*

Ранее были описаны модифицированные олигонуклеотиды, нацеленные на нуклеиновые кислоты мышц, которые могут быть полезны в сочетании с предлагаемым изобретением, и, в частности, модифицированные олигонуклеотиды могут быть включены в композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень представляет собой нуклеиновую кислоту-мишень мышц. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень выбрана из ACTC1, ACTN2, ACVR1, ACVR1B, C9ORF72, CALR3, CaMK2d, CSRP3, DMD, DMPK, DNM2, DUX4, FBX032, FLNC, FXN, GYS1, HPRT, INHBA, JPH2, KLF15, LDB3, MED1, MED13, MEF2D, MSTN, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MLCK1, MYOZ2, MYPN, NEXN, NLRP3, PLN, PPP1R3A, PRKAG2, RYR, SOD1, TCAP, TNN, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TRIM64 или VCL. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на одну или более таких нуклеиновых кислот-мишеней, содержит один или более модифицированных олигонуклеотидов, описанных и изложенных в международных патентных публикациях № WO2019/090160, WO2020/028842, WO2020/028841, WO2020/028831, WO2021/142260, WO2021/142227, WO2020/028840, WO2021/142217, WO2021/142331 или WO2021/142269.

В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-мишень мышц выбрана из CaMK2d, NLRP3, PLN, DMD, DMPK, DNM2, DUX4 или HPRT. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота CaMK2d имеет последовательность, представленную SEQ ID №: 1 (комплемент к № доступа GENBANK NC\_000004.12, усеченный от нуклеозидов 113448001 до 113765000) или SEQ ID №: 2 (№ доступа GENBANK NM\_001321571.2). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота NLRP3 имеет последовательность, представленную SEQ ID №: 3 (№ доступа GENBANK NC\_000001.11, усеченный от нуклеозидов 247413001 до 247454000) или SEQ ID №: 4 (№ доступа GENBANK NM\_004895.4). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота PLN имеет последовательность, представленную SEQ ID №: 5 (№ доступа GENBANK NC\_000006.12, усеченный от нуклеозидов 118545001 до 118565000) или SEQ ID №: 6 (№ доступа GENBANK NM\_002667.4). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота DMD имеет последовательность, представленную SEQ ID №: 7 (комплемент к GENBANK NT\_011757.15, усеченный от нуклеотидов 28916001 до 31142000). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота DMPK имеет последовательность, представленную SEQ ID №: 8 (№ доступа GenBank NT\_011109.15, усеченный от нуклеотидов 18540696 до 18555106) или SEQ ID №: 9 (№ доступа GENBANK NM\_001081560.1). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота DNM2 имеет последовательность, представленную SEQ ID №: 10 (№ доступа GenBank NC\_000019.10, усеченный от нуклеозида 10715001 до 10835000) или SEQ ID №: 11 (№ доступа GENBANK NM\_004945.3). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота DUX4 имеет последовательность, представленную SEQ

ID №: 12 (№ доступа GENBANK NC\_000004.12, усеченный от нуклеотида 190171001 до 190187000) или SEQ ID №: 13 (№ доступа GENBANK NM\_001306068.2). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота HPRT1 имеет последовательность, представленную SEQ ID №: 253 (ENSEMBL ID ENSG00000165704.15, выпуск 107 (июль 2022)).

В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на CaMK2d, содержит один или более модифицированных олигонуклеотидов, описанных и изложенных в международных патентных публикациях № WO2019/165067, WO2021/158810 или WO2022/058386. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на NLRP3, содержит один или более модифицированных олигонуклеотидов, описанных и изложенных в международной патентной публикации № WO2022178146A1, которая включена в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на PLN, содержит один или более модифицированных олигонуклеотидов, описанных и изложенных в международной патентной публикации № WO2022/173976, которая включена в данный документ посредством ссылки, или международной патентной публикации № WO2001/16312. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на DMD, содержит один или более олигонуклеотидов, описанных и изложенных в WO2018/014042, которая включена в данный документ посредством ссылки, или в международных патентных публикациях № WO2022/020107, WO2021/025899, WO2021/003573, WO2021/142307, WO2020/257489, WO2020/219820, WO2020/214763, WO2020/198268, WO2020/089325, WO2020/028832, WO2019/200185, WO2019/090160, WO2019/060775, WO2019/014772, WO2018/129384, WO2018/067973, WO2018/055577, WO2018/014043, WO2018/014042, WO2018/007475, WO2018/005805, WO2017/210647, WO2017/192679, WO2017/047707, WO2015/137409, WO2014/153220, WO2013/112053, WO2013/100190, WO2012/029986, WO2011/057350, WO2010/123369, WO2010/048586, WO2009/054725, WO2007/135105, WO2006/000057, WO2004/083446, WO2004/048570 или WO2002/024906. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на DMPK, содержит один или более олигонуклеотидов, описанных и изложенных в международных патентных публикациях № WO 2012/012443, WO2012/012467, WO2015/021457, которые включены в данный документ посредством ссылки, или в международных патентных публикациях № WO2022/147209, WO2022/026152, WO2021142234, WO2021/076856, WO2020/028861, WO2019/113393, WO2006/006948, WO 2005/116204, WO2018/002812, WO2018/078131 или WO2018/078134. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на DNM2, содержит один или более олигонуклеотидов, описанных и изложенных в международной патентной публикации № WO2019/140452, которая включена в данный документ посредством ссылки, или международных патентных публикациях № WO2020/028844, WO2015/055859 или WO2016/170162. В некоторых



вариантах осуществления изобретения модифицированный олигонуклеотид, нацеленный на DUX4, содержит один или более олигонуклеотидов, описанных и изложенных в международных патентных публикациях № WO2016/115490, WO2022/159712, которые включены в данный документ посредством ссылки, или в патентной публикации США № US2021220479, или в международных патентных публикациях № WO2022/147207, WO2022/020106, WO2021/142275, WO2020/028840, WO2020/203880, WO2020/028864, WO2019/060432, WO 2017/050836, WO2016/115490 или WO2012/024535.

### **Некоторые фармацевтические композиции**

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, описанные в данном документе, содержат одно или более олигомерных соединений. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждое из одного или более олигомерных соединений содержит модифицированный олигонуклеотид. В некоторых вариантах реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стерильный раствор хлорида натрия и одно или более олигомерных соединений. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция состоит или по существу состоит из стерильного раствора хлорида натрия и одного или более олигомерных соединений. В некоторых вариантах осуществления изобретения стерильный раствор хлорида натрия представляет собой раствор хлорида натрия фармацевтического качества. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более олигомерных соединений и стерильную воду. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция состоит из или состоит по существу из одного или более олигомерных соединений и стерильной воды. В некоторых вариантах осуществления изобретения стерильная вода представляет собой воду фармацевтического качества. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель представляет собой дистиллированную воду для инъекций. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более олигомерных соединений и фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция состоит из или состоит по существу из одного или более олигомерных соединений и ФСБ. В некоторых вариантах осуществления изобретения стерильный ФСБ представляет собой ФСБ фармацевтического качества. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более олигомерных соединений и искусственную спинномозговую жидкость. В некоторых вариантах осуществления изобретения стерильный ФСБ представляет собой ФСБ фармацевтического качества. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция состоит из или состоит по существу из искусственной спинномозговой жидкости. В некоторых вариантах осуществления изобретения искусственная спинномозговая жидкость имеет фармацевтическую чистоту.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции содержат одно или более олигомерных соединений, раскрытых в данном документе, и один или более вспомогательных веществ. В некоторых вариантах осуществления изобретения вспомогательные вещества выбраны из воды, растворов солей, спирта, полиэтиленгликолей, желатина, лактозы, амилазы, стеарата магния, талька, кремниевой кислоты, вязкого парафина, гидроксиметилцеллюлозы и поливинилпирролидона.

В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения могут быть смешаны с фармацевтически приемлемыми активными и/или инертными веществами для приготовления фармацевтических композиций или составов. Композиции и способы составления фармацевтических композиций зависят от ряда критериев, включая, но не ограничиваясь этим, путь введения, степень заболевания или вводимую дозу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, содержащие олигомерное соединение, раскрытое в данном документе, охватывают любые фармацевтически приемлемые соли олигомерного соединения, сложные эфиры олигомерного соединения или соли таких сложных эфиров. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, содержащие олигомерные соединения, содержащие один или более олигонуклеотидов, при введении субъекту, включая человека, способны обеспечивать (прямо или косвенно) биологически активный метаболит или его остаток. Соответственно, например, изобретение также относится к фармацевтически приемлемым солям олигомерных соединений, пролекарствам, фармацевтически приемлемым солям таких пролекарств и другим биоэквивалентам. Подходящие фармацевтически приемлемые соли включают, но не ограничиваясь этим, соли натрия и калия. В некоторых вариантах осуществления изобретения пролекарства содержат конъюгирующий фрагмент, присоединенный к олигонуклеотиду, причем конъюгирующий фрагмент расщепляется эндогенными нуклеазами в организме.

Липидные фрагменты использовали в терапии нуклеиновыми кислотами различными способами. В некоторых таких методах нуклеиновую кислоту, такую как олигомерное соединение, вводят в предварительно полученные липосомы или липоплексы, состоящие из смесей катионных липидов и нейтральных липидов. В некоторых методах комплексы ДНК с моно- или поликатионными липидами образуются в отсутствие нейтрального липида. В некоторых вариантах осуществления изобретения липидный фрагмент выбран для увеличения распределения олигомерного агента в конкретной клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения липидный фрагмент выбран для увеличения распределения олигомерного агента в жировой ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения липидный фрагмент выбран для увеличения распределения олигомерного агента в мышечной ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, содержат систему доставки. Примеры систем доставки включают, но не ограничиваясь этим, липосомы и эмульсии. Определенные системы доставки полезны для приготовления определенных фармацевтических композиций,

включая те, которые содержат гидрофобные соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют определенные органические растворители, такие как диметилсульфоксид.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции содержат одну или более молекул тканеспецифичной доставки, предназначенных для доставки олигомерных соединений, описанных в данном документе, в конкретные ткани или типы клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции включают липосомы, покрытые тканеспецифическим антителом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции содержат систему соразтворителей. Некоторые из таких систем соразтворителей содержат, например, бензиловый спирт, неполярное поверхностно-активное вещество, смешивающийся с водой органический полимер и водную фазу. В некоторых вариантах реализации такие системы соразтворителей используют для гидрофобных соединений. Неограничивающим примером такой системы соразтворителей является система соразтворителей VPD, которая представляет собой раствор абсолютного этанола, содержащий 3% мас./об. бензинового спирта, 8% мас./об. неполярного поверхностно-активного вещества Polysorbate 80™ и 65% мас./об. полиэтиленгликоля 300. Пропорции таких систем соразтворителей можно в значительной степени варьировать без существенного изменения их характеристик растворимости и токсичности. Кроме того, состав компонентов соразтворителя может быть изменен: например, вместо Polysorbate 80™ можно использовать другие поверхностно-активные вещества; размер фракции полиэтиленгликоля может варьироваться; полиэтиленгликоль может заменить другие биосовместимые полимеры, например, поливинилпирролидон; и другие сахара или полисахариды могут заменить декстрозу.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, готовят для перорального введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции готовят для буккального введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтическую композицию готовят для введения путем инъекции (например, внутривенной, подкожной, внутримышечной, интратекальной (IT), интрацеребровентрикулярной (ICV) и т.д.). В некоторых из таких вариантов осуществления фармацевтическая композиция содержит носитель и приготовлена в виде водного раствора, такого как вода, или физиологически совместимых буферов, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический солевой буфер. В некоторых вариантах осуществления изобретения включены другие ингредиенты (например, ингредиенты, которые способствуют растворимости или служат консервантами). В некоторых вариантах осуществления изобретения суспензии для инъекций готовят с использованием соответствующих жидких носителей, суспендирующих агентов и т.п. Некоторые фармацевтические композиции для инъекций представлены в единичной дозированной

форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах. Некоторые фармацевтические композиции для инъекций представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и могут содержать агенты для получения состава, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Определенные растворители, подходящие для использования в фармацевтических композициях для инъекций, включают, но не ограничиваясь этим, липофильные растворители и жирные масла, такие как кунжутное масло, синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, и липосомы. Водные суспензии для инъекций могут содержать.

В определенных условиях некоторые соединения, раскрытые в данном документе, действуют как кислоты. Хотя такие соединения могут быть изображены или описаны в протонированной (свободной кислотной) форме, в ионизированной (анионной) форме или ионизированной и в сочетании с катионной (солевой) формой, водные растворы таких соединений существуют в равновесии среди таких форм. Например, фосфатная связь олигонуклеотида в водном растворе существует в равновесии между формами свободной кислоты, аниона и соли. Если не указано иное, предполагается, что соединения, описанные в данном документе, включают все такие формы. Более того, некоторые олигонуклеотиды имеют несколько таких связей, каждая из которых находится в равновесии. Таким образом, олигонуклеотиды в растворе существуют в ансамбле форм во многих положениях, все из которых находятся в равновесии. Предполагается, что термин «олигонуклеотид» включает все такие формы. Нарисованные конструкции обязательно изображают одну форму. Тем не менее, если не указано иное, предполагается, что такие изображения также включают соответствующие формы. В данном документе структура, обозначающая свободную кислоту соединения, за которой следует термин «или ее соли», явно включает все такие формы, которые могут быть полностью или частично протонированы/депротонированы/в сочетании с катионом. В некоторых случаях идентифицированы один или более конкретных катионов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения раскрытые в данном документе олигомерные соединения находятся в водном растворе с натрием. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения находятся в водном растворе с калием. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения находятся в ФСБ. В некоторых вариантах осуществления изобретения олигомерные соединения находятся в воде. В некоторых таких вариантах осуществления pH раствора регулируют с помощью NaOH и/или HCl для достижения желаемого pH.

В данном документе описаны некоторые конкретные дозы. Доза может быть в форме единичной дозы. Для ясности, доза (или единица дозировки) модифицированного олигонуклеотида или олигомерного соединения в миллиграммах указывает массу свободной кислотной формы модифицированного олигонуклеотида, исключая массу любой конъюгирующей группы. Как описано выше, в водном растворе свободная кислота находится в равновесии с анионными и солевыми формами. Однако для расчета дозы

предполагается, что модифицированный олигонуклеотид или олигомерное соединение существует в форме не содержащей растворителя, не содержащей ацетата натрия, безводной свободной кислоты. Например, если модифицированный олигонуклеотид или олигомерное соединение находится в растворе, содержащем натрий (например, физиологический раствор), модифицированный олигонуклеотид или олигомерное соединение может быть частично или полностью депротонировано и связано с ионами  $\text{Na}^+$ . Однако масса протонов все же учитывается в массе дозы, а масса ионов  $\text{Na}^+$  не учитывается в массе дозы. Более того, масса конъюгирующей группы или бициклического лиганда не учитывается при расчете массы дозы, как описано в данном документе; то есть доза относится только к олигонуклеотиду или олигомерному дуплексу. Таким образом, например, доза или единичная дозировка 3,5 мг Соединения № 486178 или Соединения № 1590463-BCY17868 равна числу молекул полностью протонированной олигонуклеотидной части молекулы, которая весит 3,5 мг. Это эквивалентно 3,7 мг не содержащего растворителей и ацетата натрия безводного натриевого Соединения № 486178; и это эквивалентно 4,7 мг конъюгированного соединения 1590463-BCY17868.

### **ПРИМЕРЫ**

Следующие примеры иллюстрируют некоторые варианты осуществления данного изобретения и не являются ограничивающими. Более того, там, где предусмотрены конкретные варианты осуществления, изобретатели предусмотрели общее применение этих конкретных вариантов осуществления. Например, раскрытие олигонуклеотида, имеющего конкретный мотив, обеспечивает обоснованную поддержку дополнительных олигонуклеотидов, имеющих тот же или подобный мотив. И, например, когда конкретная модификация с высоким сродством появляется в определенном положении, другие модификации с высоким сродством в том же положении считаются пригодными, если не указано иное.

#### **Пример 1: Дизайн и синтез бициклических лигандов**

Полипептиды синтезировали на амидной смоле Ринка с использованием стандартного твердофазного пептидного синтеза Fmoc (9-флуоренилметилоксикарбонил) либо путем ручного сочетания (для крупных масштабов), либо с использованием автоматического синтезатора пептидов Biotage SyroII (для небольших масштабов). После отщепления от смолы с использованием ТФК пептиды осаждали диэтиловым эфиром и растворяли в смеси ацетонитрил/вода 50:50. Неочищенные пептиды (при концентрации ~1 мМ) затем циклизовали с помощью 1,3 экв. молекулярного каркаса, 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трис(2-брометанона) (ТАТВ), используя в качестве основания гидрокарбонат аммония (100 мМ). Завершение циклизации определяли методом времяпролетной лазерной десорбции/ионизации из матрицы (MALDI-TOF) или ЖХ-МС. После завершения реакцию циклизации гасили с использованием N-ацетилцистеина (10 экв. по отношению к пептиду) и растворы лиофилизировали. Остаток растворяли в подходящем растворителе и очищали ОФ-ВЭЖХ. Пептидные фракции достаточной чистоты и правильной молекулярной массы (подтвержденной либо MALDI-TOF и ВЭЖХ,

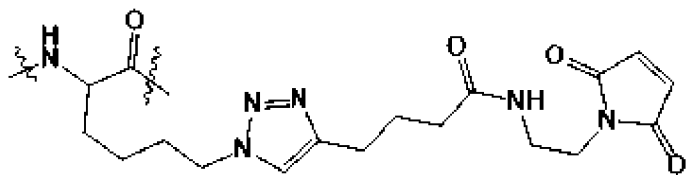
либо ЖХ-МС) объединяли и лиофилизировали. Концентрации определяли по УФ-поглощению с использованием коэффициента экстинкции при 280 нм, который основывался на содержании Trp/Tyr. Все аминокислоты, если не указано иное, находятся в L-конфигурациях. Каждый C-конец амидирован.

**Таблица 2: Бициклические лиганды**

№ бициклического лиганда	Последовательность (от N к C)	N-концевая модификация	SEQ ID №:
BCY17868	CSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	71
BCY17869	CSPDAHLGCISYC	азидопропил	26
BCY17870	NWNCSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	нет	69
BCY17871	NWNCSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	69
BCY17872	NWNCSPDAHLGCISYC	азидопропил	53
BCY17873	CSPDAHLGCISYCEPW[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	70
BCY17874	CSPDAHLGCISYCEPW	азидопропил	52
BCY17875	CP[HyP]DAYLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	94
BCY17876	CP[HyP]DAYLGCISYC	азидопропил	93
BCY17877	CS[HyP]DAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	97
BCY17878	CS[HyP]DAHLGCISYC	азидопропил	95
BCY17879	CS[Aze]DAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	129
BCY17880	CS[Aze]DAHLGCISYC	азидопропил	128
BCY17882	N[dY]NCSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	72
BCY17890	CSPDAHLGCISYCE[dP]W[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	73
BCY17892	CSPDAHLGCISYCE[Aze]W[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	74
BCY17894	CSPDAHLGCISYCE[Pip]W[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	75
BCY17896	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYC [K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	90
BCY17899	NWNC[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYC[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	91
BCY17901	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPW [K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	92
BCY17903	C[K(N <sub>3</sub> )]PDAHLGCISYC	ацетил	150
BCY17904	CS[K(N <sub>3</sub> )]DAHLGCISYC	ацетил	151
BCY17905	CSPD[K(N <sub>3</sub> )]HLGCISYC	ацетил	152
BCY17906	CSPDAHLGCISYC[K(N <sub>3</sub> )(PYA-малеимид)]	ацетил	76

dY представляет D-тирозин; [HyP] представляет 4-транс-гидрокси-L-пролин; [Aze] представляет азетидин; [tBuGly] представляет трет-бутилглицин; [K(N<sub>3</sub>)] представляет 6-азидолизин; [Pip] представляет пипеколиновую кислоту; и [K(N<sub>3</sub>)(PYA-малеимид)]

представляет модифицированный лизин, имеющий следующую структуру:



### Пример 2: Дизайн модифицированных олигонуклеотидов, комплементарных DMPK мыши

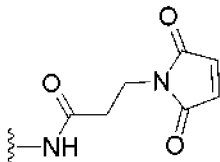
Были разработаны и синтезированы модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные DMPK мыши (как указано в таблице ниже). Некоторые соединения в таблице ниже имеют модификации на 5'-конце, позволяющие конъюгировать с бициклическим лигандом. Соединение № 486178 ранее было раскрыто в WO 2014/120861.

