

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490873 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.09

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7115 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.07

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОЛИКИСТОЗНОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

(31) 63/253,933

(32) 2021.10.08

(33) US

(86) PCT/US2022/077766

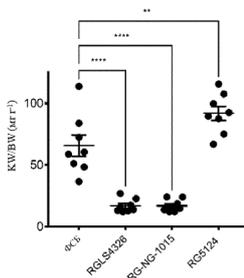
(87) WO 2023/060237 2023.04.13

(71) Заявитель:
РЕГЬЮЛЭС ТЕРАПЬЮТИКС ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Драйджин Денис, Кинберджер Гарт Э.,
Ли Эдмунд Чунь Юй (US)

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

(57) В настоящем документе предложены способы лечения поликистозной болезни почек, включая аутосомно-доминантную поликистозную болезнь почек, с использованием модифицированных олигонуклеотидов, нацеленных на miR-17.



A1

202490873

202490873

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580789EA/023

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОЛИКИСТОЗНОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки США № 63/253933, поданной 8 октября 2021 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] В настоящем документе предложены композиции и способы лечения поликистозной болезни почек.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Поликистозная болезнь почек характеризуется скоплением в почках многочисленных заполненных жидкостью кист. Эти кисты выстланы одним слоем эпителиальных клеток, называемым эпителием кисты. Со временем кисты увеличиваются в размерах за счет повышенной пролиферации клеток и активной секреции жидкости эпителием кисты. Увеличенные кисты сдавливают окружающие здоровые ткани, что приводит к ухудшению функции почек. Заболевание в конечном итоге прогрессирует до терминальной стадии почечной недостаточности, требующей диализа или трансплантации почки. На этой стадии кисты могут быть окружены участками фиброза, содержащими атрофические каналы. Поликистозная болезнь почек также может привести к развитию кист в печени и других частях тела.

[0004] Ряд генетических нарушений может привести к поликистозной болезни почек (PKD). Различные формы PKD различаются по типу наследования, например, аутосомно-доминантное или аутосомно-рецессивное наследование; вовлечение органов и проявление фенотипов за пределами почек; возраст начала терминальной стадии заболевания почек, например, при рождении, в детстве или во взрослом возрасте; и основная генетическая мутация, связанная с заболеванием. См., например Kurschat et al., 2014, Nature Reviews Nephrology, 10: 687-699.

СУТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вариант осуществления 1. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, причем модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру в ориентации от 5' к 3':



где каждый N'' независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид;

p составляет от 0 до 14; при этом, если p не равно 0, последовательность азотистых оснований (N'') _p комплементарна части равной длины последовательности азотистых оснований miR-17;

каждый N из (N) _r независимо представляет собой модифицированный или

немодифицированный нуклеотид, а последовательность азотистых оснований $(N)_r$ представляет собой 5'-AGCACUUU-3';

N' представляет собой нуклеозид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент;

q равно 0 или 1; при этом, если q равно 1, азотистое основание N' представляет собой урацильное азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; и

каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина; или его фармацевтически приемлемая соль.

Вариант осуществления 2. Соединение по варианту осуществления 1, где структура $(N)_r$ представляет собой:



где нуклеозиды, за которыми следует индекс «M», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды;

нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды; и

нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой нуклеозиды S-cEt.

Вариант осуществления 3. Соединение по варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, где по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 4. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-3, где каждая межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 5. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-4, где q равно 1.

Вариант осуществления 6. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-4, где q равно 0.

Вариант осуществления 7. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-6, где p равно 0.

Вариант осуществления 8. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-6, где p выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

Вариант осуществления 9. Соединение по варианту осуществления 8, где последовательность азотистых оснований $(N''')_p$ имеет не более одного несовпадения с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1).

Вариант осуществления 10. Соединение по варианту осуществления 8, где последовательность азотистых оснований $(N''')_p$ не имеет несовпадений с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1).

Вариант осуществления 11. Соединение по любому из вариантов осуществления 8,

9 или 10, где последовательность азотистых оснований $(N^p)_p$ выбрана из CUACCUGCACUGUA (SEQ ID NO: 7), CUACCUGCACUGU (SEQ ID NO: 8), CUACCUGCACUG (SEQ ID NO: 9), CUACCUGCACU (SEQ ID NO: 10), CUACCUGCAC (SEQ ID NO: 11), CUACCUGCA, CUACCUGC, CUACCUG, CUACCU, CUACC, CUAC, CUA, CU и C.

Вариант осуществления 12. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-5 или 7-11, где азотистое основание N^p представляет собой пуриновое азотистое основание, не имеющее акцептора водородной связи в положении 6.

Вариант осуществления 13. Соединение по варианту осуществления 12, где азотистое основание N^p выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

Вариант осуществления 14. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-13, где сахарный фрагмент N^p не представляет собой 2'-О-метилловый сахар.

Вариант осуществления 15. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-14, где сахарный фрагмент N^p представляет собой 2'-О-метоксиэтиловый сахар или сахар S-cEt.

Вариант осуществления 16. Соединение по варианту осуществления 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'- $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S A_S-3'$, где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

Вариант осуществления 17. Соединение по варианту осуществления 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'- $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S U_S-3'$, где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

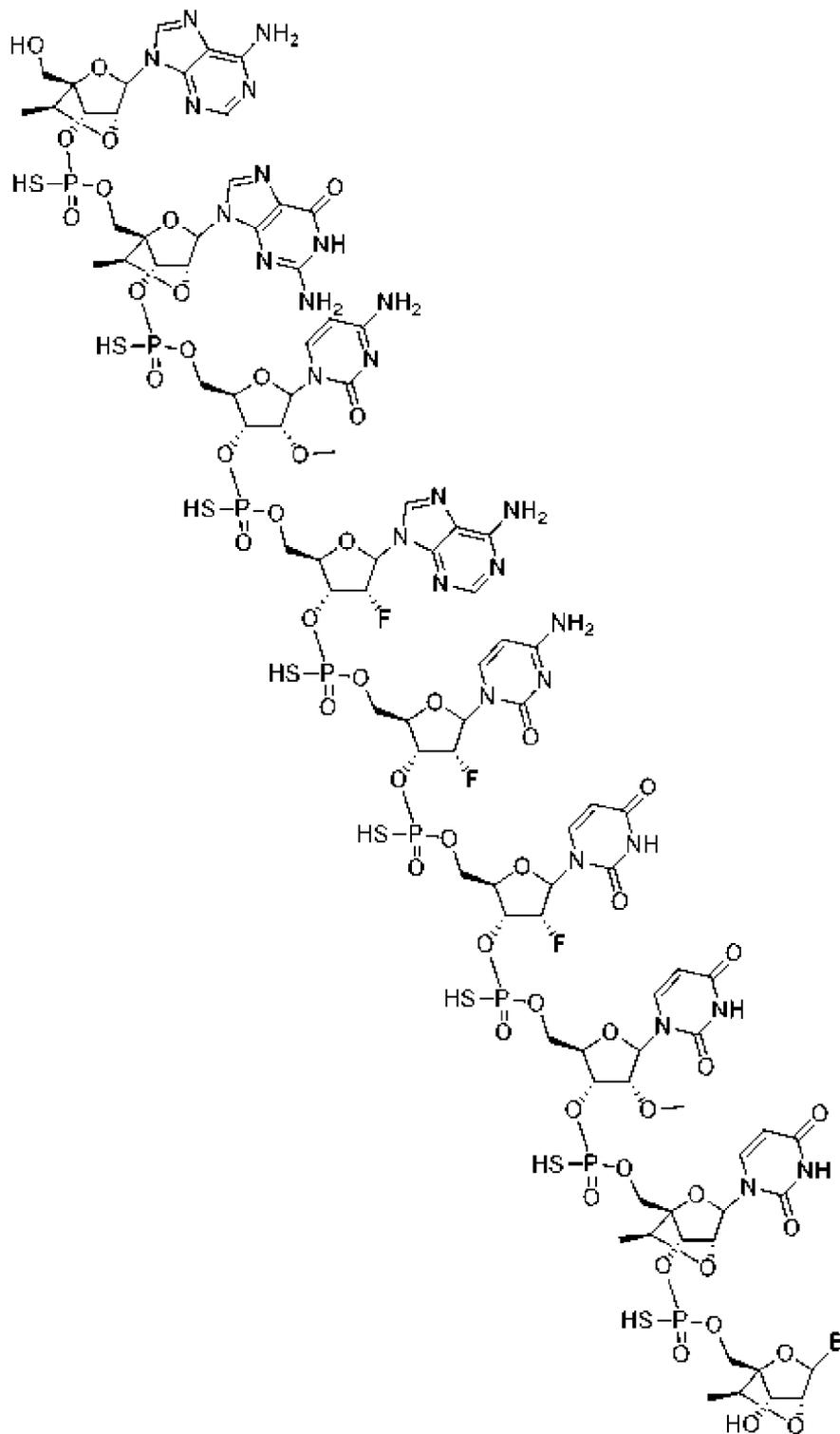
Вариант осуществления 18. Соединение по варианту осуществления 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'- $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S C_S-3'$, где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

Вариант осуществления 19. Соединение по варианту осуществления 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'- $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S-3'$, где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

Вариант осуществления 20. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-19, где соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида.

Вариант осуществления 21. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-20, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

Вариант осуществления 22. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



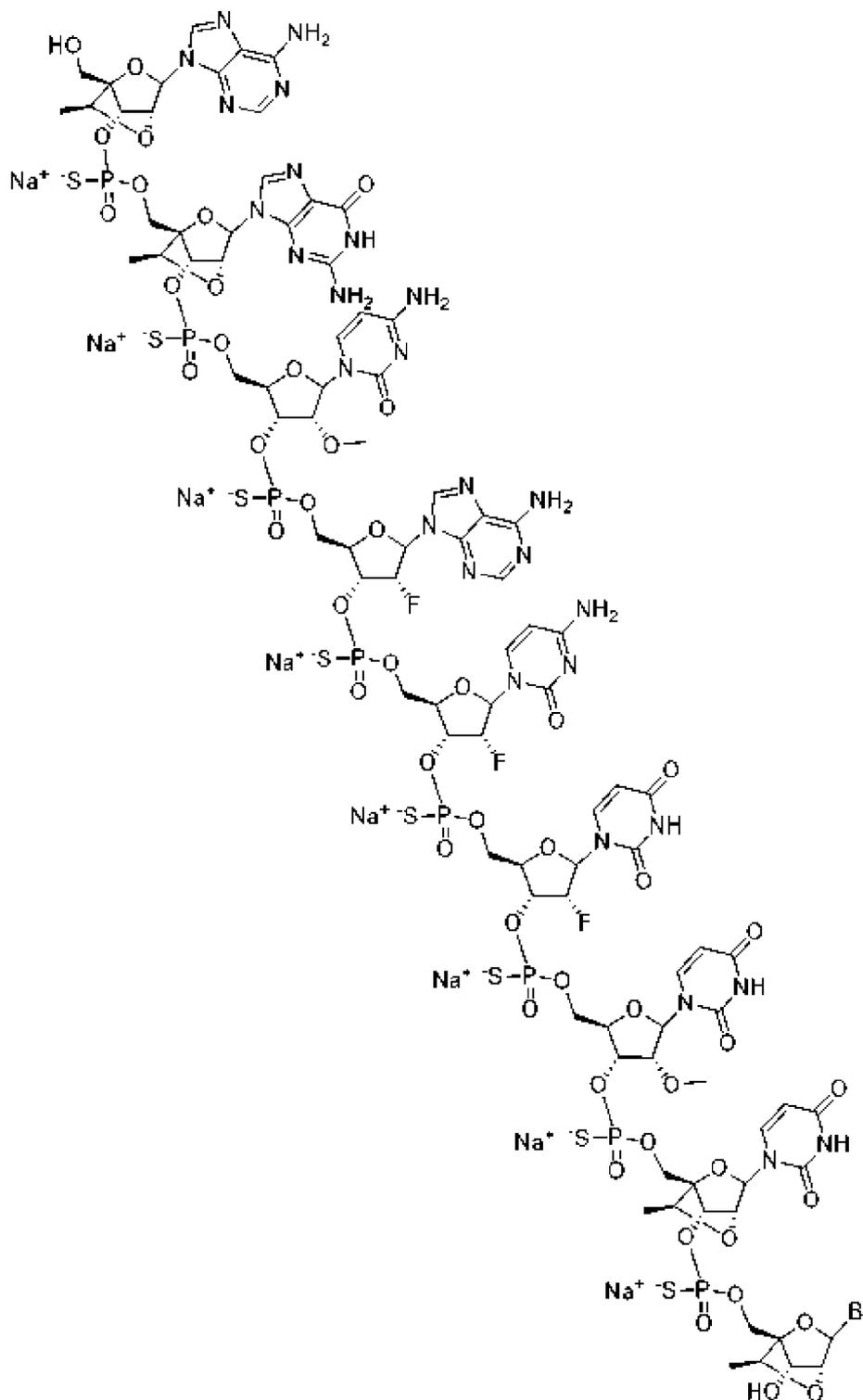
где В представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозинное азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; или его фармацевтически приемлемая соль

Вариант осуществления 23. Модифицированный олигонуклеотид по варианту осуществления 22, где азотистое основание В выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

Вариант осуществления 24. Модифицированный олигонуклеотид по варианту

осуществления 22 или варианту осуществления 23, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

Вариант осуществления 25. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:

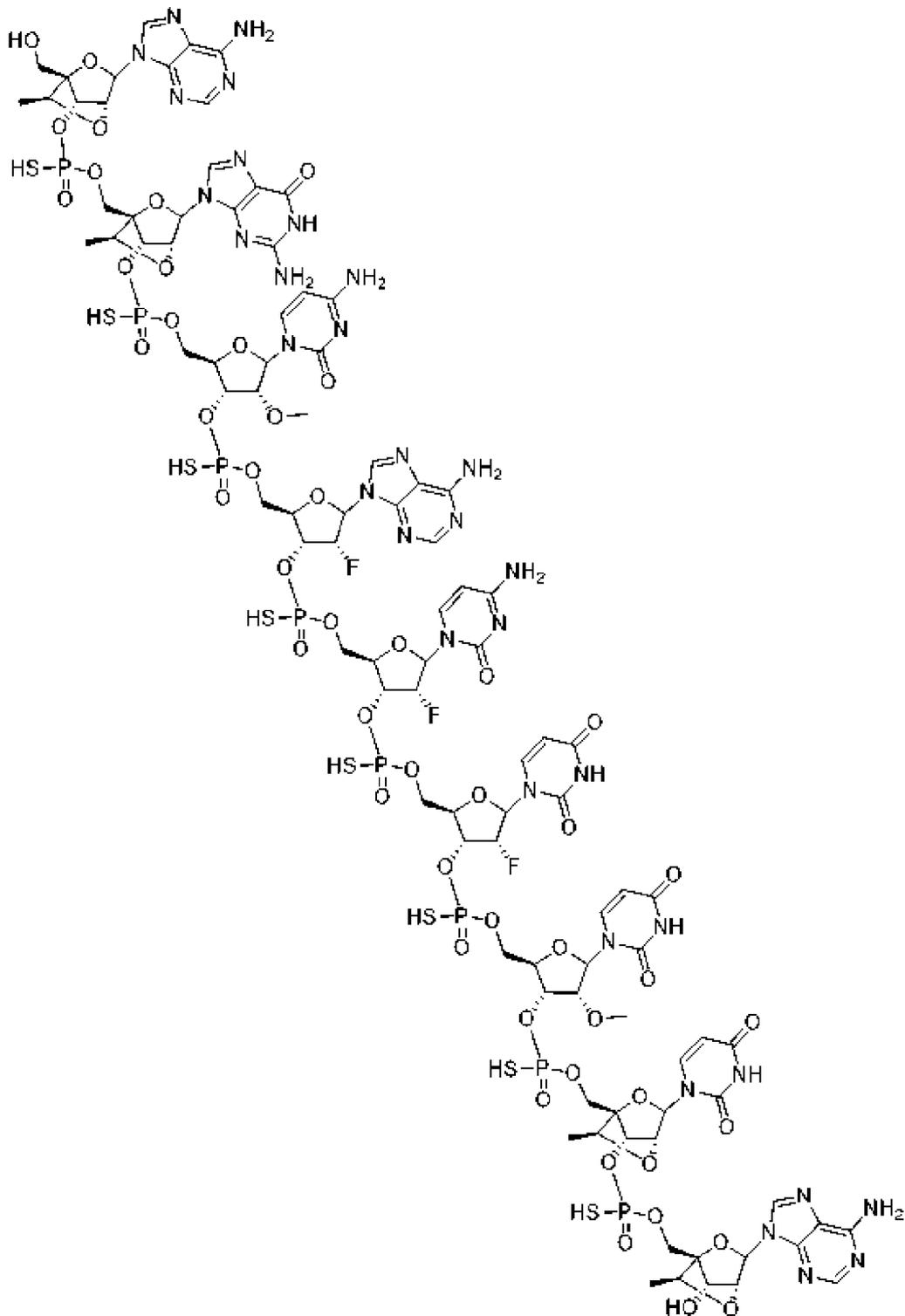


где В представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозинное азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6.

Вариант осуществления 26. Модифицированный олигонуклеотид по варианту

осуществления 25, где В выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

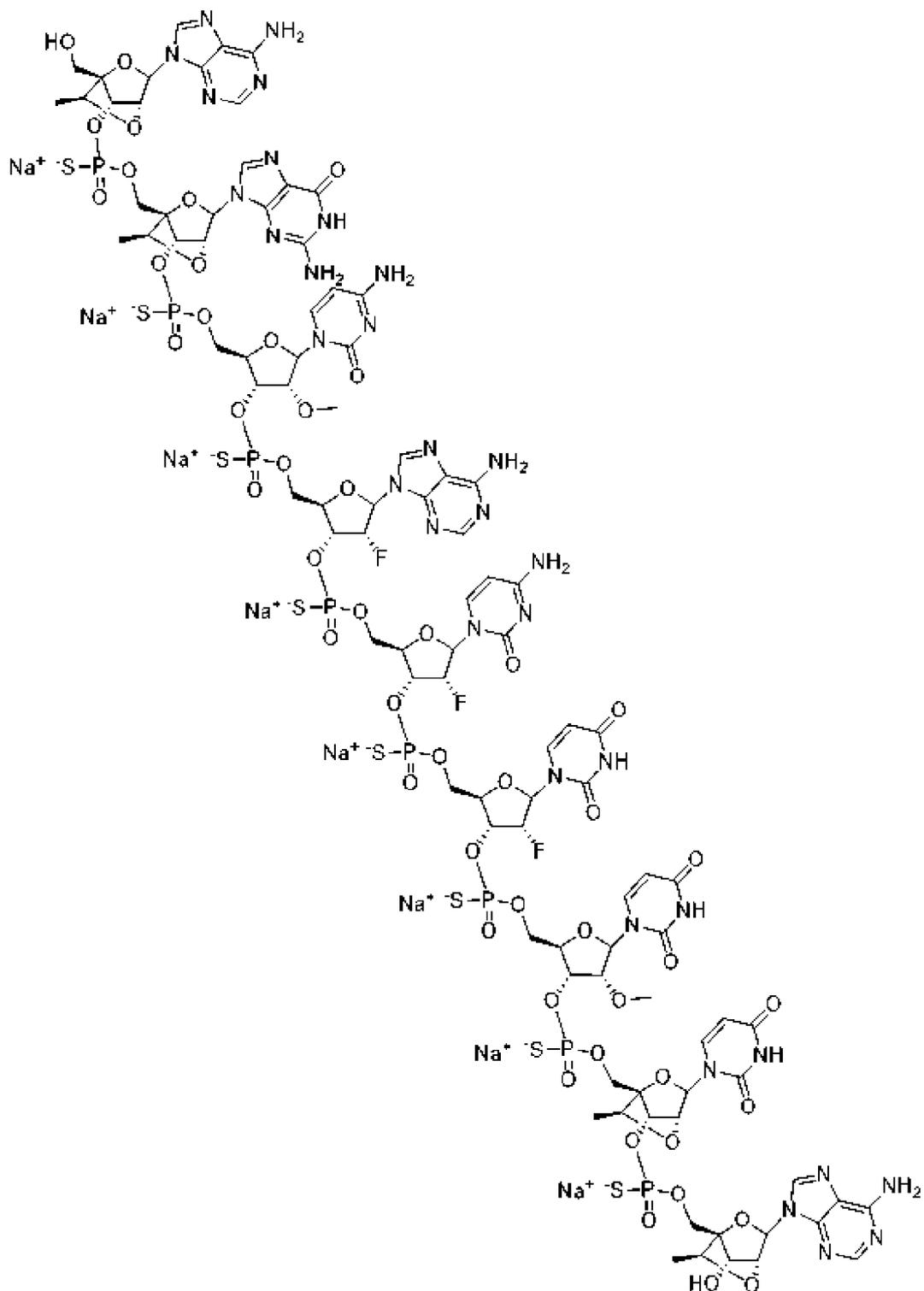
Вариант осуществления 27. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

Вариант осуществления 28. Модифицированный олигонуклеотид по варианту осуществления 27, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

Вариант осуществления 29. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



Вариант осуществления 30. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из вариантов осуществления 1-21 или модифицированный олигонуклеотид по любому из вариантов осуществления 22-29 и фармацевтически приемлемый разбавитель.

Вариант осуществления 31. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 30, где фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой

водный раствор.

Вариант осуществления 32. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 31, где водный раствор представляет собой солевой раствор.

Вариант осуществления 33. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из вариантов осуществления 1-21 или модифицированный олигонуклеотид по любому из вариантов осуществления 22-29, которая представляет собой лиофилизированную композицию.

Вариант осуществления 34. Фармацевтическая композиция, состоящая по существу из соединения по любому из вариантов осуществления 1-21 или модифицированного олигонуклеотида по любому из вариантов осуществления 22-29 в солевом растворе.

Вариант осуществления 35. Способ ингибирования активности одного или более членов семейства miR-17 в клетке, включающий приведение клетки в контакт с соединением по любому из вариантов осуществления 1-21 или модифицированным олигонуклеотидом по любому из вариантов осуществления 22-29.

Вариант осуществления 36. Способ ингибирования активности одного или более членов семейства miR-17 у субъекта, включающий введение субъекту соединения по любому из вариантов осуществления 1-21, модифицированного олигонуклеотида по любому из вариантов осуществления 22-29 или фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 30-34.

Вариант осуществления 37. Способ по варианту осуществления 36, где у субъекта имеется заболевание, связанное с miR-17.

Вариант осуществления 38. Способ лечения поликистозной болезни почек, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения, содержащего модифицированный олигонуклеотид, в котором модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру в ориентации от 5' к 3':



где каждый N'' независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид;

p составляет от 0 до 14; при этом, если p не равно 0, последовательность азотистых оснований (N'') _p комплементарна части равной длины последовательности азотистых оснований miR-17;

каждый N из (N) _r независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а последовательность азотистых оснований (N) _r представляет собой 5'-AGCACUUU-3';

N' представляет собой нуклеозид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент;

q равно 0 или 1; при этом, если q равно 1, азотистое основание N' представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; и

каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина; или его фармацевтически приемлемая соль.

Вариант осуществления 39. Способ по варианту осуществления 38, где структура $(N)_F$ представляет собой:



где нуклеозиды, за которыми следует индекс «M», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды;

нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды; и нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой нуклеозиды S-cEt.

Вариант осуществления 40. Способ по варианту осуществления 38 или варианту осуществления 39, где по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 41. Способ по любому из вариантов осуществления 38-40, где каждая межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

Вариант осуществления 42. Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где q представляет собой 1.

Вариант осуществления 43. Способ по любому из вариантов осуществления 38-41, где q представляет собой 0.

Вариант осуществления 44. Способ по любому из вариантов осуществления 38-43, где p представляет собой 0.

Вариант осуществления 45. Способ по любому из вариантов осуществления 38-43, где p выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

Вариант осуществления 46. Способ по варианту осуществления 45, где последовательность азотистых оснований $(N'')_p$ имеет не более одного несовпадения с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1).

Вариант осуществления 47. Соединение по варианту осуществления 45, где последовательность азотистых оснований $(N'')_p$ не имеет несовпадений с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1).

Вариант осуществления 48. Соединение по варианту осуществления 47, где последовательность азотистых оснований $(N'')_p$ выбрана из CUACCUGCACUGUA (SEQ ID NO: 7), CUACCUGCACUGU (SEQ ID NO: 8), CUACCUGCACUG (SEQ ID NO: 9), CUACCUGCACU (SEQ ID NO: 10), CUACCUGCAC (SEQ ID NO: 11), CUACCUGCA, CUACCUGC, CUACCUG, CUACCU, CUACC, CUAC, CUA, CU и C.

Вариант осуществления 49. Способ по любому из вариантов осуществления 38-42 или 44-48, где азотистое основание N' представляет собой пуриновое азотистое основание, не имеющее акцептора водородной - связи в положении 6.

Вариант осуществления 50. Способ по варианту осуществления 49, где азотистое основание N' выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

Вариант осуществления 51. Способ по любому из вариантов осуществления 38-50, где сахарный фрагмент N' не представляет собой 2'-О-метиловый сахар.

Вариант осуществления 52. Соединение по любому из вариантов осуществления 38-51, где сахарный фрагмент N' представляет собой 2'-О-метоксиэтиловый сахар или сахар S-cEt.

Вариант осуществления 53. Способ по варианту осуществления 39, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_SA_S-3', и каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

Вариант осуществления 54. Способ по варианту осуществления 39, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_SU_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

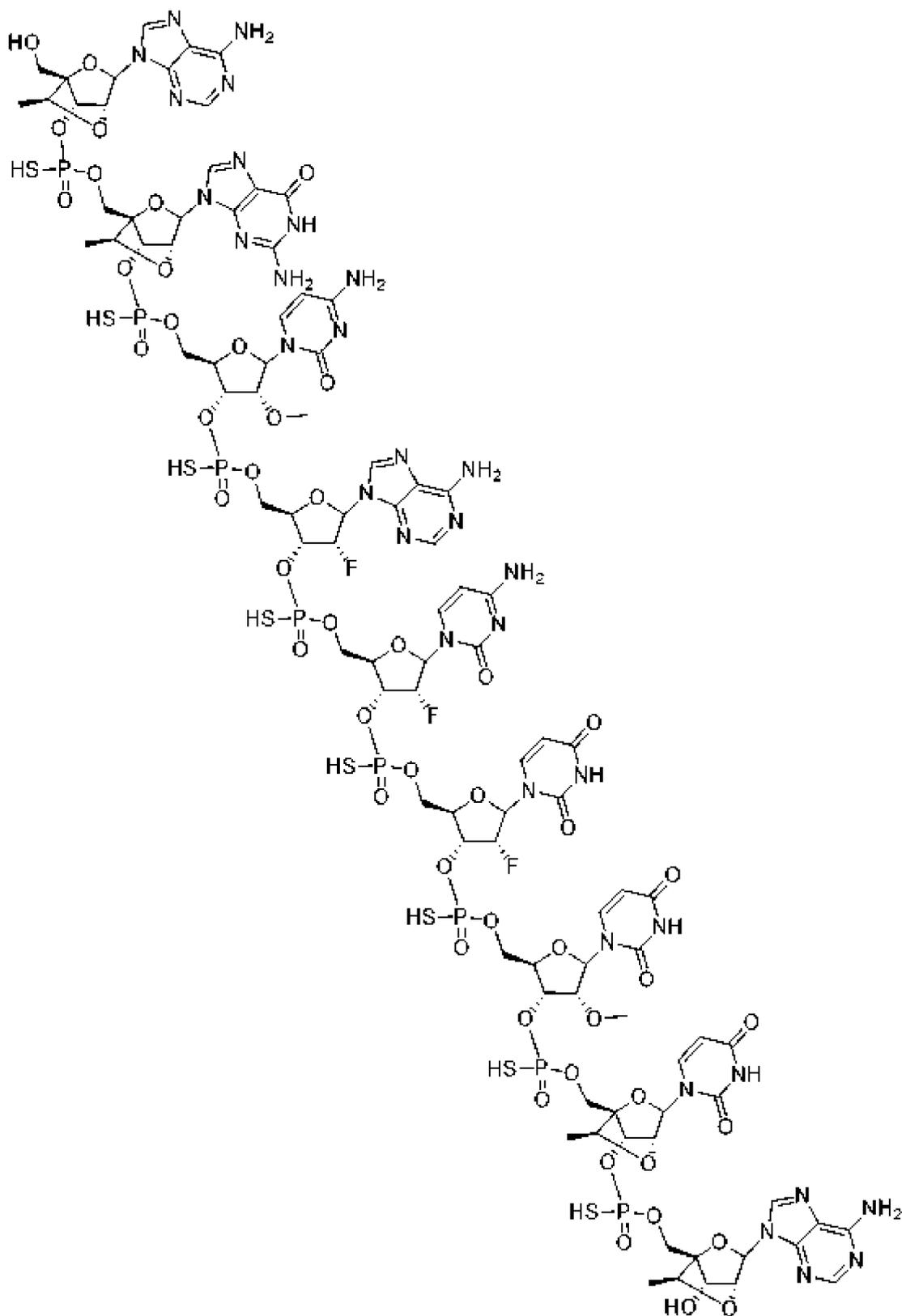
Вариант осуществления 55. Способ по варианту осуществления 39, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_SC_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

Вариант осуществления 56. Способ по варианту осуществления 39, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

Вариант осуществления 57. Способ по любому из вариантов осуществления 38-56, где соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида.