**Таблица 3**

Дизайн модифицированных олигонуклеотидов, комплементарных DMPK мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
486178	$A_{ks}^m C_{ks} A_{ks} A_{ds} T_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ks} G_{ks} G_k$	167
1590463	$[BCN][nC6o]_o A_{ks}^m C_{ks} A_{ks} A_{ds} T_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ks} G_{ks}$ $G_k$	176
1614439	$[sC6o]_o A_{ks}^m C_{ks} A_{ks} A_{ds} T_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} G_{ds} A_{ks} G_{ks} G_k$	179
1602000	$[ПЭГ1алкин][nC6o]_o A_{ks}^m C_{ks} A_{ks} A_{ds} T_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds} G_{ds}$ $A_{ks} G_{ks} G_k$	178
1609732	$[BCN][nC6o]_o [T_{do}^m C_{do} A_d]_o A_{ks}^m C_{ks} A_{ks} A_{ds} T_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds}$ $ds G_{ds} A_{ks} G_{ks} G_k$	168
1468770	$[малеимидС3оил][nC6o]_o A_{ks}^m C_{ks} A_{ks} A_{ds} T_{ds} A_{ds} A_{ds} A_{ds} T_{ds} A_{ds}^m C_{ds}^m C_{ds}$ $ds G_{ds} A_{ks} G_{ks} G_k$	175

Нижний индекс «k» представляет нуклеозид сEt, нижний индекс «d» представляет стереостандартный нуклеозид ДНК, нижний индекс «s» указывает на фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «o» указывает на фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, верхний индекс «m» перед С представляет 5-метилцитозин, «[nC6o]» указывает на 6-аминогексаноловый линкер, «[BCN]» указывает на (бицикло[6.1.0]нонин)-формильный линкер, «[sC6o]» указывает на 6-меркаптогексаноловый линкер, «[ПЭГ1алкин]» указывает на пропаргил-ПЭГ1-кислоту, «[T<sub>do</sub><sup>m</sup>C<sub>do</sub>A<sub>d</sub>]» указывает на тринуклеотидный линкер ТСА, и «[малеимидС3оил]» указывает на малеимидпропионильный линкер, имеющий структуру:



Был разработан (как описано в таблице ниже) и синтезирован модифицированный олигонуклеотид, комплементарный 486178 (описанному в данном документе выше). Соединение в таблице ниже имеет модификацию на 5'-конце, которая дает возможность конъюгировать с бициклическим лигандом.

**Таблица 4**

Дизайн модифицированного олигонуклеотида с линкерами для конъюгации с бициклическими лигандами CD71, комплементарными 486178.

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1614438	[BCN][nC6o] <sup>o</sup> mC <sub>ko</sub> mC <sub>ko</sub> T <sub>ko</sub> <sup>m</sup> C <sub>do</sub> G <sub>do</sub> G <sub>do</sub> T <sub>do</sub> A <sub>do</sub> T <sub>do</sub> T <sub>do</sub> T <sub>do</sub> A <sub>do</sub> T <sub>do</sub> T <sub>ko</sub> G <sub>ko</sub> T <sub>k</sub>	169

Нижний индекс «k» представляет нуклеозид cEt, нижний индекс «d» представляет стереостандартный нуклеозид ДНК, нижний индекс «o» обозначает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, верхний индекс «m» перед буквой C представляет собой 5-метилцитозин, «[nC6o]» обозначает 6-аминогексаноловый линкер, и «[BCN]» обозначает (бицикло[6.1.0]нонин)формильный линкер.

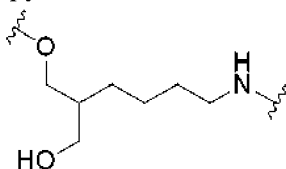
Были разработаны и синтезированы модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные MALAT мыши (как указано в таблице ниже). Соединение в таблице ниже имеет модификацию на 3'-конце, которая дает возможность конъюгировать с бициклическим лигандом.

**Таблица 5**

Дизайн модифицированных олигонуклеотидов, комплементарных MALAT мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1598988	[5Cy3cHex] <sub>s</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> T <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> A <sub>eo</sub> G <sub>eo</sub> <sup>m</sup> C <sub>eo</sub> [3nC7][BCN]	177
1591118	[5Cy3cHex] <sub>s</sub> G <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ks</sub> T <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ks</sub> G <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>k</sub> <sub>o</sub> [3nC7][BCN]	170

Нижний индекс «e» представляет 2'-МОЭ-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «s» обозначает фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «o» обозначает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, верхний индекс «m» перед буквой C представляет 5-метилцитозин, «[BCN]» обозначает (бицикло[6.1.0]нонин)-формильный линкер, «[5Cy3cHex]» обозначает 5'-Cy3-циклогексановый фрагмент (GenePharma 11-4100), и «[3nC7]» представляет модификатор аминогруппы 3'-C7, имеющий следующую структуру:





**[3nС7]****Пример 3: Дизайн соединений РНКи, нацеленных на HPRT1**

Были разработаны и синтезированы антисмысловые олигонуклеотиды с модифицированной цепью, комплементарные HPRT мыши, как указано в таблице ниже.

**Таблица 6**

Разработка антисмысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, нацеленных на HPRT1 человека/мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	Мишень	SEQ ID №:
1453015	A <sub>ys</sub> U <sub>fs</sub> A <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> A <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> U <sub>fo</sub> C <sub>yo</sub> A <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> A <sub>ys</sub> A <sub>ys</sub> U <sub>y</sub>	HPRT мыши	171

В приведенной выше таблице нижний индекс «f» представляет 2'-F-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «y» представляет 2'-ОМе-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «s» представляет фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, и нижний индекс «o» представляет фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

Смысловой олигонуклеотид комплементарен первому из 21 нуклеотида антисмыслового олигонуклеотида (от 5' до 3'), причем последние два 3'-нуклеотида антисмысловых олигонуклеотидов не спарены со смысловым олигонуклеотидом (являются выступающими нуклеотидами).

**Таблица 7**

Дизайн смысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, нацеленных на HPRT1 человека/мыши, содержащих C16-модифицированные нуклеозиды

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1550983	U <sub>ys</sub> C <sub>ys</sub> C <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> G <sub>fo</sub> A <sub>yo</sub> C <sub>fo</sub> U <sub>fo</sub> G <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> [3nС7][BCN]	181
1547771	U <sub>ys</sub> C <sub>ys</sub> C <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> G <sub>fo</sub> A <sub>yo</sub> C <sub>fo</sub> U <sub>fo</sub> G <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> [3nС7][малеимидС3оил]	172

В приведенной выше таблице нижний индекс «f» представляет 2'-F-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «y» представляет 2'-ОМе-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «s» представляет фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «o» представляет фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, «[BCN]» обозначает (бицикло[6.1.0]нонин)-формильный линкер, «[3nС7]» представляет модификатор аминогруппы 3'-С7, и «[малеимидС3оил]» обозначает малеимидопропионильный линкер.

**Таблица 8**

Дизайн соединений РНКи, нацеленных на HPRT1 человека/мыши

№ дуплексного соединения	№ соединения с антисмысловой цепью	№ соединения со смысловой цепью
1453015:1550983	1453015	1550983
1453015:1547771	1453015	1547771

**Пример 4: Анализ связывания *in vitro* для связывания олигомерных соединений, содержащих бициклические лиганды CD71, с рецептором трансферрина человека, CD71**

Анализ nanoBRET был разработан для получения константы ингибирования  $K_i$  модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, и соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71. Использование анализа nanoBRET для связывания олигонуклеотидов с белками было описано ранее (см., например, Vickers and Crooke, PloS One, 2016, 11(8):e061930).

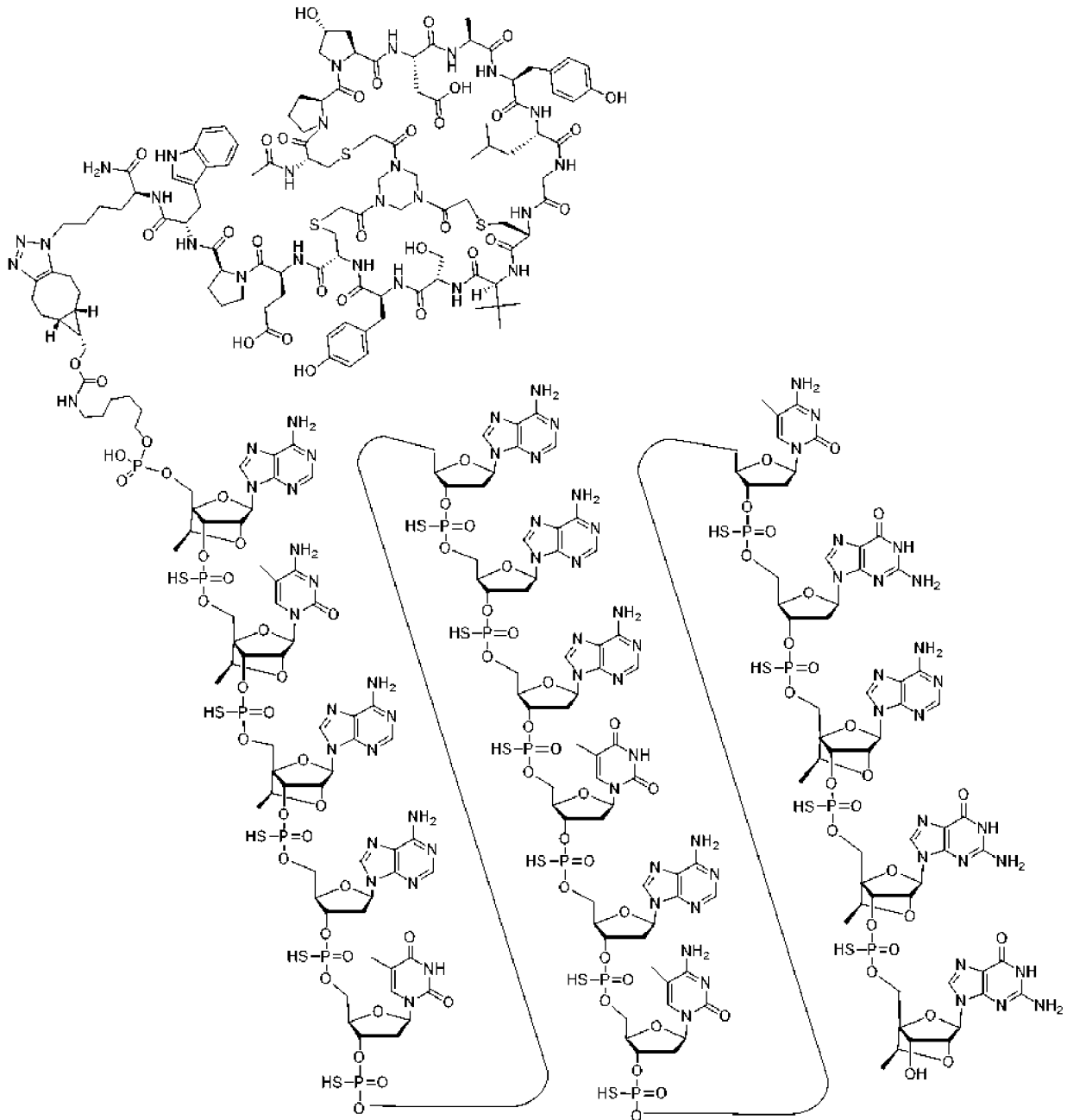
Слитый белок hCD71-Nluc был сконструирован путем связывания NanoLuc (ProMega) через его N-концевой Val с C-концевым остатком F760 h-CD71 с использованием гибкого линкера GGGSGGSSG. Флуоресцентно меченный (Cy3) модифицированный олигонуклеотид 1598988 был конъюгирован с бициклическим лигандом BCY17871 посредством реакции азид-алкинового циклоприсоединения, стимулируемой штаммом (SPAAC).

Неочищенные мембранные фракции клеток HEK293, стабильно экспрессирующих hCD71-Nluc, ресуспендировали в ФСБ, и по 100 мкл распределяли в белые 96-луночные аналитические планшеты (ThermoFisher Scientific, кат. № 136101), в количестве, соответствующем 10000 клеток на лунку. Мембраны обрабатывали 11,1 мкл BCY17871-1598988 при последовательных разведениях в конечных концентрациях 1000-0,006 нМ. Смеси инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре для достижения равновесия. Для инициации BRET в каждую лунку добавляли 12,4 мкл 100 мкМ субстрата Nluc фуримазина, и смеси инкубировали в течение 5-30 минут. Аналитический планшет считывали на планшет-ридере Promega GlowMax Discover при длинах волн 450 нм и 600 нм, и соотношение излучений при длинах волн 450/600 использовали для получения % эффективности BRET. Данные подвергали нелинейной регрессии, а затем подгоняли к гиперболической функции связывания с одним сайтом. Установлено, что константа диссоциации  $K_D$  BCY17871-1598988 составила 57-58 нМ.

Для оценки модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, и соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, анализ был модифицирован следующим образом. 100 мкл неочищенных мембранных фракций из стабильно трансфицированных клеток hCD71-Nluc HEK293 распределяли в белые 96-луночные аналитические планшеты (ThermoFisher Scientific, кат. № 136101). BCY17871-1598988 использовали в качестве индикаторного соединения и добавляли в каждую лунку в конечной концентрации 60 нМ. Модифицированные олигонуклеотиды конъюгировали с бициклическими лигандами посредством реакции SPAAC. Затем их добавляли в диапазоне концентраций в трех точках

анализа, и смеси инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре. BRET начинали с добавления фуримазина и анализ завершали, как описано выше. Константы ингибирования ( $K_i$ ) были получены путем подгонки значений эффективности %BRET к модели конкурентного ингибирования с использованием значения  $K_D$ , оцененного для BCY17871-1598988, полученного в том же эксперименте. Значения представлены как среднее значение данных трехкратных повторений в таблицах ниже. Каждый эксперимент представлен в отдельной таблице.

Бициклические лиганды присоединены к модифицированным олигонуклеотидам через линкер BCN. Соединение 1590463-BCY17901 показано ниже в качестве примера:



(SEQ ID №: 92 и 176)

### Таблица 9

Константы ингибирования модифицированных олигонуклеотидов,

конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью nanoBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
1590463	BCY17868	20
1590463	BCY17869	55
1590463	BCY17870	7
1590463	BCY17871	6
1590463	BCY17872	21
1590463	BCY17873	6
1590463	BCY17874	10
1590463	BCY17875	4
1590463	BCY17876	29
1590463	BCY17877	18
1590463	BCY17878	74
1590463	BCY17879	25
1590463	BCY17880	102

**Таблица 10**

Константы ингибирования модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью nanoBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
1590463	BCY17882	23
1590463	BCY17890	17
1590463	BCY17892	11
1590463	BCY17894	8
1590463	BCY17896	2
1590463	BCY17899	4
1590463	BCY17901	1
1590463	BCY17903	125
1590463	BCY17904	31
1590463	BCY17905	148
1590463	BCY17873	7

**Таблица 11**

Константы ингибирования модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью nanoBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
1590463	BCY17882	3
1590463	BCY17890	2
1590463	BCY17892	1
1590463	BCY17894	1
1590463	BCY17896	1
1590463	BCY17899	1

1590463	BCY17901	0,3
1590463	BCY17903	24
1590463	BCY17904	5
1590463	BCY17905	16
1614439	BCY17906	2
1590463	BCY17873	1
1602000	BCY17873	1
1609732	BCY17873	1

**Таблица 12**

Константы ингибирования модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью папоBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
1590463	BCY17882	55
1590463	BCY17890	20
1590463	BCY17892	11
1590463	BCY17894	10
1590463	BCY17896	2
1590463	BCY17899	4
1590463	BCY17901	1
1590463	BCY17904	60
1614439	BCY17906	23
1590463	BCY17873	10
1602000	BCY17873	36
1609732	BCY17873	10

**Таблица 13**

Константы ингибирования модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью папоBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
1590463	BCY17873	4
1590463	BCY19405	3
1590463	BCY19406	2
1590463	BCY19407	2
1590463	BCY19409	1

**Таблица 14**

Константы ингибирования модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью папоBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
1598988	BCY17896	9,9
1591118	BCY17896	3,1
1598988	BCY17901	4,4
1591118	BCY17901	1,4

Дуплекс модифицированных олигонуклеотидов получали путем смешивания

соединения № 486178 и 1614438 для получения соединения № 486178:1614438.

**Таблица 15**

Константы ингибирования модифицированных дуплексов олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью nanoBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
486178:1614438	BCY17873	95

**Таблица 16**

Константы ингибирования соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью nanoBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
1453015:1550983	BCY17873	9

**Таблица 17**

Константы ингибирования соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, с помощью nanoBRET

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_i$ (нМ)
1453015:1550983	BCY17873	38

**Пример 5: Аффинность связывания модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71**

Аффинность связывания для каждого из следующих модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на приборе поверхностного плазмонного резонанса (SPR) Biacore X100. 200 единиц модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическим лигандом CD71, иммобилизовали на стрептавидиновом чипе путем инъекции 20 нМ раствора меченой 5'-биотином ДНК (5'-биотин-TEG-ДНК, комплементарная модифицированному олигонуклеотиду), образующей дуплекс с модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическим лигандом CD71 в рабочем буфере HBS-P (10 мМ HEPES, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,0005% поверхностно-активного вещества P20). CD71 в рабочем буфере затем инъецировали на модифицированные олигонуклеотиды, конъюгированные с дуплексом бициклического лиганда CD71, который иммобилизован на стрептавидиновом чипе, при 25 °С, при возрастающих концентрациях 6,25 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ и 100 нМ. Кинетический и равновесный анализ связывания проводили с использованием программного обеспечения для оценивания Biacore X100, применяя аппроксимирование связывания 1:1. Аффинность связывания выражается как равновесная константа диссоциации ( $K_D$ ) в таблице ниже.