Вариант осуществления 58. Способ по любому из вариантов осуществления 38-57, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

Вариант осуществления 59. Способ лечения поликистозной болезни почек, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, модифицированного олигонуклеотида, имеющего структуру:



или его фармацевтически приемлемой соли.

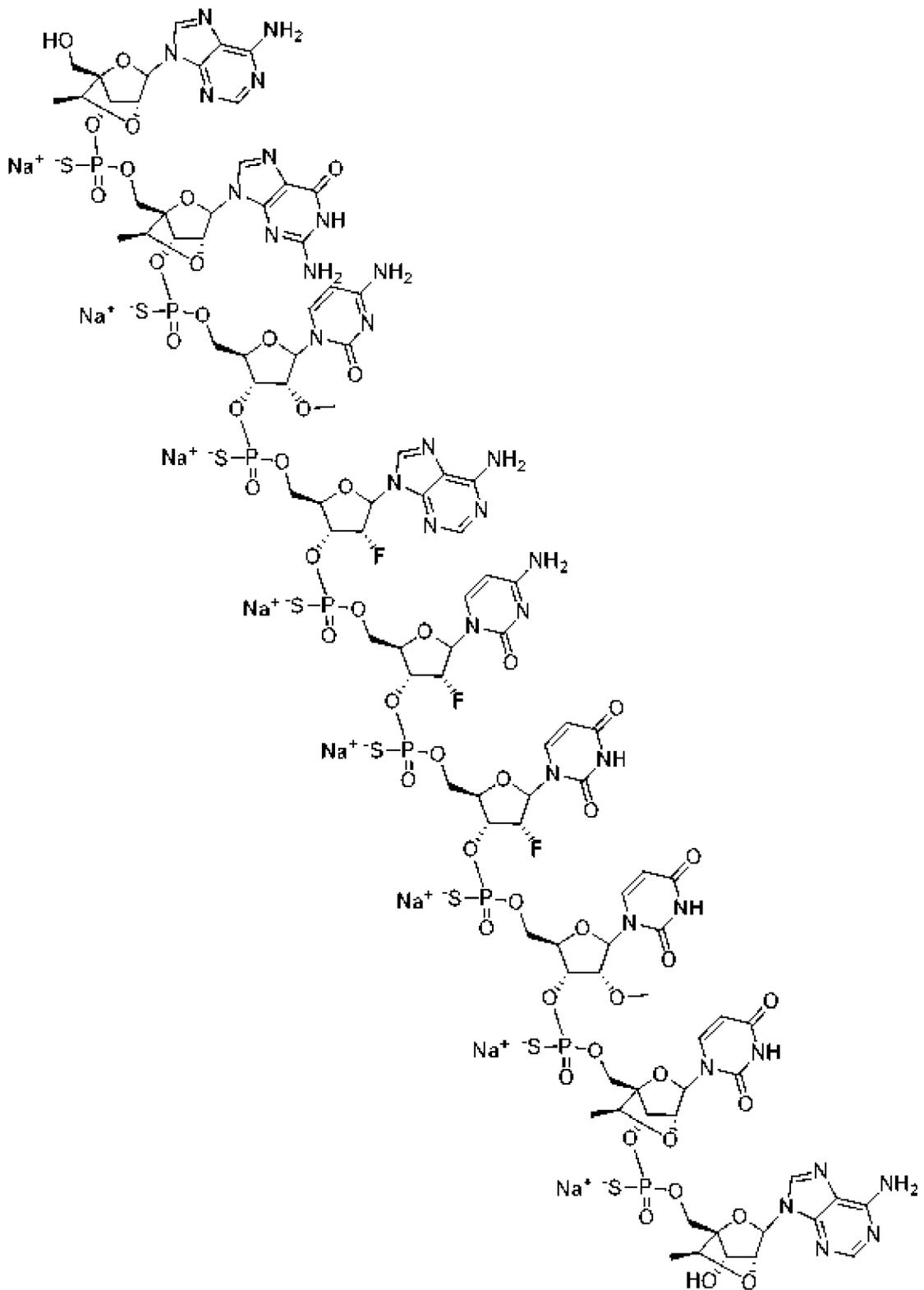
Вариант осуществления 60. Способ по варианту осуществления 59, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

Вариант осуществления 61. Способ по варианту осуществления 60, где модифицированный олигонуклеотид присутствует в фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый разбавитель.

Вариант осуществления 62. Способ по варианту осуществления 61, где фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой стерильный водный раствор.

Вариант осуществления 63. Способ по варианту осуществления 62, где стерильный водный раствор представляет собой солевой раствор.

Вариант осуществления 64. Способ лечения поликистозной болезни почек, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, модифицированного олигонуклеотида, имеющего структуру:



Вариант осуществления 65. Способ по варианту осуществления 64, где модифицированный олигонуклеотид присутствует в фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый разбавитель.

Вариант осуществления 66. Способ по варианту осуществления 65, где фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой стерильный водный раствор.

Вариант осуществления 67. Способ по варианту осуществления 66, где стерильный

водный раствор представляет собой солевой раствор.

Вариант осуществления 68. Способ по любому из вариантов осуществления 38-67, где у субъекта имеется поликистозная болезнь почек.

Вариант осуществления 69. Способ по любому из вариантов осуществления 38-67, где у субъекта имеется подозрение на поликистозную болезнь почек.

Вариант осуществления 70. Способ по любому из вариантов осуществления 38-68, где у субъекта была диагностирована поликистозная болезнь почек с использованием клинических, гистопатологических и/или генетических критериев.

Вариант осуществления 71. Способ по любому из вариантов осуществления 38-70, где у субъекта перед введением соединения, модифицированного олигонуклеотида или фармацевтической композиции был установлен пониженный уровень полицистин-1 (PC1) и/или полицистин-2 (PC2) в почках, моче или крови субъекта.

Вариант осуществления 72. Способ по любому из вариантов осуществления 38-71, где поликистозная болезнь почек является аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек.

Вариант осуществления 73. Способ по любому из вариантов осуществления 38-71, где поликистозная болезнь почек является аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек.

Вариант осуществления 74. Способ по любому из вариантов осуществления 38-73, где у субъекта имеется мутация, выбранная из мутации гена PKD1 или мутации гена PKD2.

Вариант осуществления 75. Способ по любому из вариантов осуществления 38-74, где у субъекта увеличен общий объем почек.

Вариант осуществления 76. Способ по любому из вариантов осуществления 38-75, где у субъекта присутствует гипертензия.

Вариант осуществления 77. Способ по любому из вариантов осуществления 38-76, где у субъекта нарушена функция почек.

Вариант осуществления 78. Способ по любому из вариантов осуществления 38-77, где введение уменьшает общий объем почек у субъекта.

Вариант осуществления 79. Способ по любому из вариантов осуществления 38-78, где введение замедляет скорость увеличения общего объема почек у субъекта.

Вариант осуществления 80. Способ по варианту осуществления 78 или варианту осуществления 79, где общий объем почек представляет собой общий объем почек с поправкой на рост.

Вариант осуществления 81. Способ по любому из вариантов осуществления 38-80, где введение замедляет скорость снижения скорости клубочковой фильтрации у субъекта.

Вариант осуществления 82. Способ по любому из вариантов осуществления 38-81, где введение увеличивает скорость клубочковой фильтрации у субъекта.

Вариант осуществления 83. Способ по варианту осуществления 81 или варианту осуществления 82, где скорость клубочковой фильтрации представляет собой

оцениваемую скорость клубочковой фильтрации.

Вариант осуществления 84. Способ по любому из вариантов осуществления 38-83, где введение замедляет увеличение роста кист в почках и/или печени субъекта.

Вариант осуществления 85. Способ по любому из вариантов осуществления 38-84, где введение:

- улучшает функцию почек у субъекта;
- задерживает ухудшение функции почек у субъекта;
- уменьшает боль в почках у субъекта;
- замедляет усиление боли в почках у субъекта;
- задерживает возникновение боли в почках у субъекта;
- снижает гипертензию у субъекта;
- замедляет ухудшение гипертензии у субъекта;
- задерживает возникновение гипертензии у субъекта;
- уменьшает фиброз в почках субъекта;
- замедляет ухудшение фиброза в почке субъекта;
- задерживает начало терминальной стадии почечной недостаточности у субъекта;
- задерживает время диализа для субъекта;
- задерживает время трансплантации почки для субъекта; и/или
- увеличивает продолжительность жизни субъекта.

Вариант осуществления 86. Способ по любому из вариантов осуществления 38-85, где введение:

- снижает альбуминурию у субъекта;
- замедляет ухудшение альбуминурии у субъекта;
- задерживает возникновение альбуминурии у субъекта;
- снижает гематурию у субъекта;
- замедляет ухудшение гематурии у субъекта;
- задерживает возникновение гематурии у субъекта;
- снижает уровень азота мочевины в крови у субъекта;
- снижает уровень креатинина в сыворотке у субъекта;
- улучшает клиренс креатинина у субъекта;
- снижает соотношение альбумин:креатинин у субъекта;
- повышает полицистин-1 (PC1) в моче субъекта;
- повышает полицистин-2 (PC2) в моче субъекта;
- снижает белок липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), в моче субъекта; и/или
- снижает белок молекулы повреждения почек-1 (KIM-1) в моче субъекта.

Вариант осуществления 87. Способ по одному из вариантов осуществления 38-86, включающий:

- определение общего объема почек у субъекта;
- определение гипертензии у субъекта;

определение боли в почках у субъекта;
определение полицистин-1 (PC1) в моче субъекта;
определение полицистин-2 (PC2) в моче субъекта;
определение фиброза в почке субъекта;
определение уровня азота мочевины в крови у субъекта;
определение уровня креатинина в сыворотке у субъекта;
определение клиренса креатинина у субъекта;
определение альбуминурии у субъекта;
определение соотношения альбумин:креатинин у субъекта;
определение скорости клубочковой фильтрации у субъекта;
определение белка липокалина, связанного с желатиназой нейтрофилов (NGAL), в моче субъекта; и/или
определение белка молекулы повреждения почек-1 (KIM-1) в моче субъекта.

Вариант осуществления 88. Способ по любому из вариантов осуществления 38-87, включающий введение по меньшей мере одной дополнительной терапии, причем по меньшей мере одна дополнительная терапия представляет собой антигипертензивное средство.

Вариант осуществления 89. Способ по любому из вариантов осуществления 38-87, включающий введение по меньшей мере одной дополнительной терапии, выбранной из ингибитора ангиотензинпревращающего фермента II (ACE), блокатора рецепторов ангиотензина II (ARB), диуретика, блокатора кальциевых каналов, ингибитора киназы, антагониста адренергических рецепторов, вазодилататора, бензодиазепина, ингибитора ренина, антагониста рецепторов альдостерона, блокатора рецепторов эндотелина, ингибитора рапамицина (mTOR) для млекопитающих, аналога гормона, антагониста рецептора адиуретина 2, антагониста рецепторов альдостерона, ингибитора глюкозилцерамидсинтазы, антигиперлипидемического агента, диализа и трансплантации почки.

Вариант осуществления 90. Способ по варианту осуществления 89, где ингибитор ангиотензинпревращающего фермента II (ACE) выбран из каптоприла, эналаприла, лизиноприла, беназеприла, хинаприла, фозиноприла и рамиприла.

Вариант осуществления 91. Способ по варианту осуществления 89, где блокатор рецепторов ангиотензина II (ARB) выбран из кандесартана, ирбесартана, олмесартана, лозартана, валсартана, телмисартана и эпросартана.

Вариант осуществления 92. Способ по варианту осуществления 89, где антагонист рецептора адиуретина 2 представляет собой толваптан.

Вариант осуществления 93. Способ по варианту осуществления 89, где антагонист рецепторов альдостерона представляет собой спиронолактон.

Вариант осуществления 94. Способ по варианту осуществления 89, где ингибитор киназы выбран из босутиниба и KD019.

Вариант осуществления 95. Способ по варианту осуществления 89, где ингибитор

mTOR выбран из эверолимуса, рапамицина и сиролимуса.

Вариант осуществления 96. Способ по варианту осуществления 89, где аналог гормона выбран из соматостатина и адренокортикотропного гормона.

Вариант осуществления 97. Способ по варианту осуществления 89, где ингибитор глюкозилцерамидсинтазы представляет собой венглустат.

Вариант осуществления 98. Способ по варианту осуществления 89, где антигипергликемическое средство представляет собой метформин.

Вариант осуществления 99. Способ по любому из вариантов осуществления 38-96, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения.

Вариант осуществления 100. Способ по любому из вариантов осуществления 38-99, где субъект представляет собой субъекта-человека.

Вариант осуществления 101. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, причем модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру в ориентации от 5' к 3':



где каждый N'' независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид;

p составляет от 0 до 14; при этом, если p не равно 0, последовательность азотистых оснований $(N'')_p$ комплементарна части равной длины последовательности азотистых оснований miR-17;

каждый N из $(N)_r$ независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а последовательность азотистых оснований $(N)_r$ представляет собой 5'-AGCACUUU-3';

N' представляет собой нуклеозид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент;

q равно 0 или 1; при этом, если q равно 1, азотистое основание N' представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; и

каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина; или его фармацевтически приемлемая соль, для применения в терапии.