**Таблица 18**

Аффинность связывания модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, SPR

Номер соединения	Бициклический лиганд	$K_D$ (нМ)
1590463	BCY17868	0,9

1590463	BCY17869	14,5
1590463	BCY17870	0,1
1590463	BCY17871	2,4
1590463	BCY17872	77,1
1590463	BCY17873	12
1590463	BCY17874	32
1590463	BCY17875	4,5
1590463	BCY17876	95,4
1590463	BCY17877	12,5
1590463	BCY17878	126
1590463	BCY17879	31,2
1590463	BCY17880	8,2

**Пример 6: Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>**

У мышей с нокаутом человеческого рецептора трансферрина (hTFR)/CD71, использованных в этих исследованиях, кодирующая область экзона 2 мыши, а также донорный сайт сплайсинга интрона 2 мыши заменены открытой рамкой считывания TFR человека в соответствии с транскриптом NCBI NM\_001128148.2. Гуманизацию гена рецептора трансферрина осуществляли посредством редактирования гена, опосредованного CRISPR/Cas-9, что позволило создать модель с конститутивной экспрессией гена гуманизированного рецептора трансферрина. Стратегия нацеливания была основана на транскриптах NCBI NM\_011638.4 (мышь) и NM\_001128148.2 (человек). Плазмиду, обеспечивающую экспрессию мРНК Cas9, специфической гРНК и кассеты устойчивости к пурамицину; и плазмиду, содержащую гомологичные области гена рецептора трансферрина мыши, сайт FRT и замененную человеческую область, котрансфицировали в клеточную линию Taconic Biosciences C57BL/6N Tac ES. Гуманизированных мышей в данном документе называют мышами с нокаутом hTFR<sup>KI/+</sup>. Они экспрессируют одну копию гена TFR мыши и одну копию гуманизированного гена TFR под контролем эндогенного мышинового промотора.

Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на нокаутных мышях hTFR<sup>KI/+</sup>. Кроме того, была протестирована активность Соединения № 1468770 (описанного выше в данном документе), конъюгированного с Fab'-фрагментами антитела ОКТ9 (BioXCell, каталожный номер: BE0023), который нацелен на человеческий CD71.

*Лечение*

Мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3 мыши в каждой. Каждой мыши

внутривенно вводили конъюгированный модифицированный олигонуклеотид в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблице ниже. Группе из 3 мышей внутривенно вводили неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблице ниже. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

#### *Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через неделю после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу (квад.), переднюю большеберцовую мышцу (ТА), диафрагму, трицепс, сердце, икроножную мышцу (икру)), аорту, седалищный нерв и ткань печени для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мышцы с использованием набора мышинных праймеров-зондов RTS3181 (прямая последовательность GACATATGCCAAGATTGTGCACTAC, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 16; обратная последовательность CACGAATGAGGTCCTGAGCTT, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 17; последовательность зонда AACACTTGTCTGCTGCCGCTGGC, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 18). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мышцы относительно контроля ФСБ, нормализованного по отношению к GAPDH мышцы (% контроля).

**Таблица 19**

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	РНК DMPK мышцы (% от контроля)								
			Четырехглавая мышца	Большеберцовая мышца	Диафрагма	Сердце	Икроножная мышца	Трицепс	Аорта	Печень	Седалищный нерв
486178	Нет	35	25	36	30	53	24	31	44	10	50
1468770	ОКТ9	3,5	19	23	24	39	16	28	61	11	72
1590463	BCY17868	3,5	47	58	46	76	44	56	60	28	71
1590463	BCY17869	3,5	48	64	51	74	46	58	69	25	65
1590463	BCY17877	3,5	45	54	54	78	42	54	103	34	72
1590463	BCY17878	3,5	52	57	55	81	46	56	93	31	87
1590463	BCY17879	3,5	46	55	50	79	43	55	78	29	76
1590463	BCY17880	3,5	49	58	60	82	46	53	80	30	71
1590463	BCY17875	3,5	34	39	44	72	30	40	61	30	71



1590463	BCY17876	3,5	54	61	59	84	48	57	59	27	81
1590463	BCY17870	3,5	35	43	44	70	32	40	67	29	72
1590463	BCY17872	3,5	36	44	43	73	35	44	64	26	70
1590463	BCY17871	3,5	40	51	44	71	37	49	61	27	79
1590463	BCY17873	3,5	32	40	39	70	31	38	62	27	73
1590463	BCY17874	3,5	36	48	45	72	36	43	69	29	72

*Химические маркеры плазмы*

Оценить влияние модифицированных олигонуклеотидов на функцию печени и почек, уровни альбумина (АЛБ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), азота мочевины крови (АМК), общего билирубина (ТВІЛ), общего белка (PROТ), креатина (CREAT) и креатинкиназы (СК) в плазме измеряли в день умерщвления мышей (день 22) с использованием автоматического клинического химического анализатора (Hitachi Olympus AU400с, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты были усреднены для каждой группы мышей и представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие изменения уровней любого из маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для модифицированных олигонуклеотидов, были исключены из дальнейших исследований.

**Таблица 20**

Химические маркеры плазмы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	Клинический анализ плазмы							
			АЛБ (г/дл)	АЛТ (Ед./л)	АСТ (Ед./л)	ТВІЛ (мг/дл)	BUN (мг/дл)	PROТ (г/дл)	CREAТ (мг/дл)	СК (Ед./л)
ФСБ	Нет	0	2,95‡	30‡	124‡	0,19‡	23‡	5,03‡	0,13‡	409‡
486178	Нет	35	2,95	44	199	0,29	20	5,03	0,15	671
1468770	ОКТ9	3,5	3,18	28	113	0,19	21	5,00	0,11	372
1590463	BCY17868	3,5	3,04	51	172	0,16	19	4,97	0,14	571
1590463	BCY17869	3,5	3,01	56	143	0,21	17	4,90	0,11	350
1590463	BCY17870	3,5	3,18	40	132	0,20	20	5,20	0,17	374
1590463	BCY17871	3,5	3,20	45	167	0,24	17	5,33	0,16	505
1590463	BCY17872	3,5	3,21	42	116	0,17	18	5,23	0,15	297
1590463	BCY17873	3,5	3,11	68	231	0,20	19	5,13	0,12	723
1590463	BCY17874	3,5	3,31	28	107	0,13	17	5,33	0,15	395
1590463	BCY17875	3,5	2,91	50	147	0,13	18	4,60	0,11	486
1590463	BCY17876	3,5	2,86	25	133	0,13	15	4,57	0,13	463
1590463	BCY17877	3,5	3,19	22	85	0,18	19	5,27	0,12	163
1590463	BCY17878	3,5	3,20	31	160	0,14	19	5,23	0,14	531
1590463	BCY17879	3,5	2,94	44	176	0,12	16	4,83	0,12	554
1590463	BCY17880	3,5	3,15	34	268	0,20	17	4,97	0,13	1080

‡ указывает, что доступно менее 4 образцов

#### Гематологические анализы

Кровь, полученную от мышей в день умерщвления мышей (22-й день), отправляли в IDEXX BioResearch для измерения количества клеток крови. Проведенные подсчеты включают количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний эритроцитарный объем (MCV), средний гемоглобин в эритроците (MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC). Оценивали количество отдельных лейкоцитов, таких как моноциты (MON), нейтрофилы (NEU), лимфоциты (LYM), эозинофилы (EOS), базофилы (BAS), ретикулоцитов и тромбоцитов. Результаты представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие изменения количества клеток крови за пределами ожидаемого диапазона, были исключены из дальнейших исследований.

**Таблица 21**

Гематологические параметры у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	WBC (10 <sup>3</sup> /мкл)	RBC (10 <sup>12</sup> /л)	HGB (г/дл)	HCT (%)	MCV (фл)	МСН (пг)	МСНС (г/дл)
ФСБ	Нет	0	4‡	10‡	13‡	43‡	45‡	14‡	31‡
486178	Нет	35	4	10	14	45	44	13	30
1468770	ОКТ9	3,5	5	10	14	46	44	13	31
1590463	BCY17868	3,5	4	10	14	46	46	14	30
1590463	BCY17869	3,5	6	10	14	47	45	14	31
1590463	BCY17870	3,5	5	10	14	46	45	14	30
1590463	BCY17871	3,5	5	10	14	46	44	13	30
1590463	BCY17872	3,5	6	10	14	46	44	14	31
1590463	BCY17873	3,5	6	11	14	47	44	13	30
1590463	BCY17874	3,5	7	11	14	47	44	13	31
1590463	BCY17875	3,5	7	11	15	48	45	13	30
1590463	BCY17876	3,5	6	10	14	47	45	14	30
1590463	BCY17877	3,5	8	11	14	47	44	13	30
1590463	BCY17878	3,5	6	11	14	47	44	13	31
1590463	BCY17879	3,5	5	11	14	48	44	13	30
1590463	BCY17880	3,5	7	11	15	48	44	13	30

‡ указывает, что доступно менее 4 образцов

**Таблица 22**

Количества клеток крови у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№	Конъюгат	Доза	NEU	LYM	MON	EOS	BAS	PLT	RETI
---	----------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------

соединения		(мг/кг)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(10 <sup>9</sup> /л)	(10 <sup>3</sup> /мкл)
ФСБ	Нет	0	11‡	82‡	6‡	0,87‡	0,00‡	1083‡	784‡
486178	Нет	35	9	83	6	1,87	0,13	1010	619
1468770	ОКТ9	3,5	10	85	4	1,00	0,10	948	620
1590463	ВСУ17868	3,5	12	80	6	2,33	0,00	912	755
1590463	ВСУ17869	3,5	7	86	4	2,00	0,17	1019	842
1590463	ВСУ17870	3,5	8	84	6	2,13	0,03	1113	779
1590463	ВСУ17871	3,5	14	80	5	1,23	0,20	1087	730
1590463	ВСУ17872	3,5	10	86	4	0,30	0,07	991	683
1590463	ВСУ17873	3,5	10	81	5	3,20	0,30	958	727
1590463	ВСУ17874	3,5	8	86	4	2,07	0,13	1054	715
1590463	ВСУ17875	3,5	8	85	4	2,53	0,20	964	826
1590463	ВСУ17876	3,5	9	85	4	2,07	0,27	974	775
1590463	ВСУ17877	3,5	10	82	5	2,67	0,13	1018	703
1590463	ВСУ17878	3,5	8	84	4	3,77	0,27	896	826
1590463	ВСУ17879	3,5	13	82	4	1,33	0,07	861	749
1590463	ВСУ17880	3,5	10	83	4	3,40	0,33	966	838

‡ указывает, что доступно менее 4 образцов

#### Масса тела и органов

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже. Массу печени, почек и селезенки измеряли в день умерщвления мышей (день 22), а средние массы органов для каждой группы представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие какие-либо изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для модифицированных олигонуклеотидов, были исключены из дальнейших исследований.

**Таблица 23**

Массы тела и органов (в граммах)

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)		Масса органа (г)		
			День 1	День 22	Печень	Почка	Селезенка
ФСБ	Нет	0	23	24	1,15‡	0,28	0,09
486178	Нет	35	22	24	1,23	0,28	0,09
1468770	ОКТ9	3,5	27	28	1,37	0,32	0,09
1590463	ВСУ17868	3,5	22	22	1,14	0,28	0,09
1590463	ВСУ17869	3,5	24	24	1,14	0,28	0,09
1590463	ВСУ17870	3,5	22	23	1,18	0,28	0,09

1590463	BCY17871	3,5	24	24	1,17	0,30	0,08
1590463	BCY17872	3,5	23	24	1,19	0,30	0,08
1590463	BCY17873	3,5	23	23	1,10	0,28	0,08
1590463	BCY17874	3,5	22	22	1,03	0,27	0,09
1590463	BCY17875	3,5	22	23	1,03	0,28	0,08
1590463	BCY17876	3,5	22	23	1,04	0,27	0,09
1590463	BCY17877	3,5	23	23	1,04	0,29	0,16
1590463	BCY17878	3,5	24	25	1,13	0,28	0,09
1590463	BCY17879	3,5	23	25	1,12	0,29	0,09
1590463	BCY17880	3,5	23	24	1,09	0,29	0,08

‡ указывает, что доступно менее 4 образцов

**Пример 7: Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, и дуплексного модифицированного олигонуклеотида, конъюгированного с бициклическим лигандом CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>**

Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на нокаутных мышях hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе). Кроме того, была протестирована активность Соединения № 1468770 (описанного выше в данном документе), конъюгированного с Fab'-фрагментами антитела ОКТ9 (BioXCell, каталожный номер: BE0023), который нацелен на человеческий CD71.

*Лечение*

Мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3 мыши в каждой. Каждой мышке внутривенно вводили конъюгированный модифицированный олигонуклеотид в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблице ниже. Группе из 3 мышей внутривенно вводили неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблице ниже. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

*Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через четыре дня после последнего введения (на 19-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу (квад.), переднюю большеберцовую мышцу (ТА), диафрагму (диаф.), трицепс, сердце, икроножную мышцу (икру)), аорту, седалищный нерв и ткань печени для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мышца с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мышца относительно контроля ФСБ, нормализованного по отношению к GAPDH мышца (% контроля).

**Таблица 24**

Снижение уровня РНК DMPK мышца у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими

лигандами CD71

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	РНК DMPK мышцы (% от контроля)						
			Четырехглавая мышца	Икроножная мышца	Большеберцовая мышца	Трицепс	Диафр.	Сердце	Печень
486178	Нет	35	23	29	29	28	20	54	12
1468770	ОКТ9	3,5	34	35	32	44	21	39	15
1590463	BCY17882	3,5	49	49	61	56	49	75	43
1590463	BCY17890	3,5	47	47	67	49	49	81	61
1590463	BCY17892	3,5	45	46	49	46	33	61	30
1590463	BCY17894	3,5	44	48	46	48	28	59	25
1590463	BCY17896	3,5	36	43	37	41	26	62	24
1590463	BCY17899	3,5	53	59	58	61	40	70	24
1590463	BCY17901	3,5	26‡	32‡	24‡	27‡	19‡	43‡	28‡
1614439	BCY17906	3,5	50	57	57	55	37	60	30
1590463	BCY17904	3,5	58	64	61	58	44	75	27
1590463	BCY17873	3,5	46	53	48	48	32	59	31
1602000	BCY17873	3,5	50	54	58	52	33	69	28
486178:1 614438	BCY17873	3,5	60	61	66	56	48	69	40
1609732	BCY17873	3,5	45	49	51	46	34	59	25

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

*Химические маркеры плазмы*

Оценить влияние модифицированных олигонуклеотидов на функцию печени и почек, уровни альбумина (АЛБ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), азота мочевины крови (АМК), общего билирубина (ТБИЛ), общего белка (ПРОТ), креатина (CREAT) и креатинкиназы (СК) в плазме измеряли в день умерщвления мышей (день 19) с использованием автоматического клинического химического анализатора (Hitachi Olympus AU400с, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты были усреднены для каждой группы мышей и представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие изменения уровней любого из маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для модифицированных олигонуклеотидов, были исключены из дальнейших исследований.

**Таблица 25**Химические маркеры плазмы у нокаутных мышей hTFR<sup>KU/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	Клинический анализ плазмы						
			АЛБ (г/дл)	АЛТ (Ед./л)	АСТ (Ед./л)	ТБИЛ (мг/дл)	ВУН (мг/дл)	ПРОТ (г/дл)	СРЕАТ (мг/дл)
ФСБ	Нет	0	3,32	93	220	0,20	24	5,25	0,12
486178	Нет	35	3,53	40	106	0,16	25	5,67	0,15
1468770	ОКТ9	3,5	3,56	34	74	0,15	26	5,63	0,15
1590463	ВСУ17882	3,5	3,67	76	149	0,15	20	5,53	0,15
1590463	ВСУ17890	3,5	3,76	36	127	0,15	24	5,73	0,16
1590463	ВСУ17892	3,5	3,10	35	103	0,13	21	4,80	0,11
1590463	ВСУ17894	3,5	3,13	102	257	0,19	22	5,00	0,14
1590463	ВСУ17896	3,5	3,91	72	133	0,16	27	6,40	0,23
1590463	ВСУ17899	3,5	3,61	54	134	0,15	24	5,83	0,17
1590463	ВСУ17901	3,5	2,85 ‡	56‡	180‡	0,11‡	19‡	4,70 ‡	0,12‡
1614439	ВСУ17906	3,5	3,13	53	153	0,14	21	4,93	0,12
1590463	ВСУ17904	3,5	3,65	52	103	0,12	23	6,03	0,18
1590463	ВСУ17873	3,5	3,17	40	134	0,16	22	5,17	0,13
1602000	ВСУ17873	3,5	3,54	33	78	0,13	23	5,87	0,18
486178:1 614438	ВСУ17873	3,5	3,25	32	119	0,14	20	5,17	0,13
1609732	ВСУ17873	3,5	3,42	58	150	0,14	22	5,50	0,17

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

#### Гематологические анализы

Кровь, полученную от мышей в день умерщвления мышей (19-й день), отправляли в IDEXX BioResearch для измерения количества клеток крови. Проведенные подсчеты включают количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний эритроцитарный объем (MCV), средний гемоглобин в эритроците (MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC). Оценивали количество отдельных лейкоцитов, таких как моноциты (MON), нейтрофилы (NEU), лимфоциты (LYM), эозинофилы (EOS), базофилы (BAS), ретикулоцитов и тромбоцитов. Результаты представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие изменения количества клеток крови за пределами ожидаемого диапазона, были исключены из дальнейших исследований.

Таблица 26

Гематологические параметры у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	WBC (10 <sup>3</sup> /мкл)	RBC (10 <sup>12</sup> /л)	HG В (г/дл)	НС Т (%)	МС V (фл)	МС Н (пг)	МСН С (г/дл)
ФСБ	Нет	0	7	12	15	46	39	12	32
486178	Нет	35	7	12	14	45	40	13	32
1468770	ОКТ9	3,5	9	12	15	47	40	12	31
1590463	BCY17882	3,5	5	11	14	45	41	13	31
1590463	BCY17890	3,5	4	11	14	44	40	13	32
1590463	BCY17892	3,5	8	12	15	46	40	13	32
1590463	BCY17894	3,5	12	12	14	46	40	13	32
1590463	BCY17896	3,5	8	12	15	46	39	12	32
1590463	BCY17899	3,5	7	12	15	46	39	12	32
1590463	BCY17901	3,5	12‡	11‡	14‡	47‡	42‡	13‡	30‡
1614439	BCY17906	3,5	8	12	15	47	40	13	32
1590463	BCY17904	3,5	9	11	14	46	40	13	31
1590463	BCY17873	3,5	9	12	15	47	40	12	31
1602000	BCY17873	3,5	10	12	14	47	41	13	31
486178:1 614438	BCY17873	3,5	10	12	15	48	40	12	31
1609732	BCY17873	3,5	11‡	12‡	15‡	47‡	40‡	12‡	31‡

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

Таблица 27

Количества клеток крови у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	NEU (%)	LYM (%)	MON (%)	EOS (%)	BAS (%)	PLT (10 <sup>9</sup> /л)	RETI (10 <sup>3</sup> /мкл)
ФСБ	Нет	0	11	83	5	1,28	0,15	1095	437
486178	Нет	35	12	82	4	1,37	0,40	1335	462
1468770	ОКТ9	3,5	10	85	4	0,87	0,30	1169	430
1590463	BCY17882	3,5	10	85	3	1,03	0,23	930	382
1590463	BCY17890	3,5	13	82	4	1,40	0,33	942	354

1590463	BCY17 892	3,5	10	85	3	1,50	0,20	1119	401
1590463	BCY17 894	3,5	30	61	9	0,33	0,03	1081	416
1590463	BCY17 896	3,5	15	79	6	0,33	0,00	1246	441
1590463	BCY17 899	3,5	9	88	2	1,20	0,10	1185	428
1590463	BCY17 901	3,5	24‡	64‡	10‡	1,40‡	0,10‡	1122‡	411‡
1614439	BCY17 906	3,5	11	84	3	1,87	0,23	1127	458
1590463	BCY17 904	3,5	16	75	7	1,20	0,13	1238	417
1590463	BCY17 873	3,5	9	86	4	1,30	0,13	1444	501
1602000	BCY17 873	3,5	10	84	4	2,30	0,13	1165	414
486178:1 614438	BCY17 873	3,5	10	85	3	1,57	0,13	1174	450
1609732	BCY17 873	3,5	10‡	85‡	3‡	1,90‡	0,20‡	1203‡	442‡

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

#### *Масса тела и органов*

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 19, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже. Массу печени, почек и селезенки измеряли в день умерщвления мышей (день 19), а средние массы органов для каждой группы представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие какие-либо изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для модифицированных олигонуклеотидов, были исключены из дальнейших исследований.