Вариант осуществления 102. Соединение по варианту осуществления 101, где терапия заключается в лечении поликистозной болезни почек.

Вариант осуществления 103. Соединение по варианту осуществления 102, где поликистозная болезнь почек является аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек (ADPKD).

Вариант осуществления 104. Соединение по варианту осуществления 102, где поликистозная болезнь почек является аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек (ARPKD).

Вариант осуществления 105. Соединение по любому из вариантов осуществления

1-22, модифицированный олигонуклеотид по любому из вариантов осуществления 23-29 или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 30-33 для применения в терапии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0005] **Фигура 1.** Пуриновые структуры азотистых оснований.

[0006] **Фигуры 2A-2C.** Эффективность RG-NG-1015 в модели *Pkd1-F/RC* PKD. Влияние лечения на (2A) соотношение массы почек и тела, (2B) уровень азота мочевины в крови (АМК) и (2C) уровень креатинина в крови.

[0007] **Фигура 3.** Исследование максимально переносимой дозы (MTD) и сравнительная оценка дозы RG-NG-1001, RGLS4326 и RG-NG-1017. Самцам мышей C57BL/6J в возрасте 6-7 недель вводили однократную интрацеребровентрикулярную (ICV) инъекцию RG-NG-1001 и RGLS4326 (олигонуклеотиды антитела к miR-17, которые ингибируют AMPA-R) и RG-NG-1017 (олигонуклеотиды антитела к miR-17, которые не ингибируют AMPA-R; RG-NG-1017) при различных уровнях дозы в объеме 4 мкл и под наблюдением в течение 7 дней. Смертность мышей указана для трех различных соединений в разных дозах.

[0008] **Фигуры 4A-4F.** Представлена оценка активности RG-NG-1015 и RGLS4326 в отношении активности люциферазных сенсоров miR-17 (4A), miR-20a (4B), miR-93 (4C) и miR106(a) (4D) в клетках HeLa in vitro. Представлена оценка активности RG-NG-1015 и RGLS4326 в отношении люциферазных сенсоров, содержащих полную 3'-нетранслируемую область (UTR) генов прямой мишени miR-17 PKD1 (4E) и PKD2 (4F).

[0009] **Фигуры 5A-5D.** Были измерены фармакокинетика и взаимодействие с мишенью (по измерениям с помощью miPSA) RGLS4326 и RG-NG-1015 после однократного подкожного введения мышам C57BL6. Показаны концентрация в плазме (5A), концентрация в тканях (5B), связывание с мишенью в почках (5C) и связывание с мишенью в печени (5D).

[00010] **Фигуры 6A-6E.** Определяли воздействие RG-NG-1015 в различных дозировках и схемах лечения, а также в комбинации с толваптаном на мышинной модели PKD *Pcy/DBA*. График дозирования показан на фигуре 6A, а пояснения к графикам на фигурах 6C-6E показаны на фигуре 6B. Показаны масса почки/масса тела (6C), площадь кисты (%) (6D) и *Ngal/Cr* мочи (6E). Величины ошибок представляют собой стандартные отклонения. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,001$, (ns) $p > 0,05$ по сравнению с группой, получавшей носитель *Pcy*; критерий множественного сравнения одностороннего дисперсионного анализа Бонферрони. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,001$, (ns) $p > 0,05$ по сравнению с группой, получавшей только толваптан; критерий множественного сравнения одностороннего дисперсионного анализа Садика. \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$, \$\$\$\$ $p < 0,001$, (ns) $p > 0,05$ по сравнению с группой, получавшей только RG-NG-1015 с подобранной дозой; критерий множественного сравнения одностороннего дисперсионного анализа Садика

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00011] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит изобретение. Если не даны конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с описанными в данном документе процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии, медицинской и фармацевтической химии, хорошо известна и широко используется в данной области техники. В случае наличия нескольких определений терминов в данном разделе преимущественную силу имеют определения, приведенные в этом разделе. Стандартные методы могут использоваться для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки, а также лечения субъектов. Некоторые такие методы и процедуры можно найти, например, в «Carbohydrate Modifications in Antisense Research» Edited by Sanghvi and Cook, American Chemical Society, Washington D.C., 1994; and «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18th edition, 1990; и который включен в настоящий документ посредством ссылки для любых целей. Если это разрешено, все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности GENBANK, веб-сайты и другие опубликованные материалы, упомянутые в настоящем описании, если не указано иное, полностью включены посредством ссылки. Если делается ссылка на URL-адрес или другой подобный идентификатор или адрес, подразумевается, что такие идентификаторы могут меняться, а конкретная информация в Интернете может меняться, но эквивалентную информацию можно найти путем поиска в интернете. Ссылка на них свидетельствует о наличии и публичном распространении такой информации.

[00012] Прежде чем композиции и способы по изобретению будут раскрыты и описаны, следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения. Следует отметить, что при использовании в описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не требует иного.

Определения

[00013] «Поликистозная болезнь почек» или «PKD» представляет собой кистозное заболевание почек, характеризующееся накоплением многочисленных заполненных жидкостью кист в почках. Множественные кисты образуются в по меньшей мере одной почке, что часто приводит к увеличению пораженной почки и прогрессирующей потере функции почек.

[00014] «Маркер поликистозной болезни почек» означает медицинский параметр, который используется для оценки тяжести поликистозной болезни почек, функции почек и/или ответа субъекта, страдающего поликистозной болезнью почек, на лечение. Неограничивающие примеры маркеров поликистозной болезни почек включают общий объем почек, гипертензию, скорость клубочковой фильтрации и боль в почках.

[00015] «Маркер функции почек» означает медицинский параметр, который

используется для оценки функции почек у субъекта. Неограничивающие примеры маркеров функции почек включают скорость клубочковой фильтрации, уровень азота мочевины в крови и уровень креатинина в сыворотке крови.

[00016] «Аутосомно-доминантная поликистозная болезнь почек» или «ADPKD» представляет собой поликистозную болезнь почек, вызванную одной или несколькими генетическими мутациями в гене *PKD1* и/или *PKD2*. 85% ADPKD вызвано мутациями *PKD1*, расположенного на хромосоме 16, при этом большинство остальных случаев ADPKD вызвано мутациями *PKD2*, расположенного на хромосоме 4.

[00017] «Аутосомно-рецессивная поликистозная болезнь почек» или «ARPKD» представляет собой поликистозную болезнь почек, вызванную одной или несколькими генетическими мутациями в гене *PKHD1*, который расположен на хромосоме 6. До 50% новорожденных с ARPKD умирают от осложнений внутриутробного заболевания почек и примерно у трети выживших в течение 10 лет развивается терминальная стадия почечной недостаточности (ESRD).

[00018] «Нефронофтиз» или «NPHP» означает аутосомно-рецессивное кистозное заболевание почек, характеризующееся кортикомедуллярными кистами, разрушением базальной мембраны канальцев и тубулоинтерстициальной нефропатией.

[00019] «Общий объем почек» или «TKV» - это показатель общего объема почек. Общий объем почки может быть определен с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии (КТ) или ультразвукового исследования (УЗИ), а объем рассчитывается с помощью стандартной методологии, такой как уравнение объема эллипсоида (для УЗИ) или с помощью количественной стереологии или отслеживание границ (для КТ/МРТ).

[00020] «Общий объем почек с поправкой на рост» или «HtTKV» - это показатель общего объема почек на единицу роста. У пациентов со значением HtTKV ≥ 600 мл/м прогнозируется развитие хронической болезни почек 3 стадии в течение 8 лет.

[00021] «Боль в почках» означает клинически значимую боль в почках, требующую отпуска по болезни, фармакологического лечения (наркотики или анальгетики в качестве последнего шанса) или инвазивного вмешательства.

[00022] «Ухудшение гипертензии» означает изменение артериального давления, которое требует начала или усиления гипертензивного лечения.

[00023] «Фиброз» означает образование или развитие избыточной волокнистой соединительной ткани в

органе или ткани. В определенных вариантах осуществления фиброз возникает как репаративный или реактивный процесс. В определенных вариантах осуществления фиброз возникает в ответ на повреждение или травму. Термин «фиброз» следует понимать как образование или развитие избыточной волокнистой соединительной ткани в органе или ткани как репаративный или реактивный процесс, в отличие от образования фиброзной ткани как нормальной составляющей органа или ткани.

[00024] «Гематурия» означает наличие эритроцитов в моче.

[00025] «Альбуминурия» означает наличие избытка альбумина в моче и включает, помимо прочего, нормальную альбуминурию, высокую нормальную альбуминурию, микроальбуминурию и макроальбуминурию. В норме барьер проницаемости клубочковой фильтрации, состоящий из подоцитов, клубочковой базальной мембраны и эндотелиальных клеток, предотвращает попадание сывороточного белка в мочу. Альбуминурия может отражать повреждение барьера проницаемости клубочковой фильтрации. Альбуминурию можно рассчитать на основе 24-часовой пробы мочи, ночной пробы мочи или точечной пробы мочи.

[00026] «Высокая нормальная альбуминурия» означает повышенную альбуминурию, характеризующуюся (i) экскрецией от 15 до <30 мг альбумина с мочой за 24 часа и/или (ii) соотношением альбумин/креатинин от 1,25 до <2,5 мг/ммоль (или от 10 до <20 мг/г) у мужчин или от 1,75 до <3,5 мг/ммоль (или от 15 до <30 мг/г) у женщин.

[00027] «Микроальбуминурия» означает повышенную альбуминурию, характеризующуюся (i) экскрецией от 30 до 300 мг альбумина с мочой за 24 часа и/или (ii) соотношением альбумин/креатинин от 2,5 до <25 мг/ммоль (или от 20 до < 200 мг/г) у мужчин или от 3,5 до <35 мг/ммоль (или от 30 до <300 мг/г) у женщин.

[00028] «Макроальбуминурия» означает повышенную альбуминурию, характеризующуюся экскрецией более 300 мг альбумина с мочой за 24 часа и/или (ii) соотношением альбумин/креатинин >25 мг/ммоль (или >200 мг/г) у мужчин или >35 мг/ммоль (или >300 мг/г) у женщин.

[00029] «Соотношение альбумин/креатинин» означает соотношение альбумина мочи (мг/дл) к креатинину мочи (г/дл) и выражается в мг/г. В определенных вариантах осуществления соотношение альбумин/креатинин можно рассчитать на основе разовой пробы мочи и использовать для оценки экскреции альбумина за 24-часовой период.

[00030] «Скорость клубочковой фильтрации» или «GFR» означает скорость потока фильтруемой жидкости через почку и используется в качестве показателя функции почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления GFR субъекта определяется путем расчета оцениваемой скорости клубочковой фильтрации. В определенных вариантах осуществления GFR субъекта измеряется непосредственно у субъекта с использованием метода инулина.

[00031] «Оцениваемая скорость клубочковой фильтрации» или «eGFR» означает измерение того, насколько хорошо почки фильтруют креатинин, и используется для приблизительной оценки скорости клубочковой фильтрации. Поскольку прямое измерение GFR является сложным, в клинической практике часто используется eGFR. Нормальные результаты могут находиться в диапазоне 90-120 мл/мин/1,73 м². Уровни ниже 60 мл/мин/1,73 м² в течение 3 и более месяцев могут быть индикатором хронического заболевания почек. Уровни ниже 15 мл/мин/1,73 м² могут быть показателем почечной недостаточности.

[00032] «Протеинурия» означает наличие избытка сывороточных белков в моче. Протеинурия может характеризоваться выделением > 250 мг белка с мочой за 24 часа

и/или отношением белка в моче к креатинину $\geq 0,20$ мг/мг. Сывороточные белки, повышенные в связи с протеинурией, включают, помимо прочего, альбумин.

[00033] «Уровень азота мочевины в крови» или «уровень АМК» означает меру количества азота в крови в форме мочевины. Печень производит мочевину в цикле мочевины как побочный продукт переваривания белка, а мочевина удаляется из крови почками. Здоровая кровь взрослого человека может содержать от 7 до 21 мг азота мочевины на 100 мл (7-21 мг/дл) крови. Измерение уровня азота мочевины в крови используется как показатель здоровья почек. Если почки не могут нормально удалять мочевину из крови, уровень АМК у субъекта повышается.

[00034] «Повышенный» означает увеличение медицинского параметра, который считается клинически значимым. Медицинский работник может определить, является ли увеличение клинически значимым.

[00035] «Терминальная хроническая почечная недостаточность (ESRD)» означает полную или почти полную недостаточность функции почек.

[00036] «Качество жизни» означает степень, в которой физическое, психологическое и социальное функционирование субъекта нарушено заболеванием и/или лечением заболевания. Качество жизни может снижаться у пациентов с поликистозной болезнью почек.

[00037] «Нарушение функции почек» означает снижение функции почек по сравнению с нормальной функцией почек.

[00038] «Замедлять ухудшение» и «медленное ухудшение» означают снижение скорости, с которой заболевание переходит в запущенное состояние.

[00039] «Время отсрочки диализа» означает поддержание достаточной функции почек, чтобы отсрочить необходимость в диализном лечении.

[00040] «Время отсрочки трансплантации почки» означает поддержание достаточной функции почек, чтобы отсрочить необходимость в трансплантации почки.

[00041] «Улучшает продолжительность жизни» означает удлинение жизни субъекта путем лечения одного или нескольких симптомов заболевания у субъекта.

[00042] «Субъект» означает человека или животное, отличающееся от человека, выбранное для лечения или терапии.

[00043] «Субъект, нуждающийся в этом» означает субъект, который идентифицирован как нуждающийся в терапии или лечении.

[00044] «Субъект с подозрением на наличие заболевания» означает субъект, у которого проявляются один или несколько клинических показателей заболевания.

[00045] «Заболевание, связанное с miR-17» означает заболевание или состояние, которое модулируется активностью одного или нескольких членов семейства miR-17.

[00046] «Введение» означает предоставление фармацевтического агента или композиции субъекту и включает, помимо прочего, введение медицинским работником и самостоятельное введение.

[00047] «Парентеральное введение» означает введение посредством инъекции или

инфузии.

Парентеральное введение включает, помимо прочего, подкожное введение, внутривенное введение и внутримышечное введение.

[00048] «Подкожное введение» означает введение непосредственно под кожу.

[00049] «Внутривенное введение» означает введение в вену.

[00050] «Одновременное введение» относится к одновременному введению двух или более агентов любым способом, при котором фармакологические эффекты обоих проявляются у пациента одновременно. Одновременное введение не требует введения обоих агентов в одной фармацевтической композиции, в одной и той же лекарственной форме или одним и тем же путем введения. Эффекты обоих агентов не обязательно должны проявляться одновременно. Эффекты должны перекрываться только в течение определенного периода и не обязательно быть одинаковыми.

[00051] «Продолжительность» означает период, в течение которого продолжается деятельность или событие. В определенных вариантах осуществления продолжительность лечения представляет собой период, в течение которого вводятся дозы фармацевтического агента или фармацевтической композиции.

[00052] «Терапия» означает способ лечения заболевания. В определенных вариантах осуществления терапия включает, помимо прочего, введение одного или более фармацевтических агентов субъекту, страдающему заболеванием.

[00053] «Лечить» означает применять одну или несколько конкретных процедур, используемых для улучшения по меньшей мере одного показателя заболевания. В определенных вариантах осуществления конкретной процедурой является введение одного или более фармацевтических агентов. В определенных вариантах осуществления лечение PKD включает, помимо прочего, уменьшение общего объема почек, улучшение функции почек, снижение гипертензии и/или уменьшение боли в почках.

[00054] «Облегчить» означает уменьшить тяжесть по меньшей мере одного показателя состояния или заболевания. В определенных вариантах осуществления изобретения улучшение включает задержку или замедление прогрессирования одного или нескольких индикаторов состояния или заболевания. Серьезность индикаторов может быть определена с помощью субъективных или объективных показателей, известных специалистам в данной области техники.

[00055] «В группе риска развития» означает состояние, при котором субъект предрасположен к развитию состояния или заболевания. В определенных вариантах осуществления у субъекта, подверженного риску развития состояния или заболевания, проявляется один или несколько симптомов состояния или заболевания, но не проявляется достаточного количества симптомов для диагностики состояния или заболевания. В определенных вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития состояния или заболевания, проявляет один или несколько симптомов состояния или заболевания, но в меньшей степени требуется диагностировать это состояние или заболевание.

[00056] «Предотвратить возникновение» означает предотвратить развитие состояния или заболевания у субъекта, который подвержен риску развития заболевания или состояния. В определенных вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития заболевания или состояния, получает лечение, аналогичное лечению, получаемому субъектом, у которого уже имеется заболевание или состояние.

[00057] «Отсрочка начала» означает задержку развития состояния или заболевания у субъекта, который подвержен риску развития заболевания или состояния. В определенных вариантах осуществления субъект, подверженный риску развития заболевания или состояния, получает лечение, аналогичное лечению, получаемому субъектом, у которого уже имеется заболевание или состояние.

[00058] «Доза» означает определенное количество фармацевтического агента, введенное за один прием. В определенных вариантах осуществления доза может вводиться в виде двух или более болюсов, таблеток или инъекций. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения, где подкожное введение является желательным, для обеспечения желаемой дозы требуется объем, который не помещается в одной инъекции. В таких вариантах осуществления для достижения желаемой дозы можно использовать две или более инъекции. В определенных вариантах осуществления доза может быть введена за две или несколько инъекций, чтобы свести к минимуму реакцию в месте инъекции у человека. В определенных вариантах осуществления дозу вводят в виде медленной инфузии.

[00059] «Единица дозы» означает форму, в которой предоставляется фармацевтический агент. В определенных вариантах осуществления единица дозирования представляет собой флакон, содержащий лиофилизированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления единица дозирования представляет собой флакон, содержащий восстановленный олигонуклеотид.

[00060] «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству фармацевтического агента, которое обеспечивает терапевтическую пользу животному.

[00061] «Фармацевтическая композиция» означает смесь веществ, пригодную для введения индивидууму, которая включает фармацевтический агент. Например, фармацевтическая композиция может содержать стерильный водный раствор.

[00062] «Фармацевтический агент» означает вещество, которое обеспечивает терапевтический эффект при введении субъекту.

[00063] «Активный фармацевтический ингредиент» означает вещество в фармацевтической композиции, которое обеспечивает желаемый эффект.

[00064] «Фармацевтически приемлемая соль» означает физиологически и фармацевтически приемлемую соль соединения, представленного в настоящем документе, *т.е.* соль, которая сохраняет желаемую биологическую активность соединения и не оказывает нежелательных токсикологических эффектов при введении субъекту. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей соединений, представленных в настоящем документе, включают формы солей натрия и калия.

Термины «соединение», «олигонуклеотид» и «модифицированный олигонуклеотид», используемые в настоящем документе, включают их фармацевтически приемлемые соли, если конкретно не указано иное.

[00065] «Солевой раствор» означает раствор хлорида натрия в воде.

[00066] «Улучшение функции органа» означает изменение функции органа в сторону нормальных пределов. В определенных вариантах осуществления функция органа оценивается путем измерения молекул, обнаруженных в крови или моче субъекта. Например, в определенных вариантах осуществления улучшение функции почек определяется снижением уровня азота мочевины в крови, уменьшением протеинурии, уменьшением альбуминурии и т. д.

[00067] «Приемлемый профиль безопасности» означает набор побочных эффектов, находящийся в клинически приемлемых пределах.

[00068] «Побочный эффект» означает физиологический ответ, вызванный лечением, отличным от желаемого эффекта. В определенных вариантах осуществления побочные эффекты включают, помимо прочего, реакции в месте инъекции, отклонения функциональных проб печени, нарушения функции почек, печеночную токсичность, почечную токсичность, аномалии центральной нервной системы и миопатии. Такие побочные эффекты могут быть обнаружены прямо или косвенно. Например, повышение уровня аминотрансфераз в сыворотке крови может указывать на печеночную токсичность или нарушение функции печени. Например, повышенный билирубин может указывать на печеночную токсичность или нарушение функции печени.

[00069] Термин «кровь», используемый в настоящем документе, охватывает цельную кровь и фракции крови, такие как сыворотка и плазма.

[00070] «Антитело к miR» означает олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований, комплементарную микроРНК. В определенных вариантах осуществления антитело к miR представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

[00071] «Антитело к miR-17» означает модифицированный олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований, комплементарную одному или нескольким членам семейства miR-17. В определенных вариантах осуществления антитело к miR-17 полностью комплементарно (т.е. на 100% комплементарно) одному или нескольким членам семейства miR-17. В определенных вариантах осуществления антитело к miR-17 на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% комплементарно одному или нескольким членам семейства miR-17.

[00072] «miR-17» означает зрелую микроРНК, имеющую последовательность азотистых оснований 5'-CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 1).

[00073] «miR-20a» означает зрелую микроРНК, имеющую последовательность азотистых оснований 5'-UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 2).

[00074] «miR-20b» означает зрелую микроРНК, имеющую последовательность азотистых оснований 5'-CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 3).

[00075] «miR-93» означает зрелую микроРНК, имеющую последовательность азотистых оснований 5'-CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 4).

[00076] «miR-106a» означает зрелую микроРНК, имеющую последовательность азотистых оснований 5'-AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG-3' (SEQ ID NO: 5).

[00077] «miR-106b» означает зрелую микроРНК, имеющую последовательность азотистых оснований 5'-UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU-3' (SEQ ID NO: 6).

[00078] «Затравочная последовательность miR-17» означает последовательность азотистых оснований 5'-AAAGUG-3', которая присутствует в каждом из членов семейства miR-17.

[00079] «Член семейства miR-17» означает зрелую микроРНК, имеющую последовательность азотистых оснований, содержащую затравочную последовательность miR-17, и которая выбрана из miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a и miR-106b.

[00080] «Семейство miR-17» означает следующую группу микроРНК: miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a и miR-106b, каждая из которых имеет последовательность азотистых оснований, содержащую затравочную последовательность miR-17.

[00081] «Целевая нуклеиновая кислота» означает нуклеиновую кислоту, с которой олигомерное соединение предназначено для гибридизации.

[00082] «Нацеливание» означает процесс конструирования и выбора последовательности азотистых оснований, которая будет гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой.

[00083] «Нацеленный на» означает наличие последовательности азотистых оснований, которая обеспечивает гибридизацию с целевой нуклеиновой кислотой.

[00084] «Модуляция» означает нарушение функции, количества или активности. В определенных вариантах осуществления модуляция означает увеличение функции, количества или активности. В определенных вариантах осуществления модуляция означает снижение функции, количества или активности.

[00085] «Экспрессия» означает любые функции и этапы, с помощью которых закодированная геном информация преобразуется в структуры, присутствующие и действующие в клетке.

[00086] «Последовательность азотистых оснований» означает порядок смежных азотистых оснований в олигомерном соединении или нуклеиновой кислоте, обычно перечисленный в ориентации от 5' к 3' и не зависящий от каких-либо модификаций сахара, связи и/или азотистых оснований.

[00087] «Смежные азотистые основания» означают азотистые основания, непосредственно примыкающие друг к другу в нуклеиновой кислоте.

[00088] «Комплементарность азотистых оснований» означает способность двух азотистых оснований образовывать нековалентные пары посредством водородных связей.

[00089] «Комплементарный» означает, что одна нуклеиновая кислота способна гибридизоваться с другой нуклеиновой кислотой или олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления комплементарный относится к олигонуклеотиду, способному

гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой.

[00090] «Полностью комплементарный» означает, что каждое азотистое основание олигонуклеотида способно спариваться с азотистым основанием в каждом соответствующем положении целевой нуклеиновой кислоты. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид полностью комплементарен (также называемый 100% комплементарным) микроРНК, т.е. каждое азотистое основание олигонуклеотида комплементарно азотистому основанию в соответствующем положении микроРНК. Модифицированный олигонуклеотид может быть полностью комплементарен микроРНК и иметь количество связанных нуклеозидов, меньшее длины микроРНК. Например, олигонуклеотид с 16 связанными нуклеозидами, где каждое азотистое основание олигонуклеотида комплементарно азотистому основанию в соответствующем положении микроРНК, полностью комплементарен микроРНК. В определенных вариантах осуществления олигонуклеотид, в котором каждое азотистое основание комплементарно азотистому основанию в области последовательности "стебель-петля" микроРНК, полностью комплементарен последовательности "стебель-петля" микроРНК.

[00091] «Процент комплементарности» означает процент азотистых оснований олигонуклеотида, которые комплементарны участку равной длины целевой нуклеиновой кислоты. Процент комплементарности рассчитывают путем деления числа азотистых оснований олигонуклеотида, которые комплементарны азотистым основаниям в соответствующих положениях целевой нуклеиновой кислоты, на общее количество азотистых оснований в олигонуклеотиде.

[00092] «Процент идентичности» означает количество азотистых оснований в первой нуклеиновой кислоте, которые идентичны азотистым основаниям в соответствующих положениях во второй нуклеиновой кислоте, деленное на общее количество азотистых оснований в первой нуклеиновой кислоте. В определенных вариантах осуществления первая нуклеиновая кислота представляет собой микроРНК, а вторая нуклеиновая кислота представляет собой микроРНК. В определенных вариантах осуществления первая нуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид, а вторая нуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид.

[00093] «Гибридизация» означает отжиг комплементарных нуклеиновых кислот, который происходит за счет комплементарности азотистых оснований.

[00094] «Несоответствие» означает азотистое основание первой нуклеиновой кислоты, которое не способно к спариванию по Уотсону-Крику с азотистым основанием в соответствующем положении второй нуклеиновой кислоты.

[00095] «Идентичный» в контексте последовательностей азотистых оснований означает наличие одинаковой последовательности азотистых оснований, независимо от модификаций сахара, связи и/или азотистых оснований и независимо от состояния метилирования любых присутствующих пиримидинов.

[00096] «МикроРНК» означает эндогенную некодирующую РНК длиной от 18 до 25 азотистых оснований, которая является продуктом расщепления пре-микроРНК

ферментом Dicer. Примеры зрелых микроРНК можно найти в базе данных микроРНК, известной как miRBase (microrna.sanger.ac.uk/). В определенных вариантах осуществления микроРНК сокращенно обозначается как «miR».

[00097] «Транскрипт, регулируемый микроРНК» означает транскрипт, который регулируется микроРНК.

[00098] «Затравочная последовательность соответствия» означает последовательность азотистых оснований, которая комплементарна затравочной последовательности и имеет ту же длину, что и затравочная последовательность.

[00099] «Олигомерное соединение» означает соединение, которое содержит множество связанных мономерных субъединиц. Олигомерные соединения включают олигонуклеотиды.

[000100] «Олигонуклеотид» означает соединение, содержащее множество связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицирован или немодифицирован независимо друг от друга.

[000101] «Встречающаяся в природе межнуклеозидная связь» означает 3'-5'-фосфодизфирную связь между нуклеозидами.

[000102] «Природный сахар» означает сахар, содержащийся в ДНК (2'-Н) или РНК (2'-ОН).

[000103] «Межнуклеозидная связь» означает ковалентную связь между смежными нуклеозидами.

[000104] «Связанные нуклеозиды» означают нуклеозиды, соединенные ковалентной связью.

[000105] «Азотистое основание» означает гетероциклическую группу, способную к нековалентному спариванию с другим азотистым основанием.

[000106] «Нуклеозид» означает азотистое основание, связанное с сахарным фрагментом.

[000107] «Нуклеотид» означает нуклеозид, имеющий фосфатную группу, ковалентно связанную с сахарной частью нуклеозида.

[000108] «Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, состоящий из» ряда связанных нуклеозидов, означает соединение, которое включает модифицированный олигонуклеотид, имеющий указанное количество связанных нуклеозидов. Таким образом, соединение может включать дополнительные заместители или конъюгаты. Если не указано иное, модифицированный олигонуклеотид не гибридизуется с комплементарной цепью, и соединение не включает никаких дополнительных нуклеозидов, помимо нуклеозидов модифицированного олигонуклеотида.

[000109] «Модифицированный олигонуклеотид» означает одноцепочечный олигонуклеотид, имеющий одну или несколько модификаций относительно встречающегося в природе конца, сахара, азотистого основания и/или межнуклеозидной связи. Модифицированный олигонуклеотид может содержать немодифицированные

нуклеозиды.