**Таблица 28**

Массы тела и органов (в граммах)

№ соедине ния	Конъюгат	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)		Масса органа (г)		
			День 1	День 19	Печень	Почка	Селезенка
ФСБ	Нет	0	29	30	1,40	0,40	0,07



486178	Нет	35	28	29	1,45	0,37	0,08
1468770	ОКТ9	3,5	31	33	1,59	0,43	0,08
1590463	BCY17882	3,5	22	23	1,11	0,31	0,09
1590463	BCY17890	3,5	22	24	1,16	0,30	0,08
1590463	BCY17892	3,5	27	29	1,48	0,37	0,08
1590463	BCY17894	3,5	29	30	1,49	0,40	0,08
1590463	BCY17896	3,5	29	30	1,53	0,43	0,08
1590463	BCY17899	3,5	29	30	1,51	0,43	0,08
1590463	BCY17901	3,5	30‡	32‡	1,69‡	0,44‡	0,08‡
1614439	BCY17906	3,5	26	27	1,36	0,40	0,07
1590463	BCY17904	3,5	28	29	1,52	0,41	0,08
1590463	BCY17873	3,5	29	30	1,47	0,42	0,07
1602000	BCY17873	3,5	33	35	1,80	0,44	0,09
486178:1 614438	BCY17873	3,5	29	31	1,43	0,41	0,08
1609732	BCY17873	3,5	30	32	1,52	0,42	0,08

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

**Пример 8: Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>, несколько доз**

Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на нокаутных мышках hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе). Кроме того, была протестирована активность и переносимость Соединения № 1468770 (описанного выше в данном документе), конъюгированного с Fab'-фрагментами антитела ОКТ9 (BioXCell, каталожный номер: BE0023), которое нацелено на человеческий CD71.

*Лечение*

Мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3-4 мыши в каждой. Каждой мышке внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) вводили конъюгированный модифицированный олигонуклеотид в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 5 и 9) в дозах, указанных в таблице ниже. Группе из 3 мышей внутривенно вводили неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 5 и 9) в дозах, указанных в таблице ниже. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

*Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через шесть дней после последнего введения (на 15-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу

(квад.), переднюю большеберцовую мышцу (ТА), диафрагму, трицепс, сердце, икроножную мышцу (икру)), аорту, седалищный нерв и ткань печени для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мышцы с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мышцы относительно контроля ФСБ, нормализованного по отношению к GAPDH мышцы (% контроля).

**Таблица 29**

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>K1/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Конъюгат	Режим введения	Доза (мг/кг)	Четырехглавая мышца	Икроножная мышца	Большеберцовая мышца	Диафрагма	Сердце
				РНК DMPK мышцы (% от контроля)	РНК DMPK мышцы (% от контроля)	РНК DMPK мышцы (% от контроля)	РНК DMPK мышцы (% от контроля)	РНК DMPK мышцы (% от контроля)
486178	Нет	в/в	5	79	82	77	61	88
			20	35	40	42	28	63
			50	20	20	23	16	48
1468770	ОКТ9	в/в	1	84	91	87	67	73
			3,5	26	30	27	21	37
			10	17	17	18	11	34
1590463	BCY17901	в/в	1	79	74	71	57	75
			3,5	30	28	29	21	48
			10	14	15	14	14	44
1590463	BCY17896	в/в	1	74	75	84	60	81
			3,5	40	40	42	25	61
			10	23	28	28	16	56

1590463	BCY17896	п/к	3,5	63	61	59	48	76
---------	----------	-----	-----	----	----	----	----	----

**Таблица 30**

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Конъюгат	Режим введения	Четырехглавая мышца	Икроножная мышца	Большеберцовая мышца	Диафрагма	Сердце
			ED50 (мг/кг)	ED50 (мг/кг)	ED50 (мг/кг)	ED50 (мг/кг)	ED50 (мг/кг)
486178	Нет	в/в	13,5	15,4	15,2	8,1	39,5
1468770	ОКТ9	в/в	2,2	2,5	2,4	1,6	2,8
1590463	BCY17901	в/в	2,2	2	1,9	1,2	н/р
1590463	BCY17896	в/в	2,6	2,9	3,3	1,4	н/р

*Химические маркеры плазмы*

Оценить влияние модифицированных олигонуклеотидов на функцию печени и почек, уровни альбумина (АЛБ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), азота мочевины крови (АМК), общего билирубина (ТБИЛ), общего белка (ПРОТ), креатина (CREAT) и креатинкиназы (СК) в плазме измеряли в день умерщвления мышей (день 15) с использованием автоматического клинического химического анализатора (Hitachi Olympus AU400с, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты были усреднены для каждой группы мышей и представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие изменения уровней любого из маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для модифицированных олигонуклеотидов, были исключены из дальнейших исследований.

Таблица 31

Химические маркеры плазмы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Режим введения	Доза (мг/кг)	Клинический анализ плазмы						
				АЛБ (г/дл)	АЛТ (Ед./л)	АСТ (Ед./л)	ТБЛ (мг/дл)	BUN (мг/дл)	PROT (г/дл)	CREAT (мг/дл)
ФСБ	Нет	в/в	0	2,86	49	121	0,17	27	4,90	0,15
486178	Нет	в/в	5	2,78	31	83	0,12	27	4,80	0,15
			20	2,78	44	114	0,13	28	4,83	0,16
			50	2,78	46	115	0,14	26	4,83	0,14
1468770	ОКТ9	в/в	1	2,85	32	144	0,16	25	4,90	0,15
			3,5	2,73	34	56	0,15	24	4,70	0,15
			10	2,67	43	109	0,15	26	4,67	0,16
1590463	BCY17901	в/в	1	2,76	65	107	0,13	23	4,73	0,15
			3,5	2,86	59	206	0,13	23	4,97	0,18
			10	2,63	35	98	0,14	23	4,53	0,15
1590463	BCY17896	в/в	1	2,82	40	111	0,12	24	4,83	0,16
			3,5	2,77	44	161	0,10	22	4,70	0,16
			10	2,70	34	119	0,11	22	4,57	0,16
1590463	BCY17896	п/к	3,5	2,65	71	129	0,11	20	4,63	0,14

*Гематологические анализы*

Кровь, полученную от мышей в день умерщвления мышей (15-й день), отправляли в IDEXX BioResearch для измерения количества клеток крови. Проведенные подсчеты включают количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний эритроцитарный объем (MCV), средний гемоглобин в эритроците (MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC). Оценивали количество отдельных лейкоцитов, таких как моноциты (MON), нейтрофилы (NEU), лимфоциты (LYM), эозинофилы (EOS), базофилы (BAS), ретикулоцитов и тромбоцитов. Результаты представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие изменения количества клеток крови за пределами ожидаемого диапазона, были исключены из дальнейших исследований.

Таблица 32

Гематологические параметры у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Режим введения	Доза (мг/кг)	WBC (10 <sup>3</sup> /мкл)	RBC (10 <sup>12</sup> /л)	HGB (г/дл)	HCT (%)	MCV (фл)	MCH (пг)	MCHC (г/дл)
ФСБ	Нет	в/в	0	6	11	14	45	40	13	32
486178	Нет	в/в	5	8	12	15	47	41	13	31
			20	7	11	15	46	40	13	32
			50	7	11	15	47	41	13	32
1468770	ОКТ9	в/в	1	6	12	15	47	40	13	32
			3,5	7	12	15	46	39	12	32
			10	11	12	15	47	40	13	31
1590463	BCY17901	в/в	1	7	12	15	48	40	13	31
			3,5	7	12	15	48	40	13	32
			10	9	11	15	47	41	13	31
1590463	BCY17896	в/в	1	8	12	15	47	40	13	32
			3,5	7	12	15	49	41	13	31
			10	9	11	15	47	41	13	31
1590463	BCY17896	п/к	3,5	10	11	14	47	42	13	31

Таблица 33

Количества клеток крови у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Режим введения	Доза (мг/кг)	NEU (%)	LYM (%)	MON (%)	EOS (%)	BAS (%)	PLT (10 <sup>9</sup> /л)	RET (10 <sup>3</sup> /мкл)
ФСБ	Нет	в/в	0	9	83	7	2	0,03	1220	422
486178	Нет	в/в	5	8	84	6	1	0,00	1240	416
			20	10	80	6	3	0,10	1004	436
			50	12	78	9	1	0,03	1260	417
1468770	ОКТ9	в/в	1	9	83	6	2	0,20	1150	440
			3,5	8	84	6	2	0,13	1200	452
			10	7	84	6	3	0,03	1117	477
1590463	BCY17901	в/в	1	7	86	5	2	0,10	1263	448

			3,5	7	86	6	2	0,07	1149	451
			10	10	82	6	2	0,03	1112	417
1590463	BCY17896	в/в	1	8	85	5	2	0,07	1170	439
			3,5	13	79	5	4	0,00	1073	452
			10	8	84	6	2	0,07	1087	389
1590463	BCY17896	п/к	3,5	11	79	7	2	0,13	1203	446

*Масса тела и органов*

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 15, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже. Массу печени, почек и селезенки измеряли в день умерщвления мышей (день 15), а средние массы органов для каждой группы представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие какие-либо изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для модифицированных олигонуклеотидов, были исключены из дальнейших исследований.

**Таблица 34**

Массы тела и органов (в граммах)

№ соединения	Конъюгат	Режим введения	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)		Масса органа (г)		
				День 1	День 15	Печень	Почка	Селезенка
ФСБ	Нет	в/в	0	29	30	1,64	0,38	0,07
486178	Нет	в/в	5	27	28	1,52	0,37	0,07
			20	28	30	1,71	0,36	0,08
			50	25	28	1,53	0,33	0,07
1468770	ОКТ9	в/в	1	25	26	1,40	0,33	0,06
			3,5	28	29	1,58	0,38	0,07
			10	28	29	1,61	0,35	0,07
1590463	BCY17901	в/в	1	26	27	1,49	0,36	0,07
			3,5	36	37	1,89	0,41	0,08
			10	23	25	1,35	0,35	0,07
1590463	BCY17896	в/в	1	27	28	1,49	0,35	0,07
			3,5	28	29	1,53	0,37	0,07
			10	24	25	1,39	0,33	0,07
1590463	BCY17896	п/к	3,5	26	27	1,50	0,35	0,08

**Пример 9: Активность и переносимость соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>**

Активность и переносимость соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на нокаутных мышах hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе). Кроме того, была протестирована активность и переносимость Соединения № 1468770 (описанного выше в данном документе), конъюгированного с Fab'-фрагментами антитела ОКТ9 (BioXCell, каталожный номер: BE0023), которое нацелено на человеческий CD71.

#### *Лечение*

Мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3 мыши в каждой. Каждой мышке внутривенно вводили конъюгированное соединение РНКи в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблице ниже. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

#### *Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через четыре дня после последнего введения (на 19-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу (квад.), переднюю большеберцовую мышцу (ТА), диафрагму (диа.), трицепс, сердце, икроножную мышцу (икру)), аорту и ткань печени для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК HPRT мыши с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS43125 (прямая последовательность CTCCTCAGACCGCTTTTTCG, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 19; обратная последовательность TAACCTGGTTCATCATCGСТААТС, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 20; последовательность зонда CCGTCATGCCGACCCGCAGT, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 21). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК HPRT мыши относительно контроля ФСБ, нормализованного по отношению к GAPDH мыши (% от контроля).

#### **Таблица 35**

Снижение уровня РНК HPRT мыши у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> соединением РНКи, конъюгированным с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	РНК HPRT мыши (% от контроля)						
			Четырехглавая мышца	Икроножная мышца	Большеберцовая мышца	Трицепс	Диа.	Сердце	Печень
1453015: 1547771	ОКТ9	3,5	23	22	26	24	36	27	13
1453015: 1550983	BCY17873	3,5	27	24	32	30	48	34	57

Оценить влияние модифицированных олигонуклеотидов на функцию печени и почек, уровни альбумина (АЛБ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), азота мочевины крови (АМК), общего билирубина (ТВІЛ), общего белка (PROТ), креатина (CREAT) и креатинкиназы (СК) в плазме измеряли в день умерщвления мышей (день 19) с использованием автоматического клинического химического анализатора (Hitachi Olympus AU400с, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты были усреднены для каждой группы мышей и представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие изменения уровней любого из маркеров функции печени или почек за пределами ожидаемого диапазона для модифицированных олигонуклеотидов, были исключены из дальнейших исследований.

Таблица 36

Химические маркеры плазмы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	Клинический анализ плазмы						
			АЛБ (г/дл)	АЛТ (Ед./л)	АСТ (Ед./л)	ТВІЛ (мг/дл)	BUN (мг/дл)	PROТ (г/дл)	CREAT (мг/дл)
ФСБ	Нет	0	3,32	93	220	0,20	24	5,25	0,12
1453015: 1547771	ОКТ9	3,5	3,17	54	219	0,19	21	4,80	0,11
1453015: 1550983	BCY17873	3,5	3,31	39	143	0,14	21	5,13	0,15

*Гематологические анализы*

Кровь, полученную от мышей в день умерщвления мышей (19-й день), отправляли в IDEXX BioResearch для измерения количества клеток крови. Проведенные подсчеты включают количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний эритроцитарный объем (MCV), средний гемоглобин в эритроците (MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC). Оценивали количество отдельных лейкоцитов, таких как моноциты (MON), нейтрофилы (NEU), лимфоциты (LYM), эозинофилы (EOS), базофилы (BAS), ретикулоцитов и тромбоцитов. Результаты представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие изменения количества клеток крови за пределами ожидаемого диапазона, были исключены из дальнейших исследований.

Таблица 37

Гематологические параметры у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	WBC (10 <sup>3</sup> /мкл)	RBC (10 <sup>12</sup> /л)	HGB (г/дл)	HCТ (%)	MCV (фл)	MCH (пг)	MCHC (г/дл)
ФСБ	Нет	0	7	12	15	46	39	12	32
1453015: 1547771	ОКТ9	3,5	5	11	14	44	40	13	32
1453015: 1550983	BCY17873	3,5	9	11	14	45	40	13	31

Таблица 38



Количества клеток крови у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	NEU (%)	LYM (%)	MON (%)	EOS (%)	BAS (%)	PLT (10 <sup>9</sup> /л)	RET1 (10 <sup>3</sup> /мкл)
ФСБ	Нет	0	11	83	5	1,28	0,15	1095	437
1453015: 1547771	ОКТ9	3,5	12	82	3	1,77	0,27	1039	358
1453015: 1550983	BCY17873	3,5	10	84	4	1,67	0,10	939	370

*Масса тела и органов*

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 19, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже. Массу печени, почек и селезенки измеряли в день умерщвления мышей (день 19), а средние массы органов для каждой группы представлены в таблицах ниже. Олигомерные соединения, вызывавшие какие-либо изменения массы органов за пределами ожидаемого диапазона для модифицированных олигонуклеотидов, были исключены из дальнейших исследований.

**Таблица 39**

Массы тела и органов (в граммах)

№ соединения	Конъюгат	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)		Масса органа (г)		
			День 1	День 19	Печень	Почка	Селезенка
ФСБ	Нет	0	29	30	1,40	0,40	0,07
1453015: 1547771	ОКТ9	3,5	21	22	1,11	0,28	0,08
1453015: 1550983	BCY17873	3,5	23	24	1,19	0,33	0,09

**Пример 10: Дизайн, активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>, с различным химическим строением линкеров**

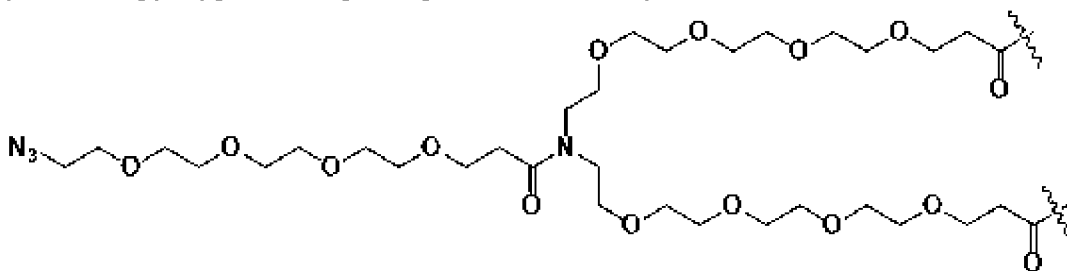
Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на нокаутных мышках hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе). Несколько бициклических лигандов CD71 были разработаны с удлинением С-конца для увеличения расстояния между олигонуклеотидом и полипептидными петлями бициклического лиганда, как указано в таблице ниже.

**Таблица 40: Бициклические лиганды**

№ бициклического	Представление бицикла (от N к C)	N-концевая модифика	C-концевая модифика	SEQ ID №:
------------------	----------------------------------	---------------------	---------------------	-----------

лиганда		ция	ция	
BCY19405	CSPDAHLGCISYCEPW[PEG10][K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	амидированный	52
BCY19406	CSPDAHLGCISYCEPW[PEG24][K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	амидированный	52
BCY19407	CSPDAHLGCISYCEPWGGSGGS[K(N <sub>3</sub> )]	ацетил	амидированный	79
BCY19409	(CSPDAHLGCISYCEPW) <sub>2</sub> -[Biv]	ацетил	амидированный	194

[ПЭГ10] представляет десять повторов этиленгликоля; [ПЭГ24] представляет собой 24 повтора этиленгликоля, а Biv представляет собой двухвалентный линкер в соответствии со следующей структурой, который присоединен к двум полипептидам:



Бивалентный линкер

*Лечение*

Мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 4 мыши в каждой. Каждой мышке внутривенно вводили конъюгированный модифицированный олигонуклеотид в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблице ниже. Группе из 4 мышей внутривенно вводили неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблице ниже. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

*Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через 7 дней после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу (квад.), переднюю большеберцовую мышцу (ТА), диафрагму (диафр.), сердце, икроножную мышцу (икру)), аорту, седалищный нерв и ткань печени для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мыши с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мыши относительно контроля ФСБ, нормализованного по отношению к GAPDH мыши (% контроля).

**Таблица 41**

Снижение уровня РНК DMPK мыши у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№	Бицикли	С-	Доз	РНК DMPK мыши (% от контроля)
---	---------	----	-----	-------------------------------

соединения	ческий лиганд	концевое удлинение	а (мг/кг)	Четырехглавая мышца	Икроножная мышца	Большеберцовая мышца	Седалищный нерв	Диафрагма	Сердце	Печень
ФСБ	Нет	Нет	0	100	100	100	100	100	100	100
486178	Нет	Нет	35	26	26	35	47	20	57	13
1590463	BCY17873	Нет	3,5	44	48	63	77	29	72	32
1590463	BCY19405	PEG10	3,5	44	49	49	75	32	75	32
1590463	BCY19406	PEG24	3,5	49	48	61	67	32	72	37
1590463	BCY19407	Удлинение GGSGGS	3,5	37	41	50	78	26	69	35
1590463	BCY19409	Бивалентный линкер	3,5	44	46	52	77	30	63	38

### Масса тела

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже.