[000110] «Модифицированный нуклеозид» означает нуклеозид, имеющий какие-либо изменения по сравнению с встречающимся в природе нуклеозидом. Модифицированный нуклеозид может содержать модифицированный сахар и немодифицированное азотистое основание. Модифицированный нуклеозид может содержать модифицированный сахар и модифицированное азотистое основание. Модифицированный нуклеозид может содержать природный сахар и модифицированное азотистое основание. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой бициклический нуклеозид. В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой небциклический нуклеозид.

[000111] «Модифицированная межнуклеозидная связь» означает любое изменение встречающейся в природе межнуклеозидной связи.

[000112] «Тиофосфатная межнуклеозидная связь» означает связь между нуклеозидами, где одним из немоستيковых атомов является атом серы.

[000113] «Модифицированный сахарный фрагмент» означает замену и/или любое изменение природного сахара.

[000114] «Немодифицированное азотистое основание» означает встречающиеся в природе гетероциклические основания РНК или ДНК: пуриновые основания аденин (А) и гуанин (G), а также пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (С) (включая 5-метилцитозин) и урацил (U).

[000115] «5-метилцитозин» означает цитозин, содержащий метильную группу, присоединенную к 5-му положению.

[000116] «Неметилованный цитозин» означает цитозин, который не имеет метильной группы, присоединенной к 5-му положению.

[000117] «Модифицированное азотистое основание» означает любое азотистое основание, которое не является немодифицированным азотистым основанием.

[000118] «Сахарный фрагмент» означает встречающийся в природе фуранозил или модифицированный сахарный фрагмент.

[000119] «Модифицированный сахарный фрагмент» означает замещенный сахарный фрагмент или заменитель сахара.

[000120] «2'-О-метиловый сахар» или «2'-ОМе сахар» означает сахар, имеющий О-метиловую модификацию в 2'-положении.

[000121] «2'-О-метоксиэтиловый сахар» или «2'-МОЕ сахар» означает сахар, имеющий О-метоксиэтильную модификацию в 2'-положении.

[000122] «2'-фтор» или «2'-F» означает сахар, имеющий фтормодификацию 2'-положения.

[000123] «Бициклический сахарный фрагмент» означает модифицированный сахарный фрагмент, содержащий 4-7-членное кольцо (включая, помимо прочего, фуранозил), содержащий мостик, соединяющий два атома 4-7-членного кольца с

образованием второго кольца, что приводит к бициклической структуре. В определенных вариантах осуществления 4-7-членное кольцо представляет собой сахарное кольцо. В определенных вариантах осуществления 4-7-членное кольцо представляет собой фуранозил. В определенных таких вариантах осуществления мостик соединяет 2'-углерод и 4'-углерод фуранозила. Неограничивающие примеры бициклических сахарных фрагментов включают LNA, ENA, cEt, S-cEt и R-cEt.

[000124] «Сахарный фрагмент заблокированной нуклеиновой кислоты (LNA)» означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий мостик $(\text{CH}_2)\text{-O}$ между 4'- и 2'-атомами фуранозного кольца.

[000125] «Сахарный фрагмент ENA» означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий мостик $(\text{CH}_2)_2\text{-O}$ между 4' и 2' атомами фуранозного кольца.

[000126] «Ограниченный этиловый (cEt) сахарный фрагмент» означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий мостик $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ между 4'- и 2'-атомами фуранозного кольца. В определенных вариантах осуществления $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ -мостик ограничен в S-ориентации. В определенных вариантах осуществления $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ ограничен в R-ориентации.

[000127] «Сахарный фрагмент S-cEt» означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий S-ограниченный мостик $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ между 4'- и 2'-атомами фуранозного кольца.

[000128] «Сахарный фрагмент R-cEt» означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий R-ограниченный мостик $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-O}$ между 4'- и 2'-атомами фуранозного кольца.

[000129] «2'-О-метилнуклеозид» означает 2'-модифицированный нуклеозид, имеющий модификацию 2'-О-метилового сахара.

[000130] «2'-О-метоксиэтилнуклеозид» означает 2'-модифицированный нуклеозид, имеющий модификацию 2'-О-метоксиэтилового сахара. 2'-О-метоксиэтилнуклеозид может содержать модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

[000131] «2'-фторнуклеозид» означает 2'-модифицированный нуклеозид, имеющий модификацию 2'-фторсахара. 2'-фторнуклеозид может содержать модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

[000132] «Бициклический нуклеозид» означает 2'-модифицированный нуклеозид, имеющий бициклический сахарный фрагмент. Бициклический нуклеозид может иметь модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

[000133] «Нуклеозид cEt» означает нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент cEt. Нуклеозид cEt может содержать модифицированное или немодифицированное азотистое основание.

[000134] «Нуклеозид S-cEt» означает нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент S-cEt.

[000135] «Нуклеозид R-cEt» означает нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент R-cEt.

[000136] «β-D-дезоксирибонуклеозид» означает встречающийся в природе нуклеозид ДНК.

[000137] «β-D-рибонуклеозид» означает природный РНК-нуклеозид.

[000138] «Нуклеозид LNA» означает нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент LNA.

[000139] «Нуклеозид ENA» означает нуклеозид, содержащий сахарный фрагмент ENA.

[000140] «Акцептор водородной связи» означает компонент водородной связи, который не поставляет общий атом водорода.

[000141] «Донор водородной связи» означает связь или молекулу, которая поставляет атом водорода водородной связи.

Обзор

[000142] Поликистозная болезнь почек (PKD) представляет собой наследственную форму заболевания почек, при которой в почках развиваются заполненные жидкостью кисты, что приводит к почечной недостаточности и часто к терминальной стадии почечной недостаточности. Некоторые PKD также характеризуются увеличением почек. Чрезмерная пролиферация кист является отличительной патологической особенностью PKD. При лечении PKD основной целью лечения является устранение таких симптомов, как гипертензия и инфекции, поддержание функции почек и предотвращение развития терминальной стадии заболевания почек (ESRD), что, в свою очередь, увеличивает продолжительность жизни субъектов с PKD.

[000143] miR-17 была идентифицирована как мишень для лечения PKD. Соединение антитела к miR-17 RGLS4326 было обнаружено путем скрининга химически разнообразной и рационально разработанной библиотеки олигонуклеотидов антитела к miR-17 на предмет оптимальных фармацевтических свойств. RGLS4326 преимущественно распределяется в почках и кистах, происходящих из собирательных протоков, вытесняет miR-17 из трансляционно активных полисом и дерепрессирует несколько мишеней мРНК miR-17, включая Pkd1 и Pkd2. Важно отметить, что RGLS4326 ослабляет рост кист в моделях ADPKD человека *in vitro* и множественных моделях мышей PKD после подкожного введения. Клиническое исследование фазы 1b RGLS4326 для лечения пациентов с аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек (ADPKD) было начато в октябре 2020 года.

[000144] После начала клинического исследования фазы 1b доклинические токсикологические исследования выявили изменения, связанные с ЦНС, включая аномальную походку, снижение двигательной активности и/или протрацию, при высоких дозах RGLS4326 на мышцах. Было обнаружено, что RGLS4326 является антагонистом рецептора AMPA (AMPA-R), глутаматного рецептора и ионного канала в возбуждающих синапсах в центральной нервной системе (ЦНС), который опосредует быструю возбуждающую нейротрансмиссию и, следовательно, является ключевым компонентом всех нейронных сетей. Антагонизм к рецептору AMPA может объяснить результаты,

опосредованные ЦНС, наблюдаемые при высоких дозах RGLS4326 в моделях доклинической токсикологии. Хотя у людей подобных результатов, связанных с ЦНС, не наблюдалось, тем не менее, предпочтительно избегать антагонизма к рецептору AMPA. Соответственно, была проверена библиотека соединений антитела к miR-17 для выявления соединений с физико-химическими и фармакологическими свойствами, сравнимыми с RGLS4326, которые также имеют более благоприятный профиль безопасности. Одно такое соединение, RG-NG-1015, было идентифицировано и выбрано в качестве потенциального терапевтического средства для лечения ADPKD.

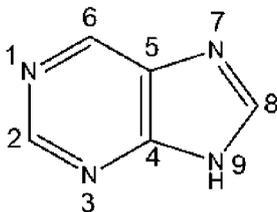
Соединения

[000145] В данном документе предложено соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, причем модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру в ориентации от 5' к 3':



где каждый N'' независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид; p представляет собой от 0 до 14; где p не представляет собой 0, последовательность азотистых оснований (N'') _p комплементарна части равной длины последовательности азотистых оснований miR-17; каждый N из (N) _r независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а последовательность азотистых оснований (N) _r представляет собой 5'-AGCACUUU-3'; N' представляет собой нуклеозид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент; q представляет собой 0 или 1; где если q представляет собой 1, азотистое основание N' представляет собой урацильное азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; и каждый цитозин независимо выбран из метилированного цитозина и 5-метилцитозина; или его фармацевтически приемлемая соль.

[000146] Атомы пуриновых азотистых оснований пронумерованы от одного до девяти в соответствии со стандартной нумерацией азотистых оснований, как показано в следующей структуре:



[000147] Атомы или группы, связанные с атомом кольца азотистого основания, имеют то же число, что и атом кольца, с которым они связаны.

[000148] Определенные азотистые основания, например гуанозин и инозин, содержат акцепторы водородной связи в положении 6. Акцептором водородной связи в положении 6 гуанозина является кислород, связанный с углеродом в положении 6. Акцептором водородной связи в положении 6 инозина является кислород, связанный с

углеродом в положении 6.

[000149] Пуриновые азотистые основания, которые не имеют акцептора водородной связи в положении 6, включают, помимо прочего, 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, изогуанозин и аденозин. NH_2 присутствует в положении 6 каждого из 2,6-диаминопурина, изогуанозина и аденозина в качестве донора водородной связи. Положение 6 2-аминопурина не имеет заместителя и, следовательно, не имеет акцептора или донора водородной связи.

[000150] В определенных вариантах осуществления структура $(\text{N})_f$ представляет собой: $\text{A}_S\text{G}_S\text{C}_M\text{A}_F\text{C}_F\text{U}_F\text{U}_M\text{U}_S$, где нуклеозиды, за которыми следует индекс «M», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды; нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды; и нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой нуклеозиды S-cEt.

[000151] В определенных вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

[000152] В определенных вариантах осуществления, где q представляет собой 1. В определенных вариантах осуществления q представляет собой 0. В определенных вариантах осуществления p представляет собой 0. В определенных вариантах осуществления p выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

[000153] В определенных вариантах осуществления последовательность азотистых оснований $(\text{N}^{\prime\prime})_p$ имеет не более одного несовпадения с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления последовательность азотистых оснований $(\text{N}^{\prime\prime})_p$ не имеет несовпадений с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления последовательность азотистых оснований $(\text{N}^{\prime\prime})_p$ выбрана из CUACCUGCACUGUA (SEQ ID NO: 7), CUACCUGCACUGU (SEQ ID NO: 8), CUACCUGCACUG (SEQ ID NO: 9), CUACCUGCACU (SEQ ID NO: 10), CUACCUGCAC (SEQ ID NO: 11), CUACCUGCA, CUACCUGC, CUACCUG, CUACCU, CUACC, CUAC, CUA, CU и C.

[000154] В определенных вариантах осуществления азотистое основание N^{\prime} представляет собой пуриновое азотистое основание, которое не имеет акцептора водородной связи в положении 6. В определенных вариантах осуществления азотистое основание N^{\prime} выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

[000155] В определенных вариантах осуществления сахарный фрагмент N^{\prime} не представляет собой 2'-О-метилсахар. В определенных вариантах осуществления сахарный фрагмент N^{\prime} представляет собой 2'-О-метоксиэтиловый сахар или сахар S-cEt.

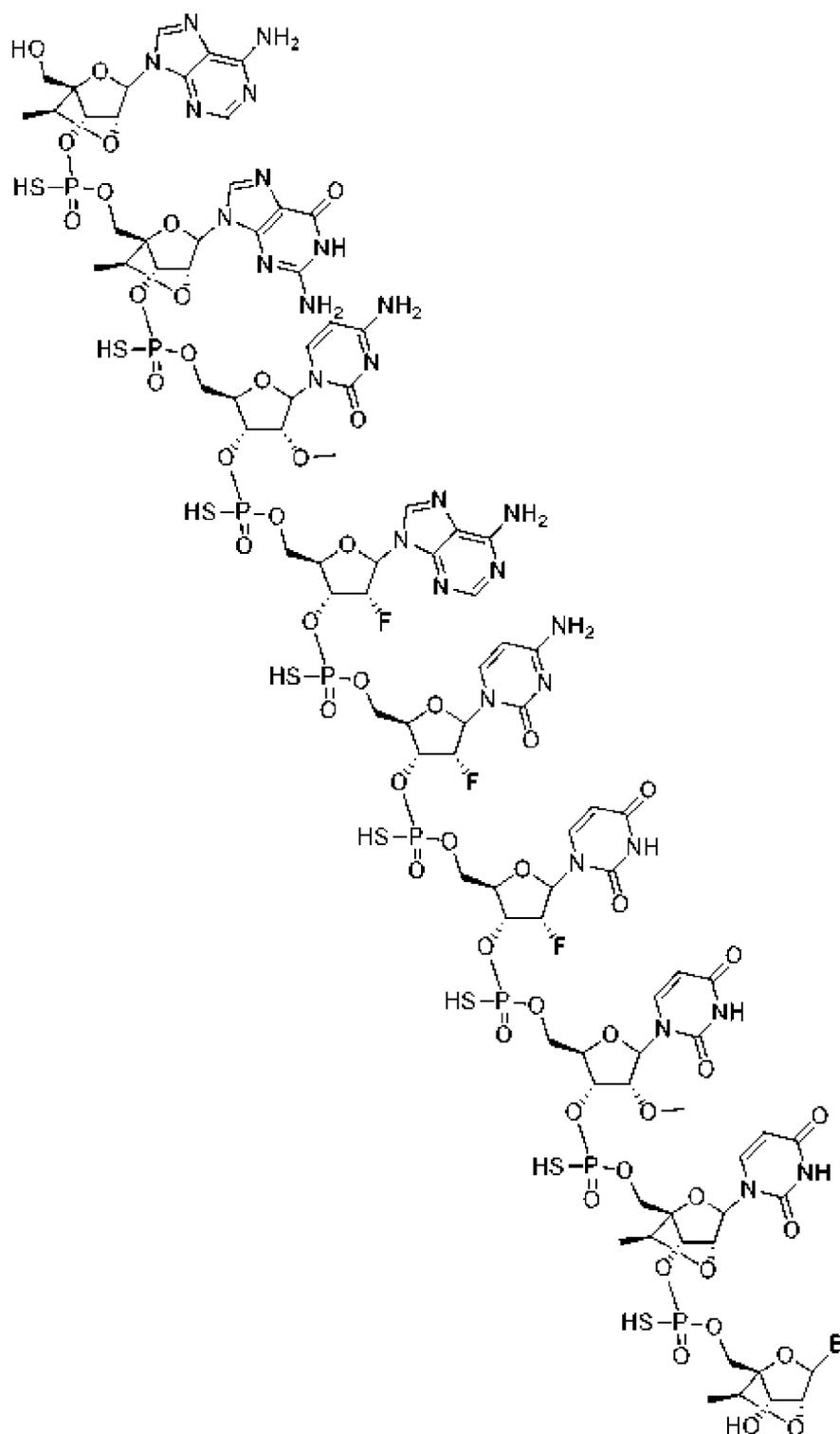
[000156] В определенных вариантах осуществления структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой $5^{\prime}\text{-A}_S\text{G}_S\text{C}_M\text{A}_F\text{C}_F\text{U}_F\text{U}_M\text{U}_S\text{A}_S\text{-}3^{\prime}$. В определенных вариантах осуществления структура модифицированного олигонуклеотида представляет

собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_SU_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин. В определенных вариантах осуществления структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_SC_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин. Соединение по п. 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

[000157] В определенных вариантах осуществления соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида.

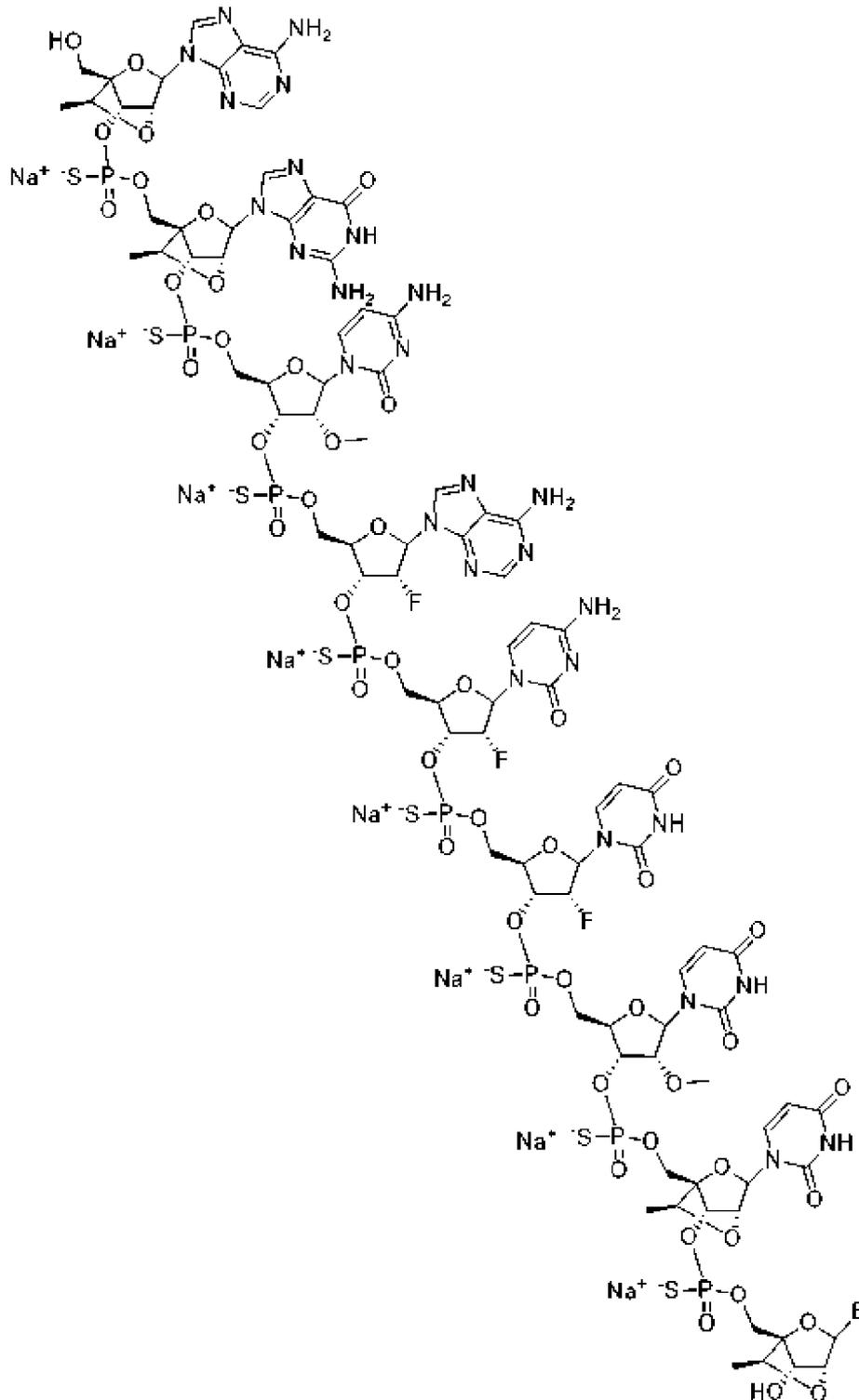
[000158] В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

[000159] В данном документе предусмотрен модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



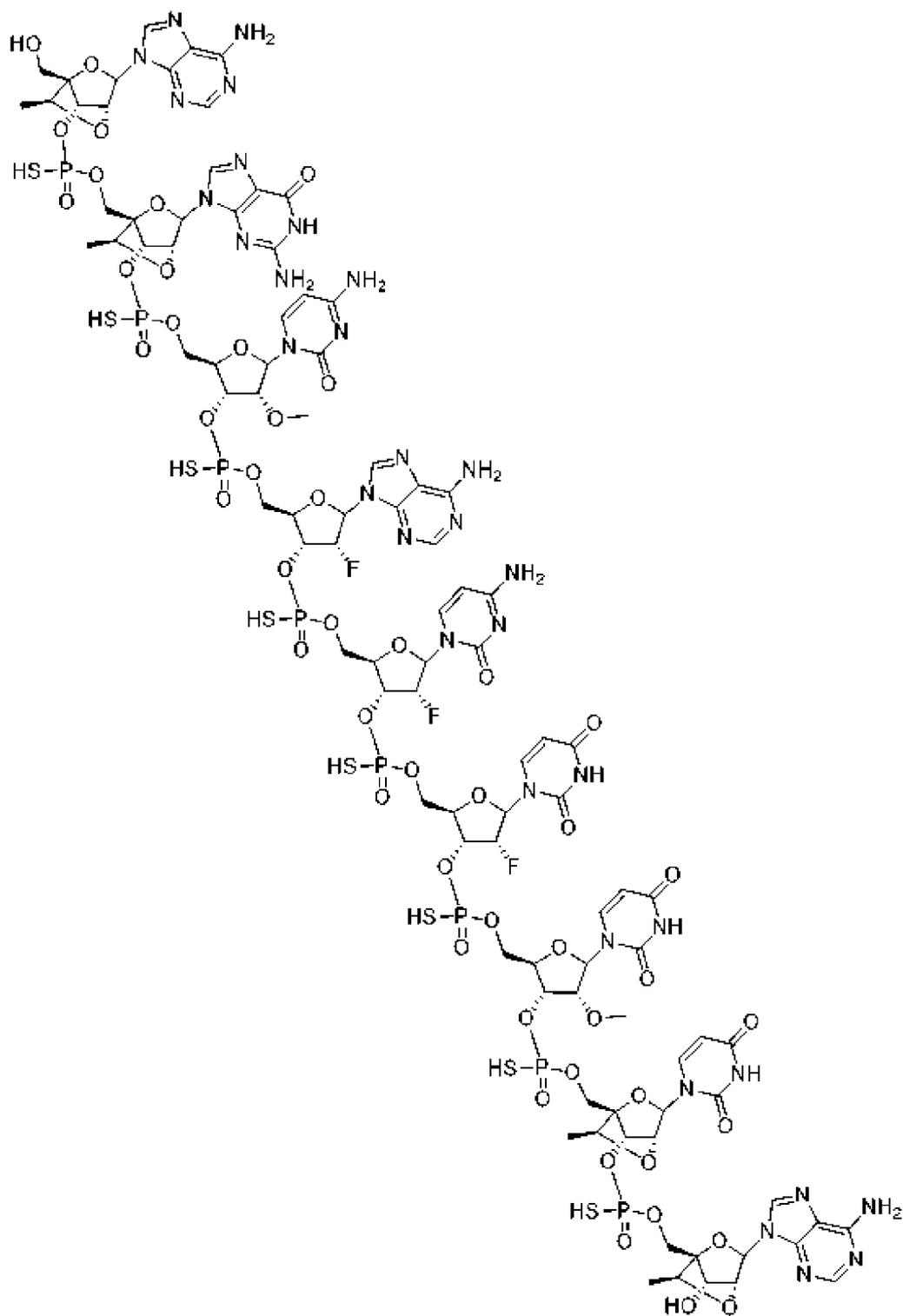
где В представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозинное азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении б; или его фармацевтически приемлемая соль В определенных вариантах осуществления В выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

[000160] В данном документе предусмотрен модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:

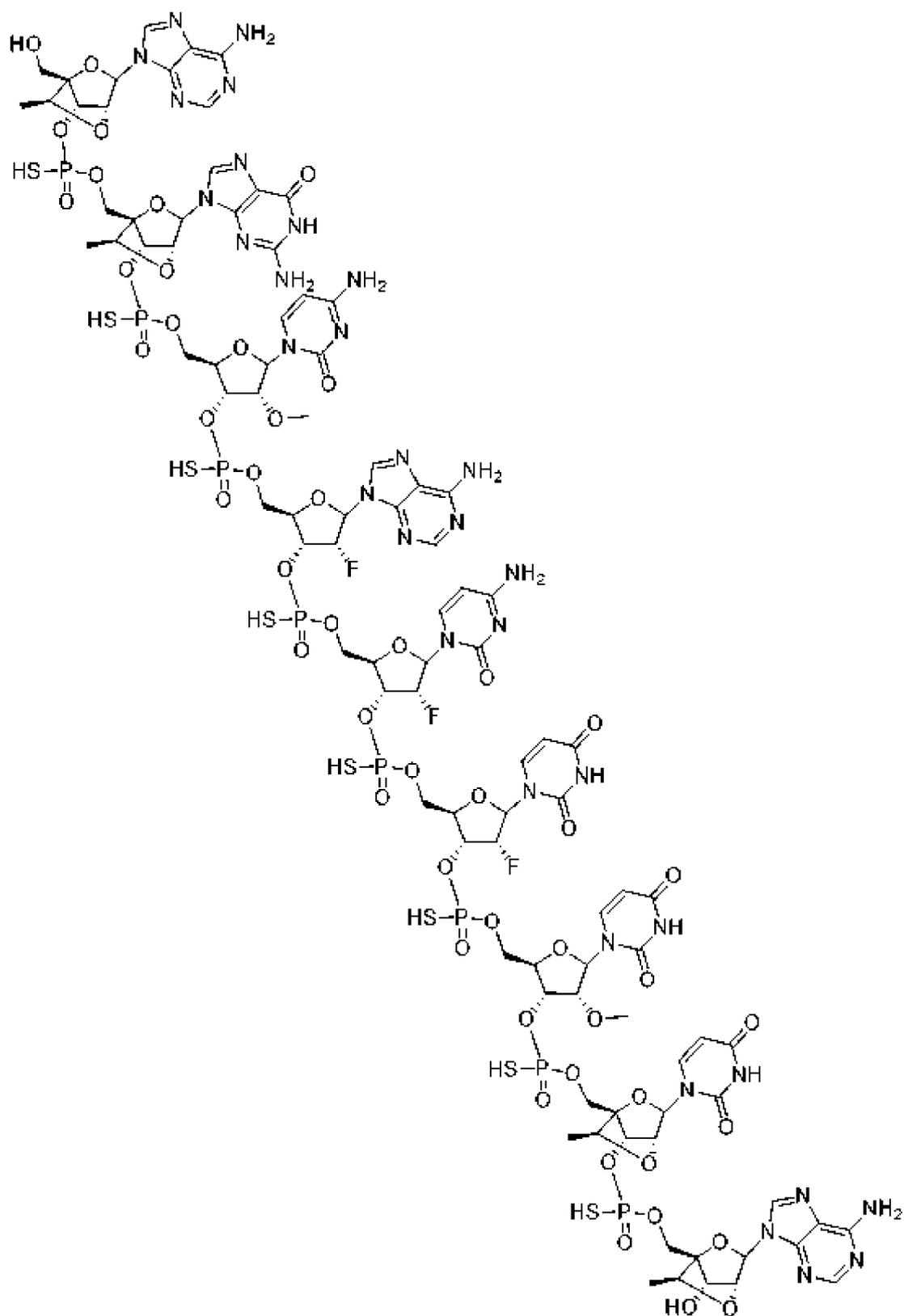


где В представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозинное азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6. В определенных вариантах осуществления В выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