**Таблица 42**

Масса тела ( в граммах)

№ соединения	Бициклический лиганд	Пептидный линкер	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)	
				День 1	День 22
ФСБ	Нет	Нет	0	30	30
486178	Нет	Нет	35	33	35
1590463	BCY17873	Нет	3,5	29	30
1590463	BCY19405	PEG10	3,5	33	34
1590463	BCY19406	PEG24	3,5	34	35
1590463	BCY19407	Удлинение GGSGGS	3,5	31	32
1590463	BCY19409	Бивалентный	3,5	28	29

**Пример 11: Активность модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>, единственная доза**

Активность модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на гетерозиготных нокаутных мышах hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе).

*Лечение*

Мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 4 мыши в каждой. Каждой мышке внутривенно (в/в) вводили 3,5 мг/кг конъюгированного модифицированного олигонуклеотида в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15). Группе из 4 мышей внутривенно вводили 35 мг/кг неконъюгированного модифицированного олигонуклеотида, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15). Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

*Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через одну неделю после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей, включая четырехглавую мышцу (квад.), переднюю большеберцовую мышцу (ТА), икроножную мышцу (икру), сердце и диафрагму, ткань печени и седалищный нерв для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мыши с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Уровни РНК DMPK мыши были нормализованы по отношению к GAPDH мыши. GAPDH мыши амплифицировали с использованием набора мышечных праймеров-зондов mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мыши относительно количества РНК DMPK мыши у контрольных животных, обработанных ФСБ, нормализованных по РНК GAPDH мыши (% от контроля).

**Таблица 43**

Снижение уровня РНК DMPK мыши у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

Номер соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	РНК DMPK мыши (% от контроля)						
			Четырехглавая мышца	Большеберцовая мышца	Икроножная мышца	Сердце	Диафрагма	Печень	Седалищный нерв
486178	Нет	35	26	35	26	57	20	13	47
1590463	BCY17873	3,5	44	63	48	72	29	32	77
	BCY19405	3,5	44	49	49	75	32	32	75
	BCY19406	3,5	49	61	48	72	32	37	67
	BCY19407	3,5	37	50	41	69	26	35	78

	BCY19 409	3,5	44	52	46	63	30	38	77
--	--------------	-----	----	----	----	----	----	----	----

*Масса тела*

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже.

**Таблица 44**

Масса тела ( в граммах)

Номер соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)	
			День 1	День 22
ФСБ	Нет	0	30	30
486178	Нет	35	33	35
1590463	BCY17873	3,5	29	30
	BCY19405	3,5	33	34
	BCY19406	3,5	34	35
	BCY19407	3,5	31	32
	BCY19409	3,5	28	29

**Пример 12: Активность модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>, несколько доз**

Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на гетерозиготных нокаутных мышах hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе).

*Лечение*

Нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3 мыши в каждой. Каждой мышке внутривенно вводили Соединение № 1590463-BCY17901 в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблицах ниже. Группе из 3 мышей внутривенно вводили неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15). Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

*Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через одну неделю после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей, включая четырехглавую мышцу (квад.), икроножную мышцу (икру) и сердце для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мышца с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Уровни РНК DMPK мышца были нормализованы по отношению к GAPDH мышца. GAPDH мышца амплифицировали с использованием набора мышечных праймеров-зондов mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мышца относительно количества РНК DMPK

мышь у контрольных животных, обработанных ФСБ, нормализованных по РНК GAPDH мышь (% от контроля). Значения ED<sub>50</sub> были рассчитаны в GraphPad Prism с использованием нелинейной аппроксимации с переменным наклоном Хилла (четыре параметра),  $Y = \text{низ} + (\text{верх-низ}) / (1 + (10^{\log EC50/X})^{\text{наклон Хилла}})$ , со следующими ограничениями: Верх=100, Низ=0, Наклон Хилла < -1.

**Таблица 45**

Снижение уровня РНК DMPK мышь у нокаутных мышь hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Четырехглавая мышца		Икроножная мышца		Сердце	
			DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
ФСБ	нет	0	100	н/д	100	н/д	100	н/д
486178	Нет	1	96	13,7	100	14,1	109‡	>30
		3,5	88		89		102	
		10	58		60		90	
		30	28		27		73	
1590463	BCY17901	0,3	83	1,6	83	1,5	102	6,3
		1	68		66		83	
		3,5	26		24		57	
		10	13		13		46	

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

*Масса тела*

Массу тела мышь hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже.

**Таблица 46**

Масса тела ( в граммах)

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)	
			День 1	День 22
ФСБ	Нет	0	20	22
486178	Нет	1	18	20
		3,5	20	21
		10	19	21
		30	19	21
1590463	BCY17901	0,3	20	22
		1	20	22
		3,5	19	21

		10	19	21
--	--	----	----	----

**Пример 13: Активность модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у гомозиготных нокаутных мышей hTFR<sup>KI/KI</sup>, несколько доз**

Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на гомозиготных нокаутных мышах hTFR<sup>KI/+</sup>.

У мышей с нокаутом человеческого рецептора трансферрина (hTFR)/CD71, использованных в этих исследованиях, кодирующая область экзона 2 мыши, а также донорный сайт сплайсинга интрона 2 мыши заменены открытой рамкой считывания TFR человека в соответствии с транскриптом NCBI NM\_001128148.2. Гуманизацию гена рецептора трансферрина осуществляли посредством редактирования гена, опосредованного CRISPR/Cas-9, что позволило создать модель с конститутивной экспрессией гена гуманизированного рецептора трансферрина. Стратегия нацеливания была основана на транскриптах NCBI NM\_011638.4 (мышь) и NM\_001128148.2 (человек). Плазмиду, обеспечивающую экспрессию мРНК Cas9, специфической гРНК и кассеты устойчивости к пурамицину; и плазмиду, содержащую гомологичные области гена рецептора трансферрина мыши, сайт FRT и замененную человеческую область, котрансфицировали в клеточную линию Taconic Biosciences C57BL/6N Tac ES. Гомозиготных гуманизированных мышей в данном документе называют мышами с нокаутом hTFR<sup>KI/KI</sup>. Они экспрессируют две копии гуманизированного гена TFR под контролем эндогенного мышинового промотора.

*Лечение*

Нокаутных мышей hTFR<sup>KI/KI</sup> разделили на группы по 3 мыши в каждой. Каждой мышке внутривенно вводили Соединение № 1590463-BCY17901 в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблицах ниже. Группе из 3 мышей внутривенно вводили неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15). Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

*Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через одну неделю после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей, включая четырехглавую мышцу (квад.), икроножную мышцу (икру) и сердце для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мыши с использованием набора мышинных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Уровни РНК DMPK мыши были нормализованы по отношению к GAPDH мыши. GAPDH мыши амплифицировали с использованием набора мышинных праймеров-зондов mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мыши относительно количества РНК DMPK мыши у контрольных животных, обработанных ФСБ (как указано в таблицах ниже),

нормализованных по РНК GAPDH мыши (% от контроля). Значения ED<sub>50</sub> были рассчитаны в GraphPad Prism с использованием нелинейной аппроксимации с переменным наклоном Хилла (четыре параметра),  $Y = \text{низ} + (\text{верх-низ}) / (1 + (10^{\log EC50/X})^{\text{наклон Хилла}})$ , со следующими ограничениями: Вех=100, Низ=0, Наклон Хилла < -1.

**Таблица 47**

Снижение уровня РНК DMPK мыши у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/KI</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71, данные относительно группы ФСБ

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Четырехглавая мышца		Икроножная мышца		Сердце	
			DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
ФСБ	нет	0	100	н/д	100	н/д	100	н/д
486178	Нет	5	86	17,6	87	22,0	90	43,0
		20	46		56		66	
		50	18		21		48	
1590463	BCY17901	1	57	1,2	66	1,5	80	3,1
		3,5	16		20		40	
		10	8		9		28	

*Химические маркеры плазмы*

Оценить влияние модифицированных олигонуклеотидов на функцию печени и почек, уровни альбумина (АЛБ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), общего билирубина (ТВІL), общего белка (PROT), креатина (CREAT) и креатинкиназы (СК) в плазме измеряли в день умерщвления мышей (день 22) с использованием автоматического клинического химического анализатора (Hitachi Olympus AU400с, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты были усреднены для каждой группы мышей и представлены в таблице ниже.

**Таблица 48**

Химические маркеры плазмы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/KI</sup>

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Клинический анализ плазмы						
			АЛБ (г/дл)	АЛТ (Ед./л)	АСТ (Ед./л)	ТВІL (мг/дл)	PROT (г/дл)	CREA Т (мг/дл)	СК (Ед./л)
ФСБ	Нет	0	3,2	31	70	0,14	5,2	0,13	180
486178	Нет	5	3,2	41	80	0,19	5,2	0,14	197
		20	2,9	30	57	0,12	4,8	0,11	93
		50	3,3	30	111	0,12	5,0	0,13	380
1590463	BCY1790	1	3,2	47	84	0,11	5,1	0,13	165



	1	3,5	3,3	58	91	0,12	5,2	0,13	176
		10	3,2	27	48	0,13	5,3	0,12	86

*Гематологические анализы*

Кровь, полученную от мышей в день умерщвления мышей (22-й день), отправляли в IDEXX BioResearch для измерения количества клеток крови. Проведенные подсчеты включают количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний эритроцитарный объем (MCV), средний гемоглобин в эритроците (MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC). Оценивали количество отдельных лейкоцитов, таких как моноциты (MON), нейтрофилы (NEU), лимфоциты (LYM), эозинофилы (EOS), базофилы (BAS) и тромбоцитов (PLT). Результаты представлены в таблицах ниже. «н/о» указывает на величины, которые не определяли.

**Таблица 49**

Гематологические параметры у нокаутных мышей hTFR<sup>K1/K1</sup>

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	WBC (10 <sup>3</sup> /мкл)	RBC (10 <sup>12</sup> /л)	HGB (г/дл)	HCT (%)	MCV (фл)	MCH (пг)	MCHC (г/дл)
ФСБ	Нет	0	9	5	10	42	83	21	25
486178	Нет	5	9‡	5‡	11‡	45‡	85‡	21‡	25‡
		20	8	5	10	42	79	19	25
		50	7	5	10	40	78	20	26
1590463	BCY17901	1	6	5	11	41	85	22	26
		3,5	5	5	11	40	82	21	26
		10	6	5	11	42	84	22	26

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

**Таблица 50**

Количества клеток крови у нокаутных мышей hTFR<sup>K1/K1</sup>

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	NEU (%)	LYM (%)	MON (%)	EOS (%)	BAS (%)	PLT (10 <sup>9</sup> /л)
ФСБ	Нет	0	10	83	6	1,63	0,13	1851
486178	Нет	5	8‡	85‡	5‡	1,65‡	0,10‡	1654‡
		20	9	84	6	1,43	0,03	1662‡
		50	8	82	7	1,6	0,03	1601‡
1590463	BCY17901	1	7	88	4	1,83	0,17	Н. Д.
		3,5	9	84	4	2,4	0,13	Н. Д.
		10	12	83	4	1,87	0,10	Н. Д.

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

### Масса тела и органов

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/KI</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже. Массу печени, почек и селезенки измеряли в день умерщвления мышей (день 22), а средние массы органов для каждой группы представлены в таблицах ниже.

**Таблица 51**

Массы тела и органов (в граммах)

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)	
			День 1	День 22
ФСБ	Нет	0	32	32
486178	Нет	5	30	30
		20	30	30
		50	33	32
1590463	BCY17901	1	31	31
		3,5	33	32
		10	32	31

### Пример 14: Дизайн соединений РНКи, нацеленных на DMPK

Были разработаны и синтезированы антисмысловые олигонуклеотиды с модифицированной цепью, комплементарные DMPK мыши, как указано в таблице ниже.

**Таблица 52**

Разработка антисмысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, нацеленных на DMPK мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	Мишень	SEQ ID №:
1653456	vP- T <sub>es</sub> A <sub>fs</sub> G <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> A <sub>fo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>fo</sub> A <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> C <sub>fo</sub> C <sub>yo</sub> G <sub>fo</sub> A <sub>y</sub> oG <sub>yo</sub> G <sub>ys</sub> A <sub>ys</sub> A <sub>y</sub>	DMPK мыши	173

В приведенной выше таблице «vP» представляет 5'-винилфосфонатный фрагмент, нижний индекс «f» представляет 2'-F-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «y» представляет 2'-ОМе-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «e» представляет 2'-МОЕ-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «s» представляет фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, и нижний индекс «o» представляет фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

Смысловый олигонуклеотид комплементарен первому из 21 нуклеотида антисмыслового олигонуклеотида (от 5' до 3'), причем последние два 3'-нуклеотида антисмысловых олигонуклеотидов не спарены со смысловым олигонуклеотидом (являются выступающими нуклеотидами). Модифицированный олигонуклеотид Соединение № 1652967 был конъюгирован с BCY17901, как описано в данном документе выше.

**Таблица 53**

Разработка смысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, нацеленных на DMPK мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1547300	C <sub>ys</sub> C <sub>ys</sub> U <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> G <sub>fo</sub> G <sub>yo</sub> U <sub>fo</sub> A <sub>fo</sub> U <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> [3nC7][[малеимидC3оил]	180
1652967	C <sub>ys</sub> C <sub>ys</sub> U <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> G <sub>fo</sub> G <sub>yo</sub> U <sub>fo</sub> A <sub>fo</sub> U <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> [3nC7][[BCN]	174

В приведенной выше таблице нижний индекс «f» представляет 2'-F-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «y» представляет 2'-ОМе-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «s» представляет фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «o» представляет фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, а “[3nC7]” представляет 3'-C7 аминомодификатор, «[BCN]» указывает на (бицикло[6.1.0]нонин)формильный линкер, и «[малеимидC3оил]» указывает на малеимидпропионильный линкер.

**Таблица 54**

Разработка смысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, конъюгированных с бициклическим лигандом

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд
1678385	1652967	BCY17901

**Таблица 55**

Дизайн соединений РНКи, нацеленных на DMPK человека/мыши

№ дуплексного соединения	№ соединения с антисмысловой цепью	№ соединения со смысловой цепью
1653456:1547300	1653456	1547300
1653456:1678385	1653456	1678385

**Пример 15: Активность модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>, несколько доз**

Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на гетерозиготных нокаутных мышях hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе).

#### *Лечение*

Нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3 мыши в каждой. Каждой мышши внутривенно вводили Соединение 1590463-BCY17901 в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблицах ниже. Группе из 3 мышшей внутривенно вводили неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15). Группа из 4 мышшей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

### Анализ РНК

Мышей умерщвляли через одну неделю после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей, включая четырехглавую мышцу (квад.), икроножную мышцу (икру), сердце, и диафрагму, и ткань печени для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мышцы с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Уровни РНК DMPK мышцы были нормализованы по отношению к GAPDH мышцы. GAPDH мышцы амплифицировали с использованием набора мышечных праймеров-зондов mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мышцы относительно количества РНК DMPK мышцы у контрольных животных, обработанных ФСБ, нормализованных по РНК GAPDH мышцы (% от контроля). Значения ED<sub>50</sub> были рассчитаны в GraphPad Prism с использованием нелинейной аппроксимации с переменным наклоном Хилла (четыре параметра),  $Y = \text{низ} + (\text{верх-низ}) / (1 + (10^{\log EC50/X})^{\text{наклон Хилла}})$ , со следующими ограничениями: Верх=100, Низ=0, Наклон Хилла < -1.

**Таблица 56**

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Четырехглавая мышца		Икроножная мышца		Диафрагма	
			РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
486178	Нет	3,5	78	10,5	82	11,22	70	8,30
		20	32		31		29	
		50	15		16		15	
1590463	BCY17901	1	57	1,28	56	1,24	57	1,34
		3,5	25		25		27	
		10	12		12		14	

**Таблица 57**

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Сердце		Печень	
			РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
486178	Нет	3,5	90	47,75	39	<3,5
		20	67		18	
		50	53		10	
1590463	BCY17901	1	89	5,45	42	<3,5
		3,5	56		26	

		10	38		14	
--	--	----	----	--	----	--

### Химические маркеры плазмы

Оценить влияние модифицированных олигонуклеотидов на функцию печени и почек, уровни альбумина (АЛБ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), общего билирубина (ТВЛ), азот мочевины в крови (BUN), общего белка (PROT), креатина (CREAT) и креатинкиназы (СК) в плазме измеряли в день умерщвления мышей (день 22) с использованием автоматического клинического химического анализатора (Hitachi Olympus AU400с, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты были усреднены для каждой группы мышей и представлены в таблице ниже.

**Таблица 58**

Химические маркеры плазмы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Клинический анализ плазмы							
			АЛБ (г/дл)	АЛТ (Ед./л)	АСТ (Ед./л)	ТВЛ (мг/дл)	BUN (мг/дл)	PROT (г/дл)	CREA Т (мг/дл)	СК (Ед./л)
ФСБ	Нет	0	3,2	34	70	0,14	23	5,2	0,16	99
486178	Нет	3,5	3,1	26	75	0,12	22	5,0	0,12	116
		20	3,0	30	85	0,16	22	5,0	0,16	128
		50	3,1	26	65	0,12	21	5,1	0,14	96
1590463	BCY1790 1	1	3,1	55	123	0,12	24	5,1	0,13	193
		3,5	2,9	38	93	0,11	20	4,8	0,14	167
		10	3,0	42	80	0,16	23	4,9	0,13	88

### Гематологические анализы

Кровь, полученную от мышей в день умерщвления мышей (22-й день), отправляли в IDEXX BioResearch для измерения количества клеток крови. Проведенные подсчеты включают количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний эритроцитарный объем (MCV), средний гемоглобин в эритроците (MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC). Оценивали количество отдельных лейкоцитов, таких как моноциты (MON), нейтрофилы (NEU), лимфоциты (LYM), эозинофилы (EOS), базофилы (BAS) и тромбоцитов (PLT). Результаты представлены в таблицах ниже.

**Таблица 59**

Гематологические параметры у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	WBC (10 <sup>3</sup> /мкл)	RBC (10 <sup>12</sup> /л)	HGB (г/дл)	HCT (%)	MCV (фл)	MCH (пг)	MCHC (г/дл)
ФСБ	Нет	0	4,5	10	13	40	39	13	33

486178	Нет	3,5	3,4	10	13	40	39	13	33
		20	5,1	10	13	40	39	13	34
		50	7,0	11	14	41	38	13	34
1590463	BCY17901	1	5,9	10	13	41	39	13	33
		3,5	6,0	11	14	40	37	13	34
		10	5,3	11	14	41	38	13	33

Таблица 60

Количества клеток крови у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	NEU (%)	LYM (%)	MON (%)	EOS (%)	BAS (%)	PLT (10 <sup>9</sup> /л)	RETI (10 <sup>3</sup> /мкл)
ФСБ	Нет	0	12	82	5	1,33	0,13	1242	361
486178	Нет	3,5	10	80	7	1,73	0,10	1057	368
		20	9	86	5	0,83	0,10	1151	411
		50	10	81	8	1,40	0,10	929	413
1590463	BCY17901	1	7	88	4	0,43	0,07	1495	464
		3,5	7	87	4	1,37	0,30	1233	361
		10	8	85	6	0,27	0,13	1183	421

*Масса тела*

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже.

Таблица 61

Масса тела ( в граммах)

№ соединения	Лиганд	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)	
			День 1	День 22
ФСБ	Нет	0	30	29
486178	Нет	3,5	29	29
		20	28	29
		50	31	34
1590463	BCY17901	1	31	32
		3,5	27	26
		10	25	26

**Пример 16:** Активность соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>, несколько доз

Активность Соединения РНКи № 1653456:1547300, конъюгированного с бициклическим лигандом CD71, тестировали на гетерозиготных нокаутных мышях

hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе). Кроме того, была протестирована активность Соединения № 1653456:1547300 (описанного выше в данном документе), конъюгированного с Fab'-фрагментами антитела ОКТ9 (BioXCell, каталожный номер: BE0023), который нацелен на человеческий CD71.

#### *Лечение*

Нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3-4 мыши в каждой. Группе из 3 мышей внутривенно вводили конъюгированное РНКи Соединение 1653456:1547300-ОКТ9 Fab, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15). Группе из 3 мышей внутривенно вводили конъюгированное РНКи Соединение 1653456:1678385, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблице ниже. Группе из 4 мышей подкожно вводили конъюгированное РНКи Соединение 1653456:1678385, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозе 10 мг/кг. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

#### *Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через одну неделю после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей, включая четырехглавую мышцу (квад.), икроножную мышцу (икру), сердце, и диафрагму, и ткань печени для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мышцы с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Уровни РНК DMPK мышцы были нормализованы по отношению к GAPDH мышцы. GAPDH мышцы амплифицировали с использованием набора мышечных праймеров-зондов mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мышцы относительно количества РНК DMPK мышцы у контрольных животных, обработанных ФСБ, нормализованных по РНК GAPDH мышцы (% от контроля). Значения ED<sub>50</sub> были рассчитаны в GraphPad Prism с использованием нелинейной аппроксимации с переменным наклоном Хилла (четыре параметра),  $Y = \text{низ} + (\text{верх-низ}) / (1 + (10^{\log EC50/X})^{\text{наклон Хилла}})$ , со следующими ограничениями: Верх=100, Низ=0, Наклон Хилла < -1. «н/р» указывает, что величину не рассчитывали.

**Таблица 62**

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Лиганд	Режим введения	Доза (мг/кг)	Четырехглавая мышца		Икроножная мышца		Диафрагма	
				РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
1653456:1547300	ОКТ9	в/в	1	30	<1	29	<1	31	<1
			3,5	22		21		25	

			10	20		19		22	
1653456: 1678385	BCY179 01	в/в	1	36	<1	35	<1	37	<1
			3,5	23		22		28	
			10	25		26		27	
1653456: 1678385	BCY179 01	п/к	10	22	н/р	21	н/р	29	н/р

Таблица 63

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ соединения	Лиганд	Режим введения	Доза (мг/кг)	Сердце		Печень	
				РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	РНК DMPK (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
1653456:1547300	ОКТ9	в/в	1	47	1,56	64	3,80
			3,5	35		55	
			10	34		37	
1653456:1678385	BCY17901	в/в	1	69	3,16	98	>10
			3,5	41		69	
			10	40		76	
1653456:1678385	BCY17901	п/к	10	44	н/р	78	н/р

#### Химические маркеры плазмы

Оценить влияние модифицированных олигонуклеотидов на функцию печени и почек, уровни альбумина (АЛБ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), общего билирубина (ТВІL), азот мочевины в крови (BUN), общего белка (PROT), креатина (CREAT) и креатинкиназы (СК) в плазме измеряли в день умерщвления мышей (день 22) с использованием автоматического клинического химического анализатора (Hitachi Olympus AU400с, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты были усреднены для каждой группы мышей и представлены в таблице ниже.

Таблица 64

Химические маркеры плазмы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Лиганд	Режим введения	Доза (мг/кг)	Клинический анализ плазмы							
				АЛ	АЛТ	АСТ	ТВІL	BUN	PRO	CREA	СК
				Б (г/дл)	(Ед./л)	(Ед./л)	(мг/дл)	(мг/дл)	Т (г/дл)	Т (мг/дл)	(Ед./л)
ФСБ	Нет	в/в	0	3,2	34	70	0,14	23	5,2	0,16	99
1653456: 1547300	ОКТ9	в/в	1	3,0	25	79	0,14	20	5,0	0,11	124
			3,5	3,1	46	88	0,11	26	5,1	0,14	99
			10	3,1	34	97	0,13	18	5,1	0,15	192
1653456: 1678385	BCY17901	в/в	1	3,3	25	115	0,12	22	5,3	0,12	247
			3,5	3,0	38	116	0,13	26	5,0	0,11	251



			10	3,2	27	76	0,14	21	5,2	0,13	119
1653456: 1678385	BCY17901	п/к	10	3,1	24	78	0,14	19	4,9	0,13	117

*Гематологические анализы*

Кровь, полученную от мышей в день умерщвления мышей (22-й день), отправляли в IDEXX BioResearch для измерения количества клеток крови. Проведенные подсчеты включают количество эритроцитов (RBC), количество лейкоцитов (WBC), гемоглобин (HGB), гематокрит (HCT), средний эритроцитарный объем (MCV), средний гемоглобин в эритроците (MCH) и среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (MCHC). Оценивали количество отдельных лейкоцитов, таких как моноциты (MON), нейтрофилы (NEU), лимфоциты (LYM), эозинофилы (EOS), базофилы (BAS) и тромбоцитов (PLT). Результаты представлены в таблицах ниже.

**Таблица 65**

Гематологические параметры у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Лиганд	Режим введения	Доза (мг/кг)	WBC (10 <sup>3</sup> /мкл)	RBC (10 <sup>12</sup> /л)	HGB (г/дл)	HC T (%)	MC V (фл)	MC H (пг)	MCH C (г/дл)
ФСБ	Нет	в/в	0	4,5	10	13	40	39	13	33
1653456: 1547300	ОКТ9	в/в	1	4,4	11	14	40	38	13	34
			3,5	6,9	11	14	40	37	13	34
			10	4,1	11	13	40	37	13	34
1653456: 1678385	BCY17901	в/в	1	5,3	11	13	41	38	13	33
			3,5	5,4	10	13	40	38	13	33
			10	4,5	11	14	41	37	13	34
1653456: 1678385	BCY17901	п/к	10	4,8	10	13	40	39	12	33

**Таблица 66**

Количества клеток крови у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ соединения	Лиганд	Режим введ.	Доза (мг/кг)	NEU (%)	LY M (%)	MON (%)	EOS (%)	BAS (%)	PLT (10 <sup>9</sup> /л)	RETI (10 <sup>3</sup> /мкл)
ФСБ	Нет	в/в	0	12,0	82	5	1,33	0,13	1242	361
1653456: 1547300	ОКТ9	в/в	1	10,8	82	6	0,33	0,07	1065	430
			3,5	9,4	83	6	1,27	0,13	1117	412
			10	10,0	82	7	1,20	0,23	1268	430

1653456: 1678385	BCY17901	в/в	1	6,8	87	5	1,13	0,10	1043	393
			3,5	9,9	86	4	0,43	0,00	887	367
			10	9,1	85	5	1,03	0,17	1090	396
1653456: 1678385	BCY17901	п/к	10	5,8	88	5	0,63	0,15	1368	389

*Масса тела*

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже.

**Таблица 67**

Масса тела ( в граммах)

№ соединения	Лиганд	Режим введения	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)	
				День 1	День 22
ФСБ	Нет	в/в	0	30	29
1653456:1547300	Fab' ОКТ9	в/в	1	30	29
			3,5	34	33
			10	29	29
1653456:1678385	BCY17901	в/в	1	28	28
			3,5	32	31
			10	26	26
1653456:1678385	BCY17901	п/к	10	28	28

**Пример 17: Разработка соединений РНКи, нацеленных на DMPK, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71**

Смысловой модифицированный олигонуклеотид был сконструирован и синтезирован, как указано в таблице ниже. Смысловой олигонуклеотид комплементарен первому из 21 нуклеозида (от 5' до 3') антисмыслового олигонуклеотида Соединения № 1653456 (описанного выше в данном документе), причем последние два 3'-нуклеозида антисмысловых олигонуклеотидов не спарены со смысловым олигонуклеотидом (являются выступающими нуклеозидами).

**Таблица 68**

Разработка смысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, нацеленных на DMPK мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1709195	$[BCN][nC6o]_o C_{ys} C_{ys} U_{yo} C_{yo} G_{fo} G_{yo} U_{fo} A_{fo} U_{fo} U_{yo} U_{yo} A_{yo} U_{yo} U_{yo} G_{yo} U_{yo} C_{ys} U_{ys} A_{ys}$	189

В приведенной выше таблице нижний индекс «f» представляет 2'-F-

модифицированный нуклеозид, нижний индекс «у» представляет 2'-ОМе-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «s» представляет фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «о» представляет фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, «[nСбо]» указывает на б-аминогексанольный линкер, и «[BCN]» указывает на (бицикло[6.1.0]нонин)формильный линкер.

Модифицированные олигонуклеотидные Соединения № 1709195 и 1590463 были дополнительно конъюгированы с ВСУ17901, как описано в таблице ниже.

**Таблица 69**

Разработка смысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, конъюгированных с бициклическим лигандом

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд
1709196	1709195	ВСУ17901

**Таблица 70**

Дизайн соединений РНКи, нацеленных на DMPK человека/мышь

№ дуплексного соединения	№ соединения с антисмысловой цепью	№ соединения со смысловой цепью
1710872	1653456	1709196
1678710	1653456	1678385

**Пример 18: Активность модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у гетерозиготных нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>, несколько доз**

Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на гетерозиготных нокаутных мышах hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе).

#### *Лечение*

Нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3 мыши в каждой. Каждой мышью внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) вводили конъюгированный модифицированный олигонуклеотид в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблицах ниже. Группе из 3 мышей подкожно вводили неконъюгированный модифицированный олигонуклеотид, Соединение № 486178, в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15). Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

#### *Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через одну неделю после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу (квад.), икроножную мышцу (икру), сердце, печень) для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мыши с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Уровни РНК DMPK мыши были нормализованы по отношению к GAPDH мыши. GAPDH мыши амплифицировали с использованием набора мышечных праймеров-зондов

mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мышцы относительно количества DMPK мышцы у контрольных животных, обработанных ФСБ, нормализованных по РНК GAPDH мышцы (% от контроля). Значения ED<sub>50</sub> были рассчитаны в GraphPad Prism с использованием нелинейной аппроксимации с переменным наклоном Хилла (четыре параметра),  $Y = \text{низ} + (\text{верх} - \text{низ}) / (1 + (10^{\log EC50 / X})^{\text{наклон Хилла}})$ , со следующими ограничениями: Верх=100, низ=0, наклон Хилла < -1.

Таблица 71

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд	Путь введения	Доза (мг/кг)	Четырехглавая мышца		Печень	
					DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
н/д	486178	Нет	п/к	3,5	92	16,2	34	2,0
				20	40		14	
				50	19		9	
1666846	1590463	BCY17901	п/к	1	76	3,3	48	1,3
				3,5	53		34	
				10	18		20	
			в/в	1	62	1,4	50	1,1
				3,5	22		25	
				10	13		20	

Таблица 72

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд	Путь введения	Доза (мг/кг)	Икроножная мышца		Сердце	
					DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	DMPK РНК (% от контроля)	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
н/д	486178	Нет	п/к	3,5	92	15,7	101	>50
				20	39		75	
				50	19		55	
1666846	1590463	BCY17901	п/к	1	73	2,7	98	9,9
				3,5	47		84	
				10	16		50	
			в/в	1	54	1,1	85	6,6

				3,5	22		53	
				10	13		52	

### Масса тела

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже.

**Таблица 73** Масса тела (в граммах)

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд	Путь введения	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)	
					День 1	День 22
н/д	ФСБ	Нет	п/к	0	24	24
н/д	486178	Нет	п/к	3,5	28	28
				20	26	26
				50	26	27
1666846	1590463	BCY179 01	п/к	1	23	23
				3,5	24	24
				10	26	26
			в/в	1	30	30
				3,5	30	28
				10	27	27

**Пример 19: Активность и переносимость соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у гетерозиготных нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>, несколько доз**

Активность и переносимость соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на гетерозиготных нокаутных мышцах hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе).

### Лечение

Нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 3 мыши в каждой. Каждой мышце внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) вводили конъюгированное соединение РНКи в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15) в дозах, указанных в таблицах ниже. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

### Анализ РНК

Мышей умерщвляли через одну неделю после последнего введения (на 22-й день) и РНК экстрагировали из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу (квад.), икроножную мышцу (икру), сердце, печень) для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мыши с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Уровни РНК DMPK мыши были нормализованы по отношению к GAPDH мыши. GAPDH мыши амплифицировали с использованием набора мышечных праймеров-зондов mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мыши относительно количества DMPK мыши у контрольных животных, обработанных ФСБ, нормализованных по РНК GAPDH мыши (%)

от контроля). Значения ED<sub>50</sub> были рассчитаны в GraphPad Prism с использованием нелинейной аппроксимации с переменным наклоном Хилла (четыре параметра),  $Y = \text{низ} + (\text{верх} - \text{низ}) / (1 + (10^{\log EC50 / X})^{\text{наклон Хилла}})$ , со следующими ограничениями: Верх=100, низ=0, наклон Хилла < -1.

**Таблица 74**

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> соединениями РНКи, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд	Путь введения	Доза (мг/кг)	Четырехглавая мышца		Печень	
					DMPK РНК (%) от контроля	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	DMPK РНК (%) от контроля	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
1678710	1653456: 1652967	BCY17901	п/к	0,1	85	0,7	107	>10
				0,3	65		106	
				1	41		87	
				3,5	24‡		106	
				10	22		94	
			в/в	0,1	70	0,5	96	>10
				0,3	55		125	
				1	36		88	
				3,5	28		93	
				10	25		88	
1710872	1653456: 1709195	BCY17901	в/в	0,1	81	0,5	106	>10
				0,3	57		118	
				1	31		112	
				3,5	27		77	
				10	21		92	

‡ указывает, что доступно менее 3 образцов

**Таблица 75**

Снижение уровня РНК DMPK мышцы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд	Путь введения	Доза (мг/кг)	Икроножная мышца		Сердце	
					DMPK РНК (%) от контроля	ED <sub>50</sub> (мг/кг)	DMPK РНК (%) от контроля	ED <sub>50</sub> (мг/кг)
1678710	1653456: 1652967	BCY17901	п/к	0,1	77	0,6	98	5,5
				0,3	63		85	
				1	37		76	
				3,5	22		55	

				10	21		49	
			в/в	0,1	66	0,4	90	3,9
				0,3	53		91	
				1	34		66	
				3,5	27		50	
				10	23		43	
1710872	1653456: 1709195	BCY17901	в/в	0,1	68	0,4	98	4,9
				0,3	52		89	
				1	29		78	
				3,5	25		49	
				10	20		48	

#### *Химические маркеры плазмы*

Оценить влияние модифицированных олигонуклеотидов на функцию печени и почек, уровни альбумина (АЛБ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), общего билирубина (ТБИЛ), общего белка (PROT), креатина (CREAT), железа и креатинкиназы (СК) в плазме измеряли в день умерщвления мышей (день 18) с использованием автоматического клинического химического анализатора (Hitachi Olympus AU400с, Мелвилл, Нью-Йорк). Результаты были усреднены для каждой группы мышей и представлены в таблице ниже.

**Таблица 76**

Химические маркеры плазмы у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд	Путь введения	Доза (мг/кг)	АЛБ (г/дл)	АЛТ (Ед./л)	АСТ (Ед./л)	ТБИЛ (мг/дл)	BU N (мг/дл)	CREAT (мг/дл)	ЖЕЛЕЗО (мкг/дл)	СК (Ед./л)
н/д	ФСБ	Нет	п/к	0	3,35	40	95	0,13	24	0,17	274	206
1678710	1653456: 1652967	BCY1790 1	п/к	10	3,11	20	66	0,10	20	0,16	244	175
			в/в	10	3,09	47	119	0,12	25	0,17	253	332
1710872	1653456: 1709195	BCY1790 1	в/в	10	3,13	91	115	0,11	18	0,18	259	125

#### *Масса тела и органов*

Массу тела мышей hTFR<sup>KI/+</sup> измеряли в дни 1 и 22, а средняя масса тела для каждой группы представлена в таблице ниже. Массу печени, почек и селезенки измеряли в день умерщвления мышей (день 22), а средние массы органов для каждой группы представлены в таблицах ниже. «н/о» указывает на данные, которые не определяли.

**Таблица 77**

Массы тела и органов (в граммах)

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд	Путь введения	Доза (мг/кг)	Масса тела (г)		Масса органа (г)		
					День 1	День 22	Печень	Почка	Селезенка

н/д	ФСБ	Нет	п/к	0	24	24	1,21	0,31	0,10
1678710	1653456: 1652967	BCY179 01	п/к	0,1	23	24	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				0,3	28	27	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				1	24	24	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				3,5	24	25	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				10	23	22	0,92	0,27	0,08
			в/в	0,1	27	26	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				0,3	25	26	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				1	23	23	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				3,5	26	25	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				10	23	24	1,14	0,29	0,09
1710872	1653456: 1709195	BCY179 01	в/в	0,1	26	26	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				0,3	25	26	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				1	24	23	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				3,5	25	25	Н. Д.	Н. Д.	Н. Д.
				10	25	25	1,05	0,29	0,07

**Пример 20: Разработка модифицированных олигонуклеотидов, нацеленных на MALAT, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71**

Были разработаны и синтезированы модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные MALAT мыши (как указано в таблице ниже). Соединение в таблице ниже имеет модификацию на 5'-конце, которая дает возможность конъюгировать с бициклическим лигандом.

**Таблица 78**

Дизайн модифицированных олигонуклеотидов, комплементарных MALAT мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1694083	[BCN][nC6o] <sub>o</sub> A <sub>ks</sub> G <sub>ks</sub> T <sub>ks</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> T <sub>ks</sub> G <sub>k</sub>	184

В таблице выше, Нижний индекс «k» представляет нуклеозид cEt, нижний индекс «d» представляет стереостандартный нуклеозид ДНК, нижний индекс «s» указывает на фосфотиоатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «o» обозначает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, верхний индекс «m» перед буквой C представляет собой 5-метилцитозин, «[nC6o]» обозначает 6-аминогексаноновый линкер, и «[BCN]» обозначает (бицикло[6.1.0]нонин)формильный линкер.

Модифицированный олигонуклеотид был дополнительно конъюгирован с BCY17901, как описано в таблице ниже.

**Таблица 79**

Разработка модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическим лигандом

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд
1694082	1694083	BCY17901



**Пример 21: Разработка соединений РНКи, нацеленных на HPRT, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71**

Были разработаны и синтезированы антисмысловые олигонуклеотиды с модифицированной цепью, комплементарные HPRT мыши, как указано в таблице ниже.

**Таблица 80**

Разработка антисмысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, нацеленных на HPRT1 человека/мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1586322	vP- T <sub>es</sub> U <sub>fs</sub> A <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> A <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> C <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> U <sub>fo</sub> C <sub>yo</sub> A <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> A <sub>y</sub> sA <sub>ys</sub> U <sub>v</sub>	191

В приведенной выше таблице «vP» представляет 5'-винилфосфонатный фрагмент, нижний индекс «f» представляет 2'-F-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «y» представляет 2'-ОМе-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «e» представляет 2'-МОЕ-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «s» представляет фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, и нижний индекс «o» представляет фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

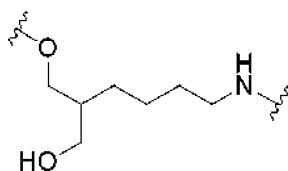
Смысловой модифицированный олигонуклеотид был сконструирован и синтезирован, как указано в таблице ниже. Смысловой олигонуклеотид комплементарен первому из 21 нуклеозида (от 5' до 3') антисмыслового олигонуклеотида, причем последние два 3'-нуклеозида антисмысловых олигонуклеотидов не спарены со смысловым олигонуклеотидом (являются выступающими нуклеозидами). Смысловой модифицированный олигонуклеотид имеет модификацию на 3'-конце, которая дает возможность конъюгировать с бициклическим лигандом.

**Таблица 81**

Разработка смысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, нацеленных на HPRT мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1653454	U <sub>ys</sub> C <sub>ys</sub> C <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> G <sub>fo</sub> A <sub>yo</sub> C <sub>fo</sub> U <sub>fo</sub> G <sub>fo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> G <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> U <sub>yo</sub> A <sub>yo</sub> A <sub>y</sub> o[3nC7][BCN]	190

В приведенной выше таблице нижний индекс «f» представляет 2'-F-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «y» представляет 2'-ОМе-модифицированный нуклеозид, нижний индекс «s» представляет фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «o» представляет фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, «[BCN]» обозначает (бицикло[6.1.0]нонин)-формильный линкер и «[3nC7]» представляет 3'-C7 аминомодификатор, имеющий следующую структуру:



### [3nC7]

Смысловый модифицированный олигонуклеотид Соединение 1653454 был дополнительно конъюгирован с BCY17901, как описано в таблице ниже.

**Таблица 82**

Разработка смысловых олигонуклеотидов с модифицированной цепью, конъюгированных с бициклическим лигандом

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд
1694090	1653454	BCY17901

**Таблица 83**

Дизайн соединений РНКи, нацеленных на HPRT мыши

№ дуплексного соединения	№ соединения с антисмысловой цепью	№ соединения со смысловой цепью
1694595	1586322	1694090

### Пример 22: Влияние олигомерных агентов, содержащих бициклические лиганды CD71, на яванских макак

Яванских макак лечили модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71, или соединениями РНКи, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71, выбранными из исследований, описанных в Примерах выше.

#### Лечение

До исследования обезьян содержали в карантине, в течение которого за животными ежедневно наблюдали на предмет общего состояния здоровья. Обезьянам было 2-4 года, они весили 2-4 кг. Самки яванских обезьян были разделены на 4 группы по 3 обезьяны в каждой. Каждой обезьяне вводили внутривенно (в/в) инфузию (1 ч) конъюгированного модифицированного олигонуклеотида или конъюгированного соединения РНКи через чрескожно установленный катетер. Перед каждой дозой устанавливали новый стерильный постоянный катетер. Обезьянам вводили дозу 10 мл/кг один раз в неделю, всего 3 дозы (в дни 1, 8, 15) по 25 мг/кг.

В течение периода исследования обезьян обследовали по меньшей мере один раз в день на наличие признаков болезни или дистресса. Любое животное, испытывающее более чем кратковременную или легкую боль или дистресс из-за лечения, травмы или заболевания, ветеринарный персонал лечил одобренными анальгетиками или агентами для облегчения боли после консультации с руководителем исследования. Любое животное с плохим состоянием здоровья или, возможно, находящееся в агонизирующем состоянии, идентифицировалось для дальнейшего наблюдения и возможной эвтаназии как можно

скорее с посещением ветеринарной консультации. Плановую эвтаназию животных проводили на 28-й день, примерно через 13 дней после введения последней дозы, путем обескровливания под глубоким наркозом. Протоколы, описанные в Примере, были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC).

#### *Анализ РНК*

Для того чтобы оценить влияние конъюгированных модифицированных олигонуклеотидов или конъюгированных соединений РНКи на уровни экспрессии РНК-мишени, поперечные срезы тканей скелетных мышц (четырёхглавая мышца (квадрицепс), икроножная мышца (икра), передняя большеберцовая мышца (ТА), диафрагма, камбаловидная мышца) и ткани сердца были собраны у всех животных. У всех исследуемых животных собирали примерно 8 мм<sup>2</sup> или 300 мг ткани печени и помещали в пробирки с завинчивающимися крышками вместимостью 2 мл (2 пробирки по 150 мг).

Обезьян умерщвляли через две недели после последнего введения (на 28-й день), и РНК экстрагировали из мышечных тканей (включая четырёхглавую мышцу (квадрицепс), диафрагму, камбаловидную мышцу, переднюю большеберцовую мышцу (ТА), икроножную мышцу (икру), сердце) и печени для количественного анализа в реальном времени RTPCR для измерения количества целевой РНК.

Уровни РНК MALAT измеряли с использованием набора праймеров NHP-зондов MALAT1\_LTS01104 (прямая последовательность AAGGAGTGTACCGCTGCTACTGTTG, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 247; обратная последовательность CCAAAGCTGCACTGTGCTGTA, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 248; последовательность зонда ACACCTTCAGGGACTGGAGCTGCTTTTATC, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 249). Уровни РНК MALAT обезьяны нормализовали по общему содержанию РНК, измеренному с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процент РНК MALAT обезьяны по отношению к количеству РНК MALAT обезьяны во всех группах, не обработанных конъюгированным модифицированным олигонуклеотидом, нацеленным на MALAT. Уровни РНК DMPK измеряли с использованием набора праймеров NHP-зондов DMPK\_RTS4447 (прямая последовательность AGCCTGAGCCGGGAGATG, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 250; обратная последовательность GCGTAGTTGACTGGCAAAGTT, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 251; последовательность зонда AGGCCATCCGCATGGCCAACC, обозначенная в данном документе как SEQ ID №: 252). Уровни РНК DMPK обезьяны нормализовали по общему содержанию РНК, измеренному с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процент РНК DMPK обезьяны по отношению к количеству РНК DMPK обезьяны во всех группах, не обработанных конъюгированным модифицированным олигонуклеотидом, нацеленным на DMPK, или конъюгированным соединением РНКи. Уровни РНК HPRT измеряли с использованием набора праймеров NHP Rh02800695\_m1 (Thermofisher). Уровни РНК HPRT обезьяны нормализовали по общему содержанию РНК, измеренному с помощью RIBOGREEN®. Результаты представлены как процент РНК HPRT обезьяны по отношению к количеству

РНК НРРТ обезьяны во всех группах, не обработанных конъюгированным соединением РНКи, нацеленным на НРРТ.

**Таблица 84** Снижение РНК-мишени у яванских макаков с олигомерными агентами, содержащими бициклические лиганды CD71

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд	Мишень	РНК-мишень (% от контроля)						
				Четыреглавая мышца	Сердце	Диафрагма	Камбаловидная мышца	Большеберцовая мышца	Икроножная мышца	Печень
1694082	1694083	BCY 17901	MA LAT	29	37	48	46	47	46	32
1666846	1590463	BCY 17901	DM PK	33	59	31	36	25	31	57
1678710	1653456:165 2967	BCY 17901	DM PK	65	85	51	42	36	41	71
1694595	1586322:165 3454	BCY 17901	НРР Т	14	25	25	17	21	20	89

**Пример 23: Разработка модифицированных олигонуклеотидов, нацеленных на DMPK, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71**

Были разработаны и синтезированы модифицированные олигонуклеотиды, комплементарные DMPK мыши (как указано в таблице ниже). Соединение в таблице ниже имеет модификацию на 5'-конце, которая дает возможность конъюгировать с бициклическим лигандом.

**Таблица 85**

Дизайн модифицированных олигонуклеотидов, комплементарных DMPK мыши

№ соединения	Обозначение химии (от 5' к 3')	SEQ ID №:
1730822	[BCN][nC6o] <sub>o</sub> A <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ko</sub> A <sub>ko</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ko</sub> G <sub>ks</sub> G <sub>k</sub>	186
1730823	[BCN][nC6o] <sub>o</sub> A <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ks</sub> A <sub>ks</sub> A <sub>dz</sub> T <sub>dz</sub> A <sub>dz</sub> A <sub>dz</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ks</sub> G <sub>ks</sub> G <sub>k</sub>	187
1730824	[BCN][nC6o] <sub>o</sub> A <sub>ks</sub> <sup>m</sup> C <sub>ko</sub> A <sub>ko</sub> A <sub>dz</sub> T <sub>dz</sub> A <sub>dz</sub> A <sub>dz</sub> A <sub>ds</sub> T <sub>ds</sub> A <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> <sup>m</sup> C <sub>ds</sub> G <sub>ds</sub> A <sub>ko</sub> G <sub>ks</sub> G <sub>k</sub>	188

В таблице выше, Нижний индекс «k» представляет нуклеозид сEt, нижний индекс «d» представляет стереостандартный нуклеозид ДНК, нижний индекс «z» представляет мезилфосфорамидатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «s» указывает на фосфоротиоатную межнуклеозидную связь, нижний индекс «o» обозначает фосфодиэфирную межнуклеозидную связь, верхний индекс «m» перед буквой С представляет собой 5-метилцитозин, «[nC6o]» обозначает 6-аминогексаноловый линкер, и «[BCN]» обозначает (бицикло[6.1.0]нонин)формильный линкер.

Модифицированный олигонуклеотид был дополнительно конъюгирован с

BCY17901, как описано в таблице ниже.

**Таблица 86**

Разработка модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическим лигандом

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного соединения	Лиганд
1731582	1730822	BCY17901
1731583	1730823	BCY17901
1731584	1730824	BCY17901

**Пример 24: Активность модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, у гетерозиготных нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup>**

Активность и переносимость модифицированных олигонуклеотидов, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестировали на гетерозиготных нокаутных мышах hTFR<sup>KI/+</sup> (описано выше в данном документе).

*Лечение*

Нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> разделили на группы по 4 мыши в каждой. Каждой мышке внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) вводили 3,5 мг/кг конъюгированного модифицированного олигонуклеотида в общей сложности 3 дозы (в дни 1, 8 и 15), как указано в таблицах ниже. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

*Анализ РНК*

Мышей умерщвляли через неделю после последнего введения групп конъюгированных модифицированных олигонуклеотидов на 22-й день. РНК экстрагировали из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу (квад.) и икроножную мышцу (икру)) для количественного анализа RTPCR в реальном времени для измерения количества РНК DMPK мыши с использованием набора мышечных праймеров-зондов RTS3181 (как описано выше в данном документе). Уровни РНК DMPK мыши были нормализованы по отношению к GAPDH мыши. GAPDH мыши амплифицировали с использованием набора мышечных праймеров-зондов mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе). Результаты представлены в виде процентного содержания РНК DMPK мыши относительно количества DMPK мыши у контрольных животных, которым подкожно вводили ФСБ, нормализованных по РНК GAPDH мыши (% от контроля).

**Таблица 89**

Снижение уровня РНК DMPK мыши у нокаутных мышей hTFR<sup>KI/+</sup> модифицированными олигонуклеотидами, конъюгированными с бициклическими лигандами CD71

№ конъюгированного соединения	№ неконъюгированного	Лиганд	Путь введения	РНК DMPK (% от контроля)	
				Четырехглава	Икроножна

	соединения			я мышца	я мышца
1666846	1590463	BCY17901	п/к	48	47
			в/в	22	19
1731582	1730822	BCY17901	п/к	32	28
			в/в	15	15
1731583	1730823	BCY17901	п/к	38	37
			в/в	23	23
1731584	1730824	BCY17901	п/к	28	27
			в/в	21	20

**Пример 25: Структура и активность соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71**

**Таблица 90: Бициклические лиганды**

№ бициклического лиганда	Последовательность (от N к C)	N-концевая модификация	SEQ ID №:
BCY21757	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWK	ацетил	245
BCY21758	CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWC	ацетил	246

Разработаны различные смысловые модифицированные олигонуклеотиды. Смысловые олигонуклеотиды комплементарны первому из 21 нуклеотида (от 5' до 3') антисмысловых олигонуклеотидов, причем последние два 3'-нуклеотида антисмысловых олигонуклеотидов не спарены со смысловым олигонуклеотидом (являются выступающими нуклеотидами). Смысловые модифицированные олигонуклеотиды конъюгированы на 5'-конце с бициклическим лигандом с образованием следующих конъюгатов:

**Таблица 91: Конъюгаты с различными линкерами**

№ бициклического лиганда	Название линкера	Структура конъюгата
BCY21758	Малеимид	
BCY21757	Бисамид	
BCY21757	кетоксим	
BCY17901	ALO	

Y представляет собой бициклический лиганд, а X представляет собой

модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 21 связанной нуклеиновой кислоты, конъюгированный на 5'-конце.

#### *Активность*

Активность соединений РНКи, конъюгированных с бициклическими лигандами CD71, тестируют на гетерозиготных нокаутных мышах hTFRKI/+ (описанных в данном документе выше).

#### *Лечение*

Нокаутных мышей hTFRKI/+ разделили на группы по 2-4 мыши в каждой. Каждая мышь получает однократное внутривенное (в/в) или подкожное (п/к) введение конъюгированного модифицированного олигонуклеотида или конъюгированного соединения РНКи. Группа из 4 мышей получала ФСБ в качестве отрицательного контроля.

#### *Анализ РНК*

Мышей умерщвляют через неделю после введения. РНК экстрагируют из различных мышечных тканей (включая четырехглавую мышцу (квадрицепс), икроножную мышцу (икру), сердце, печень) для количественного анализа в реальном времени RTPCR для измерения количества РНК-мишени мыши. Уровни РНК-мишени мыши нормализованы по отношению к GAPDH мыши. GAPDH мыши амплифицируют с использованием набора мышинных праймеров-зондов mGapdh\_LTS00102 (описанного выше в данном документе).

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Олигомерное соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид и конъюгирующую группу, при этом модифицированный олигонуклеотид состоит из от 10 до 300 связанных нуклеозидов, а конъюгирующая группа содержит бициклический лиганд и конъюгирующий линкер, причем

бициклический лиганд содержит полипептид, состоящий из 13-22 связанных аминокислот или аналогов аминокислот и молекулярный каркас, причем:

каждая из первой, второй и третьей аминокислоты полипептида содержит реакционноспособную группу, каждая из которых отдельно образует связь с молекулярным каркасом, образуя таким образом две полипептидные петли, прикрепленные к молекулярному каркасу; и

при этом часть бициклического лиганда связывается с трансферриновым рецептором I типа; и

модифицированный олигонуклеотид ковалентно связан с бициклическим лигандом посредством конъюгирующего линкера.

2. Олигомерное соединение по п. 1, отличающееся тем, что конъюгирующая группа состоит из бициклического лиганда и конъюгирующего линкера.

3. Олигомерное соединение по п. 1 или 2, отличающееся тем, что состоит из модифицированного олигонуклеотида и конъюгирующей группы.

4. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-3, отличающееся тем, что каждая из трех реакционноспособных групп представляет собой тиол цистеина.

5. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что полипептид имеет следующую формулу от N-конца к C-концу:

$[B]_n-[Z_i]-[J]_m-[Z_{ii}]-[O]_o-[Z_{iii}]-[U]_p$ , при этом:

$Z_i$ ,  $Z_{ii}$  и  $Z_{iii}$  представляют собой первую, вторую и третью аминокислоты, содержащие реакционноспособную группу;

каждый B, J, O и U представляет собой независимо выбранную аминокислоту или аналог аминокислоты;

n равен от 0 до 5;

m равен от 3 до 7;

o равен от 3 до 7;

p равен от 0 до 5;

при этом сумма m+o составляет менее 12.

6. Олигомерное соединение по п. 5, отличающееся тем, что m равен 7 и o равен 3.

7. Олигомерное соединение по п. 5, отличающееся тем, что m равен 2 и o равен 9.

8. Олигомерное соединение по п. 5, отличающееся тем, что оба m и o равны 6.

9. Олигомерное соединение по п. 5, отличающееся тем, что m равен 3 и o равен 8.

10. Олигомерное соединение по любому из пп. 5-9, отличающееся тем, что n равен 0.

11. Олигомерное соединение по любому из пп. 5-9, отличающееся тем, что n равен 3



или 4.

12. Олигомерное соединение по любому из пп. 5-11, отличающееся тем, что  $r$  равен 0.

13. Олигомерное соединение по любому из пп. 5-11, отличающееся тем, что  $r$  равен 3 или 4.

14. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что полипептид имеет N-концевую модификацию.

15. Олигомерное соединение по п. 14, отличающееся тем, что N-концевая модификация представляет собой ацетильную группу.

16. Олигомерное соединение по п. 14, отличающееся тем, что N-концевая модификация представляет собой азидопропильную группу.

17. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-13, отличающееся тем, что полипептид имеет C-концевую модификацию.

18. Олигомерное соединение по п. 14, отличающееся тем, что C-концевая модификация представляет собой амидную группу.

19. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-18, отличающееся тем, что конъюгирующий линкер присоединен к N-концевой аминокислоте бициклического лиганда.

20. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-19, отличающееся тем, что конъюгирующий линкер присоединен к C-концевой аминокислоте бициклического лиганда.

21. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-20, отличающееся тем, что конъюгирующий линкер присоединен к боковой цепи аминокислоты в одной из полипептидных петель бициклического лиганда.

22. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-21, отличающееся тем, что бициклический лиганд содержит C-концевое удлинение.

23. Олигомерное соединение по п. 22, отличающееся тем, что C-концевое удлинение выбрано из ПЭГ10 или ПЭГ24.

24. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-23, отличающееся тем, что бициклический лиганд содержит N-концевое удлинение.

25. Олигомерное соединение по п. 24, отличающееся тем, что N-концевое удлинение выбрано из ПЭГ10 или ПЭГ24.

26. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-25, отличающееся тем, что конъюгирующая группа присоединена к 5'-концевому нуклеозиду модифицированного олигонуклеотида.

27. Олигомерное соединение по п. 26, отличающееся тем, что конъюгирующая группа присоединена к 5'-положению 5'-концевого нуклеозида модифицированного олигонуклеотида.

28. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-25, отличающееся тем, что конъюгирующая группа присоединена к 3'-концевому нуклеозиду модифицированного

олигонуклеотида.

29. Олигомерное соединение по п. 28, отличающееся тем, что конъюгирующая группа присоединена к 3'-положению 3'-концевого нуклеозида модифицированного олигонуклеотида.

30. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-25, отличающееся тем, что конъюгирующая группа присоединена к внутреннему нуклеозиду модифицированного олигонуклеотида.

31. Олигомерное соединение по п. 1-25, отличающееся тем, что конъюгирующая группа присоединена посредством модифицированной межнуклеозидной связи.

32. Олигомерное соединение по п. 28-30, отличающееся тем, что конъюгирующая группа присоединена к 2'-модифицированному фуранозильному фрагменту сахара.

33. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-32, отличающееся тем, что бициклический лиганд имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 80% идентична любой из SEQ ID №: 26-27, 36-56, 58-65, 67-76, 79-88, 90-152 или 192-246.

34. Олигомерное соединение по п. 33, отличающееся тем, что бициклический лиганд имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентична любой из SEQ ID №: 26-27, 36-56, 58-65, 67-76, 79-88, 90-152 или 192-246.

35. Олигомерное соединение по любому из пп. 5-34, отличающееся тем, что  $[Z_i]-[J]_m-[Z_{ii}]-[O]_o-[Z_{iii}]$  имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% идентична любой из SEQ ID №: 26-27, 35-56, 58-65, 67-76, 79-88, 90-152 или 192-246.

36. Олигомерное соединение по любому из пп. 5-35, отличающееся тем, что  $[Z_i]-[J]_m-[Z_{ii}]-[O]_o-[Z_{iii}]$  имеет аминокислотную последовательность CXXDXXXGCISYC (SEQ ID №: 35), где каждый «X» представляет собой независимо выбранную аминокислоту.

37. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-36, отличающееся тем, что бициклический лиганд содержит по меньшей мере один, по меньшей мере два или по меньшей мере три неприродные аминокислоты.

38. Олигомерное соединение по п. 37, отличающееся тем, что по меньшей мере одна неприродная аминокислота выбрана из D-аминокислоты, аллоизолейцина, 2-амино-3-этилпентановой кислоты, аминоизомасляной кислоты, аминوماсляной кислоты, азетидина, 7-азатриптофана, 6-азидолизина, β-циклобутилаланина, β-метилизольцина, 4,4-бифенилаланина, цис-гидроксипролина, циклобутилглицина, циклогексилглицина, циклопентилаланина, циклопентилглицина, 2,6-диметилтирозина, 3,3-дифенилаланина, 4-транс-гидрокси-L-пролина, 1-нафтилаланина, 2-нафтилаланина, N-метилаланина, 1-метилгистидина, 3-метилгистидина, N-метилтриптофана, пипеколиновой кислоты, 4-пиридилаланина, саркозина, трет-бутилаланина или 3-трет-бутилтирозина.

39. Олигомерное соединение по п. 38, отличающееся тем, что по меньшей мере одна аминокислота неприродного происхождения выбрана из 4-транс-гидрокси-L-пролина, 6-

азидолизина и трет-бутилглицина.

40. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-39, отличающееся тем, что молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

41. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-39, отличающееся тем, что молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазиан-1,3,5-триил)трис(2-брометанон) (ТАТВ).

42. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-41, отличающееся тем, что бициклический лиганд не ингибирует связывание трансферрина с рецептором трансферрина.

43. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-42, отличающееся тем, что по меньшей мере один нуклеозид модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный фрагмент сахара.

44. Олигомерное соединение по п. 43, отличающееся тем, что по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара содержит бициклический фрагмент сахара.

45. Олигомерное соединение по п. 44, отличающееся тем, что бициклический фрагмент сахара содержит 2'-4' мостик, выбранный из -O-CH<sub>2</sub>-; и -O-CH(CH<sub>3</sub>)-.

46. Олигомерное соединение по п. 43-45, отличающееся тем, что по меньшей мере один модифицированный фрагмент сахара содержит небциклический модифицированный фрагмент сахара.

47. Олигомерное соединение по п. 46, отличающееся тем, что небциклический модифицированный фрагмент сахара представляет собой фрагмент 2'-МОЕ сахара или фрагмент 2'-ОМе сахара.

48. Олигомерное соединение по любому из пп. 43-47, отличающееся тем, что по меньшей мере один нуклеозид модифицированного олигонуклеотидного соединения содержит заменитель сахара.

49. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-48, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну модифицированную межнуклеозидную связь.

50. Олигомерное соединение по п. 49, отличающееся тем, что по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

51. Олигомерное соединение по любому из пп. 49-50, отличающееся тем, что каждая межнуклеозидная связь представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

52. Олигомерное соединение по п. 51, отличающееся тем, что каждая межнуклеозидная связь представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

53. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-50, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

54. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-50 или 53, отличающееся тем, что

каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида независимо выбрана из фосфодиэфирной или фосфоротиоатной межнуклеозидной связи.

55. Олигомерное соединение по п. 49, отличающееся тем, что по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь представляет собой мезилфосфорамидатную межнуклеозидную связь.

56. Олигомерное соединение по любому из пп. 49-55, отличающееся тем, что каждая межнуклеозидная связь независимо выбрана из фосфодиэфирной, фосфоротиоатной межнуклеозидной или мезилфосфорамидатной межнуклеозидной связи.

57. Олигомерное соединение по любому из пп. 49-55, отличающееся тем, что каждая межнуклеозидная связь независимо выбрана из фосфоротиоатной межнуклеозидной или мезилфосфорамидатной межнуклеозидной связи.

58. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-57, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одно модифицированное нуклеиновое основание.

59. Олигомерное соединение по п. 58, отличающееся тем, что нуклеиновое основание представляет собой 5-метилцитозин.

60. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-59, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид содержит дезокси-область, состоящую из 5-12 смежных 2'-дезоксинуклеозидов.

61. Олигомерное соединение по п. 60, отличающееся тем, что каждый нуклеозид дезокси-области представляет собой 2'- $\beta$ -D-дезоксинуклеозид.

62. Олигомерное соединение по п. 60 или 61, отличающееся тем, что дезокси-область состоит из 7, 8, 9, 10 или 7-10 связанных нуклеозидов.

63. Олигомерное соединение по любому из пп. 60-62, отличающееся тем, что каждый нуклеозид, непосредственно примыкающий к дезокси-области, содержит модифицированный фрагмент сахара.

64. Олигомерное соединение по любому из пп. 60-63, отличающееся тем, что дезокси-область фланкирована на 5'-стороне 5'-областью, состоящей из 1-6 связанных нуклеозидов 5'-области, а на 3'-стороне 3'-областью, состоящей из 1-6 связанных нуклеозидов 3'-области; причем

крайний 3'-нуклеозид 5'-области содержит модифицированный фрагмент сахара; и крайний 5'-нуклеозид 3'-области содержит модифицированный фрагмент сахара.

65. Олигомерное соединение по п. 64, отличающееся тем, что каждый нуклеозид 3'-области содержит модифицированный фрагмент сахара.

66. Олигомерное соединение по п. 64 или 65, отличающееся тем, что каждый нуклеозид 5'-области содержит модифицированный фрагмент сахара.

67. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-66, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид имеет мотив сахара, содержащий:

5'-область, состоящую из 1-6 связанных нуклеозидов 5'-области;

внутреннюю область, состоящую из 6-10 связанных нуклеозидов внутренней

области; и

3'-область, состоящую из 1-6 связанных нуклеозидов 3'-области;

причем каждый из нуклеозидов 5'-области и каждый из нуклеозидов 3'-области содержит модифицированный фрагмент сахара; и каждый из нуклеозидов внутренней области выбран из 2'-дезоксинуклеозида и 2'-замещенного нуклеозида.

68. Олигомерное соединение по п. 67, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид имеет мотив сахара, содержащий:

5'-область, состоящую из 1-6 связанных нуклеозидов 5'-области;

внутреннюю область, состоящую из 6-10 связанных нуклеозидов внутренней области; и

3'-область, состоящую из 1-6 связанных нуклеозидов 3'-области;

причем каждый из нуклеозидов 5'-области и каждый из нуклеозидов 3'-области представляет собой нуклеозид сEt или нуклеозид 2'-МОЕ; и каждый из нуклеозидов внутренней области представляет собой 2'-β-D-дезоксинуклеозид.

69. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-59, отличающееся тем, что каждый нуклеозид модифицированного олигонуклеотида содержит фрагмент 2'-сахара.

70. Олигомерное соединение по п. 69, отличающееся тем, что каждый фрагмент 2'-сахара выбран из 2'-ОМе, 2'-МОЕ или 2'-NMA.

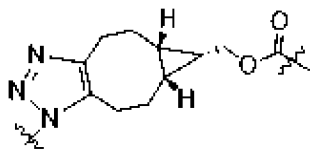
71. Олигомерное соединение по п. 69 или 70, отличающееся тем, что каждый нуклеозид модифицированного олигонуклеотида содержит один и тот же фрагмент 2'-сахара.

72. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-71, отличающееся тем, что конъюгирующий линкер способен расщепляться.

73. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-72, отличающееся тем, что конъюгирующий линкер содержит 1-3 линкерных нуклеозида.

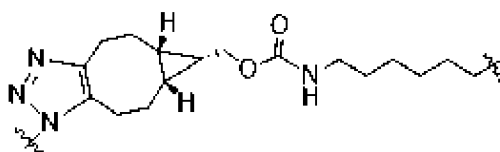
74. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-72, отличающееся тем, что конъюгирующий линкер не содержит каких-либо линкерных нуклеозидов.

75. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-74, отличающееся тем, что



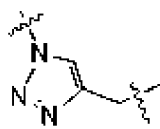
конъюгирующая группа содержит:

76. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-74, отличающееся тем, что



конъюгирующая группа содержит:

77. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-74, отличающееся тем, что



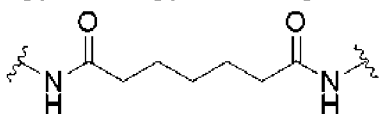
конъюгирующая группа содержит:

78. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-74, отличающееся тем, что

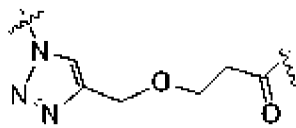


конъюгирующая группа содержит:

79. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-74, отличающееся тем, что конъюгирующая группа содержит:

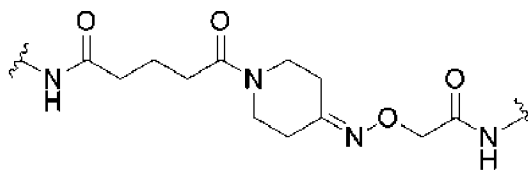


80. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-74, отличающееся тем, что



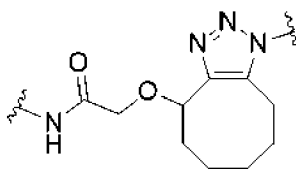
конъюгирующая группа содержит:

81. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-74, отличающееся тем, что



конъюгирующая группа содержит:

82. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-74, отличающееся тем, что



конъюгирующая группа содержит:

83. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-82, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени, экспрессируемой в мышцах.

84. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-83, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид способен снижать количество нуклеиновой кислоты-мишени посредством активации РНКазы H.

85. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-83, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид способен снижать количество нуклеиновой кислоты-мишени посредством активации RISC/Ago2.

86. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-83, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид способен модулировать сплайсинг нуклеиновой кислоты-мишени.

87. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-83, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид представляет собой направляющую РНК, tracrРНК или scoutРНК.

88. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-87, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид комплементарен комплементу нуклеиновой кислоты-мишени, экспрессируемой в мышцах.

89. Олигомерное соединение по любому из пп. 83-88, отличающееся тем, что нуклеиновая кислота-мишень связана с заболеванием мышц.

90. Олигомерное соединение по любому из пп. 83-89, отличающееся тем, что нуклеиновая кислота-мишень выбрана из CaMK2d, NLRP3, PLN, DMD, DMPK, DNM2, DUX4 или HPRT.

91. Олигомерное соединение по любому из пп. 83-90, отличающееся тем, что нуклеиновая кислота-мишень в мышцах имеет последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 1-15.

92. Олигомерное соединение по любому из пп. 83-91, отличающееся тем, что нуклеиновая кислота-мишень экспрессируется в по меньшей мере одной из следующих тканей: скелетная мышца (включая, но не ограничиваясь этим, четырехглавую мышцу, икроножную мышцу, переднюю большеберцовую мышцу, трехглавую мышцу, жевательную мышцу, длинный разгибатель пальцев (EDL), камбаловидную мышцу, диафрагму), сердце, седалищный нерв, аорта или печень.

93. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-92, отличающееся тем, что последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида содержит по меньшей мере 12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или по меньшей мере 16 непрерывных нуклеиновых оснований любой из последовательностей нуклеиновых оснований любой из SEQ ID №: 167-191.

94. Олигомерное соединение по любому из пп. 1-93, отличающееся тем, что модифицированный олигонуклеотид состоит из от 10 до 25, от 10 до 30, от 12 до 20, от 12 до 25, от 12 до 30, от 13 до 20, от 13 до 25, от 13 до 30, от 14 до 20, от 14 до 25, от 14 до 30, от 15 до 20, от 15 до 25, от 15 до 30, от 16 до 18, от 16 до 20, от 16 до 25, от 16 до 30, от 17 до 20, от 17 до 25, от 17 до 30, от 18 до 20, от 18 до 25, от 18 до 30, от 19 до 20, от 19 до 25, от 19 до 30, от 20 до 25, от 20 до 30, от 21 до 25, от 21 до 30, от 21 до 50, от 22 до 25, от 22 до 30, от 23 до 25, от 23 до 30, от 20 до 100, от 40 до 100, от 50 до 100, от 50 до 200, от 100 до 300, 150-300 или 200-300 связанных нуклеозидов.

95. Олигомерный дуплекс, содержащий первое олигомерное соединение, содержащее первый модифицированный олигонуклеотид, и второе олигомерное соединение, содержащее второй модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 16-30 связанных нуклеозидов, причем последовательность нуклеиновых оснований второго модифицированного олигонуклеотида содержит комплементарную область, состоящую из по меньшей мере 12 нуклеиновых оснований, которые на по меньшей мере 90% комплементарны участку равной длины первого модифицированного олигонуклеотида, а

второе олигомерное соединение представляет собой олигомерное соединение по любому из пп. 1-86 или 89-94.

96. Олигомерный дуплекс по п. 95, отличающийся тем, что первый модифицированный олигонуклеотид комплементарен нуклеиновой кислоте-мишени в мышцах.

97. Олигомерный дуплекс по п. 96, отличающийся тем, что дуплекс способен снижать количество нуклеиновой кислоты-мишени посредством активации RISC/Ago2.

98. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-97, отличающийся тем, что по меньшей мере один нуклеозид второго модифицированного олигонуклеотида содержит модифицированный фрагмент сахара.

99. Олигомерный дуплекс по п. 98, отличающийся тем, что модифицированный фрагмент сахара второго модифицированного олигонуклеотида содержит бициклический фрагмент сахара.

100. Олигомерный дуплекс по п. 99, отличающийся тем, что бициклический фрагмент сахара второго модифицированного олигонуклеотида содержит 2'-4'-мостик, выбранный из -O-CH<sub>2</sub>-; и -O-CH(CH<sub>3</sub>)-.

101. Олигомерный дуплекс по п. 100, отличающийся тем, что модифицированный фрагмент сахара второго модифицированного олигонуклеотида содержит небициклический модифицированный фрагмент сахара.

102. Олигомерный дуплекс по п. 101, отличающийся тем, что небициклический модифицированный фрагмент сахара второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой фрагмент 2'-МОЕ сахара, фрагмент 2'-F сахара или фрагмент 2'-Оме сахара.

103. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-102, отличающийся тем, что по меньшей мере один нуклеозид второго модифицированного олигонуклеотида содержит заменитель сахара.

104. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-102, отличающийся тем, что по меньшей мере одна межнуклеозидная связь второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь.

105. Олигомерный дуплекс по п. 104, отличающийся тем, что по меньшей мере одна модифицированная межнуклеозидная связь второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой фосфоротиоатную межнуклеозидную связь.

106. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-105, отличающийся тем, что по меньшей мере одна межнуклеозидная связь второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой фосфодиэфирную межнуклеозидную связь.

107. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-104 или 106, отличающийся тем, что каждая межнуклеозидная связь второго модифицированного олигонуклеотида независимо выбрана из фосфодиэфирной или фосфоротиоатной межнуклеозидной связи.

108. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-107, отличающийся тем, что второй модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одно модифицированное



нуклеиновое основание.

109. Олигомерный дуплекс по п. 108, отличающийся тем, что модифицированное нуклеиновое основание второго модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5-метилцитозин.

110. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-109, отличающийся тем, что первое олигомерное соединение содержит 5'-стабилизированную фосфатную группу.

111. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-109, отличающийся тем, что второе олигомерное соединение содержит 5'-стабилизированную фосфатную группу.

112. Олигомерный дуплекс по п. 110 или 111, отличающийся тем, что стабилизированная фосфатная группа содержит циклопропилфосфонат или винилфосфонат.

113. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-112, отличающийся тем, что первый модифицированный олигонуклеотид содержит заменитель сахара гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA).

114. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-113, отличающийся тем, что первый модифицированный олигонуклеотид содержит фрагмент 2'-NMA сахара.

115. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-114, отличающийся тем, что второй модифицированный олигонуклеотид содержит заменитель сахара гликолевую нуклеиновую кислоту (GNA).

116. Олигомерный дуплекс по любому из пп. 95-115, отличающийся тем, что второе модифицированное олигонуклеотидное соединение содержит фрагмент 2'-NMA сахара.

117. Способ модуляции нуклеиновой кислоты-мишени у субъекта, включающий введение субъекту олигомерного соединения по любому из пп. 1-94 или олигомерного дуплекса по любому из пп. 95-116.

118. Способ по п. 117, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота-мишень экспрессируется в по меньшей мере одном из скелетной мышцы (включая, но не ограничиваясь этим, четырехглавую мышцу, икроножную мышцу, переднюю большеберцовую мышцу, трехглавую мышцу, жевательную мышцу, длинный разгибатель пальцев (EDL), камбаловидную мышцу, диафрагму), сердца, седалищного нерва, аорты или печени.

119. Способ по п. 117 или 118, отличающийся тем, что введение олигомерного соединения по любому из пп. 1-94 или олигомерного дуплекса по любому из пп. 95-116 приводит к уменьшению количества нуклеиновой кислоты-мишени.

120. Способ по п. 117 или 118, отличающийся тем, что введение олигомерного соединения по любому из пп. 1-94 или олигомерного дуплекса по любому из пп. 95-116 приводит к изменению сплайсинга нуклеиновой кислоты-мишени.

121. Способ по любому из пп. 117-120, отличающийся тем, что олигомерное соединение или олигомерный дуплекс вводят посредством внутривенного или подкожного введения.

122. Способ по любому из пп. 117-120, отличающийся тем, что олигомерное

соединение или олигомерный дуплекс вводят в дозе 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 55 мг, 60 мг, 65 мг, 70 мг, 75 мг, 80 мг, 85 мг, 90 мг, 95 мг, 100 мг, 105 мг, 110 мг, 115 мг, 120 мг, 125 мг, 130 мг, 135 мг, 140 мг, 145 мг, 150 мг, 155 мг, 160 мг, 165 мг, 170 мг, 175 мг, 180 мг, 185 мг, 190 мг, 195 мг, 200 мг, 205 мг, 210 мг, 215 мг, 220 мг, 225 мг, 230 мг, 235 мг, 240 мг, 245 мг, 250 мг, 255 мг, 260 мг, 265 мг, 270 мг, 275 мг, 280 мг, 285 мг, 290 мг, 295 мг, 300 мг, 305 мг, 310 мг, 315 мг, 320 мг, 325 мг, 330 мг, 335 мг, 340 мг, 345 мг или 350 мг.

123. Способ по любому из пп. 117-122, включающий введение олигомерного соединения или олигомерного дуплекса один раз в 4 недели, один раз в 6 недель, один раз в 8 недель, один раз в 12 недель, один раз в 16 недель, один раз в 20 недель, один раз в 24 недели, один раз в 6 месяцев или один раз в год.

124. Бициклический лиганд, специфичный для рецептора трансферрина 1 (TfR1), который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из: CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWK (SEQ ID №: 245, именуемую в данном документе как BCY21757) и CP[HyP]DAYLGC[tBuGly]SYCEPWC (SEQ ID №: 246, именуемую в данном документе как BCY21758), где HyP представляет собой транс-4-гидрокси-L-пролин, а tBuGly представляет собой трет-бутилглицин.

125. Бициклический лиганд по п. 124, который содержит N-концевую ацетильную группу и C-концевую группу CONH<sub>2</sub>.

126. Бициклический лиганд по п. 124 или 125, который представляет собой фармацевтически приемлемую соль.

127. Фармацевтическая соль по п. 126, отличающаяся тем, что выбрана из натриевой, калиевой, кальциевой или аммониевой соли.

128. Бициклический лиганд по п. 124, отличающийся тем, что первый, второй и третий остатки цистеина в указанных пептидных лигандах ковалентно связаны с молекулярным каркасом, так что на указанном молекулярном каркасе образуются две полипептидные петли.

129. Бициклический лиганд по п. 125, отличающийся тем, что молекулярный каркас представляет собой 1,1',1''-(1,3,5-триазинан-1,3,5-триил)трипроп-2-ен-1-он (ТАТА).

По доверенности