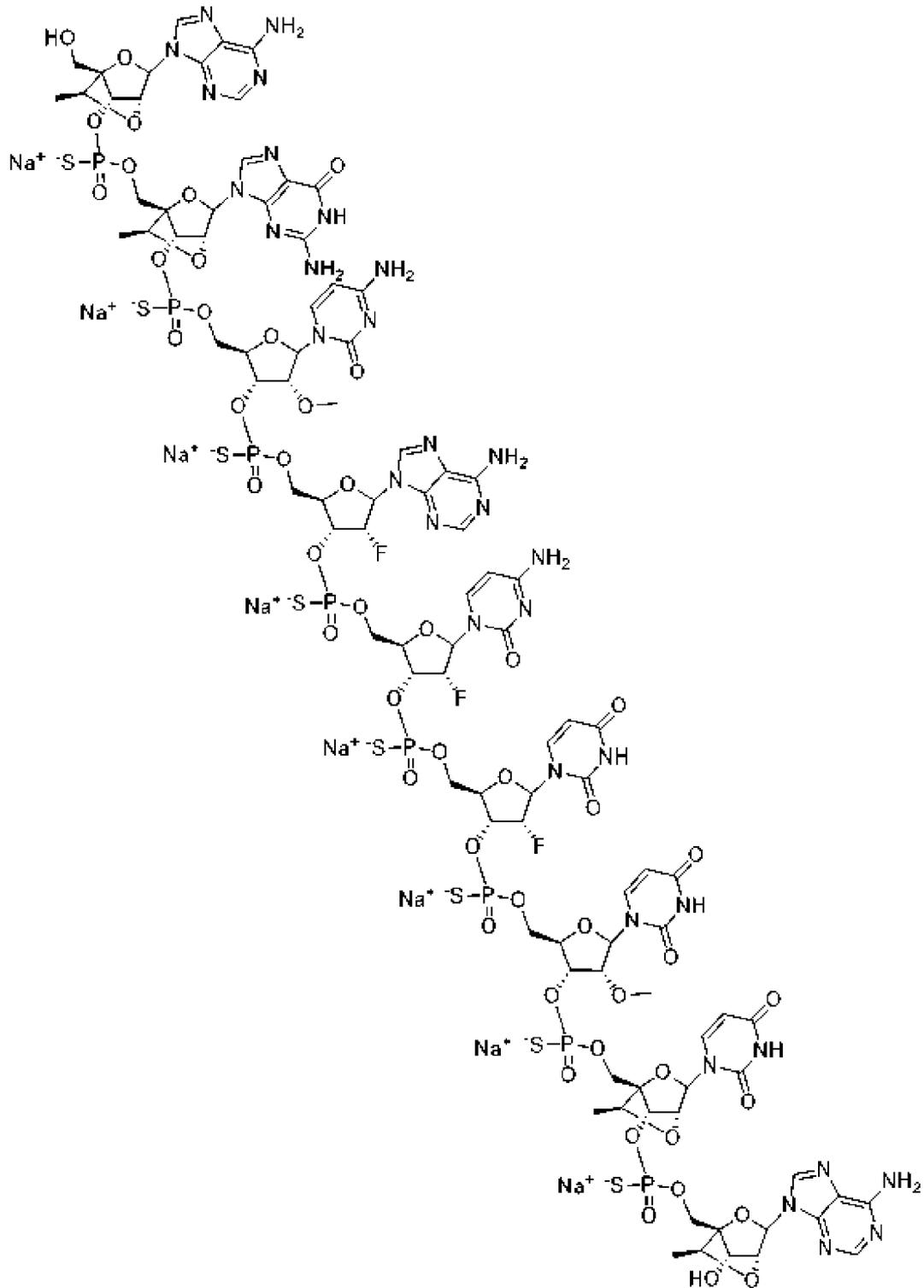
[000161] В настоящем документе предложен модифицированный олигонуклеотид под названием RG-NG-1015, причем структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой:



[000162] В данном документе также представлены фармацевтически приемлемые соли модифицированного олигонуклеотида RG-NG-1015. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль. Неограничивающий пример фармацевтически приемлемой соли RG-NG-1015 имеет структуру:



[000163] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль модифицированного олигонуклеотида содержит меньше катионных противоионов (таких как Na^+), чем количество тиофосфатных и/или фосфодизэфирных связей на молекулу (т.е. некоторые тиофосфатные и/или фосфодизэфирные связи протонированы). В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль RG-NG-1015 содержит менее 8 катионных противоионов (таких как Na^+) на молекулу RG-NG-1015. То есть в некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль RG-NG-1015 может содержать в среднем 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 катионных противоионов на

молекулу RG-NG-1015, причем остальные тиофосфатные группы протонируются.

Определенные применения

[000164] В настоящем документе предложены способы ингибирования активности одного или более членов семейства miR-17 в клетке, включающие приведение клетки в контакт с соединением по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17.

[000165] В настоящем документе предложены способы ингибирования активности одного или более членов семейства miR-17 у субъекта, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, представленной в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется заболевание, связанное с одним или несколькими членами семейства miR-17.

[000166] В настоящем документе предложены способы лечения поликистозной болезни почек (PKD), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется поликистозная болезнь почек. В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек выбрана из аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек (ADPKD), аутосомно-рецессивной поликистозной болезни почек (ARPKD) и нефронофтиза (NPHP). В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек выбрана из аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек (ADPKD) и аутосомно-рецессивной поликистозной болезни почек (ARPKD).

[000167] В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется нарушение, которое характеризуется множественными непочечными показателями, а также поликистозной болезнью почек. Такие нарушения включают, например, синдром Жубера и родственные ему нарушения (JSRD), синдром Меккеля (MKS) или синдром Барде-Бидля (BBS). Соответственно, в настоящем документе предложены способы лечения поликистозной болезни почек (PKD), включающие введение субъекту соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17, где у субъекта имеется синдром Жубера и родственные нарушения (JSRD), синдром Меккеля (MKS) или синдром Барде-Бидля (BBS). В настоящем документе предложены способы лечения поликистозной болезни почек (PKD), включающие введение соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17, когда у субъекта подозревается наличие синдрома Жубера и родственные нарушения (JSRD), синдрома Меккеля (MKS) или синдрома Барде-Бидля (BBS).

[000168] В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек является аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек (ADPKD). ADPKD

вызывается мутациями в гене *PKD1* или *PKD2*. ADPKD - прогрессирующее заболевание, при котором образование кист и увеличение почек приводят к почечной недостаточности и, в конечном итоге, к терминальной стадии почечной недостаточности у 50% пациентов к возрасту 60 лет. Пациентам с ADPKD может потребоваться пожизненный диализ и/или трансплантация почки. ADPKD является наиболее частой генетической причиной почечной недостаточности. Чрезмерная пролиферация кист является отличительной патологической особенностью ADPKD. При лечении PKD основной целью лечения является поддержание функции почек и предотвращение развития терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD), что, в свою очередь, увеличивает ожидаемую продолжительность жизни пациентов с PKD. Общий объем почек обычно неуклонно увеличивается у пациентов с ADPKD, при этом увеличение коррелирует со снижением функции почек. В настоящем документе предложены способы лечения ADPKD, включающие введение субъекту, имеющему ADPKD или у которого подозревается ADPKD, соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17.

[000169] В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек является аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек (ARPKD). ARPKD вызывается мутациями в гене *PKHD1* и является причиной хронической болезни почек у детей. Типичным почечным фенотипом ARPKD являются увеличенные почки; однако ARPKD оказывает заметное влияние на другие органы, особенно на печень. У пациентов с ARPKD развивается терминальная стадия почечной недостаточности, и им требуется трансплантация почки уже в возрасте 15 лет. В настоящем документе предложены способы лечения ARPKD, включающие введение субъекту, имеющему ARPKD или у которого подозревается ARPKD, соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17.

[000170] В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек представляет собой нефронофтиз (NPHP). Нефронофтиз - аутосомно-рецессивное кистозное заболевание почек, которое является частой причиной ESRD у детей. NPHP характеризуется почками нормального или уменьшенного размера, концентрацией кист в кортико-медуллярном соединении и тубулоинтерстициальным фиброзом. У пациентов с NPHP выявлены мутации в одном из нескольких генов NPHP, например, *NPHP1*. В настоящем документе предложены способы лечения NPHP, включающие введение субъекту, имеющему NPHP или у которого подозревается NPHP, соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17.

[000171] В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, имеет синдром Жубера и родственные нарушения (JSRD). JSRD включает широкий спектр характерных признаков, включая аномалии головного мозга, сетчатки и скелета. У некоторых пациентов с JSRD помимо характерных признаков

JSRD имеется поликистозная болезнь почек. Соответственно, в настоящем документе предложены способы лечения поликистозной болезни почек у субъекта, страдающего JSRD, включающие введение субъекту, страдающему JSRD, соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17. В определенных вариантах осуществления у субъекта подозревается наличие JSRD.

[000172] В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, имеет синдром Меккеля (MKS). MKS представляет собой нарушение с тяжелыми признаками и симптомами во многих органах, включая центральную нервную систему, скелетную систему, печень, почки и сердце. Общими признаками MKS являются наличие многочисленных заполненных жидкостью кист в почках и увеличение почек. Соответственно, в настоящем документе предложены способы лечения MKS, включающие введение субъекту, имеющему MKS, соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17. В определенных вариантах осуществления у субъекта подозревается наличие MKS.

[000173] В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, имеет синдром Барде-Бидля (BBS). BBS представляет собой нарушение, поражающее многие органы, включая глаза, сердце, почки, печень и пищеварительную систему. Характерным признаком BBS является наличие кист в почках. Соответственно, в настоящем документе предложены способы лечения поликистозной болезни почек у субъекта, страдающего BBS, включающие введение субъекту, страдающему BBS, соединения по настоящему изобретению, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17. В определенных вариантах осуществления у субъекта подозревается наличие BBS.

[000174] В определенных вариантах осуществления у субъекта была диагностирована PKD до введения соединения, содержащего модифицированный олигонуклеотид. Диагностика PKD может быть достигнута путем оценки параметров, включая, помимо прочего, семейный анамнез субъекта, клинические особенности (включая, помимо прочего, гипертензию, альбуминурию, гематурию и нарушение GFR), исследования почек (включая, помимо прочего, МРТ, УЗИ и КТ-сканирование) и/или гистологический анализ.

[000175] В определенных вариантах осуществления диагностика PKD включает скрининг на наличие мутаций в одном или нескольких генах *PKD1* или *PKD2*. В определенных вариантах осуществления диагностика ARPKD включает скрининг на наличие мутаций в гене *PKHP1*. В определенных вариантах осуществления диагностика NPHP включает скрининг на наличие одной или нескольких мутаций в одном или нескольких из генов *NPHP1*, *NPHP2*, *NPHP3*, *NPHP4*, *NPHP5*, *NPHP6*, *NPHP7*, *NPHP8* или *NPHP9*. В определенных вариантах осуществления диагностика JSRD включает

скрининг на наличие мутаций в генах *NPHP1*, *NPHP6*, *AHI1*, *MKS3* или *RPGRIP1L*. В определенных вариантах осуществления диагностика MKS включает скрининг на наличие мутаций в генах *NPHP6*, *MKS3*, *RPGRIP1L*, *NPHP3*, *CC2D2A*, *BBS2*, *BBS4*, *BBS6* или *MKS1*. В определенных вариантах осуществления диагностика BBS включает скрининг на наличие мутаций в генах *BBS2*, *BBS4*, *BBS6*, *MKS1*, *BBS1*, *BBS3*, *BBS5*, *BBS7*, *BBS8*, *BBS9*, *BBS10*, *BBS11* или *BBS12*.

[000176] В определенных вариантах осуществления у субъекта увеличен общий объем почек. В определенных вариантах осуществления общий объем почек представляет собой общий объем почек с поправкой на рост (HtTKV). В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется гипертензия. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется нарушение функции почек. В определенных вариантах осуществления субъект нуждается в улучшении функции почек. В определенных вариантах осуществления у субъекта выявлено нарушение функции почек.

[000177] В определенных вариантах осуществления уровни одного или нескольких членов семейства miR-17 повышены в почках субъекта с PKD. В определенных вариантах осуществления перед введением у субъекта определяют повышенный уровень одного или нескольких членов семейства miR-17 в почках. Уровень члена семейства miR-17 можно определить по материалу биопсии почки. В определенных вариантах осуществления перед введением у субъекта определяют повышенный уровень одного или нескольких членов семейства miR-17 в моче или крови субъекта. В определенных вариантах осуществления перед введением у субъекта определяют пониженный уровень полицистин-1 (PC1) или полицистин-2 (PC2) в моче субъекта. В определенных вариантах осуществления перед введением у субъекта определяют пониженный уровень полицистин-1 (PC1) или полицистин-2 (PC2) в моче субъекта. В определенных вариантах осуществления перед введением у субъекта определяют пониженный уровень полицистин-1 (PC1) и/или полицистин-2 (PC2) в моче субъекта.

[000178] В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, субъект может пройти определенные тесты для диагностики поликистозной болезни почек у субъекта, например, для определения причины поликистозной болезни почек, для оценки степени поликистозной болезни почек у субъекта и/или для определения ответа субъекта на лечение. Такие тесты могут оценить маркеры поликистозной болезни почек. Некоторые из этих тестов, такие как скорость клубочковой фильтрации и уровень азота мочевины в крови, также являются показателями функции почек. Маркеры поликистозной болезни включают, помимо прочего: определение общего объема почек у субъекта; определение гипертензии у субъекта; определение боли в почках у субъекта; определение фиброза у субъекта; определение полицистин-1 (PC1) в моче субъекта; определение полицистин-2 (PC2) в моче субъекта; определение уровня азота мочевины в крови у субъекта; определение уровня креатинина в сыворотке у субъекта; определение клиренса креатинина у субъекта; определение альбуминурии у субъекта; определение соотношения альбумин:креатинин у субъекта; определение скорости

клубочковой фильтрации у субъекта; определение гематурии у субъекта; определение белка NGAL в моче субъекта; и/или определение белка KIM-1 в моче субъекта. Если в данном документе не указано иное, уровень азота мочевины в крови, уровень креатинина в сыворотке, клиренс креатинина, альбуминурия, соотношение альбумин:креатинин, скорость клубочковой фильтрации и гематурия относятся к измерениям в крови (например, цельной крови или сыворотке крови) субъекта.

[000179] Маркеры поликистозной болезни почек определяют с помощью лабораторных исследований. Референтные диапазоны отдельных маркеров могут варьироваться от лаборатории к лаборатории. Изменение может быть связано, например, с различиями в конкретных используемых анализах. Таким образом, верхняя и нижняя границы нормального распределения маркера в популяции, также известные как верхняя граница нормы (ВГН) и нижняя граница нормы (НГН) соответственно, могут варьироваться от лаборатории к лаборатории. Для любого конкретного маркера медицинский работник может определить, какие уровни за пределами нормального распределения являются клинически значимыми и/или указывают на заболевание. Например, медицинский работник может определить скорость клубочковой фильтрации, которая может указывать на снижение скорости функции почек у субъекта с поликистозной болезнью почек.

[000180] В определенных вариантах осуществления введение соединения, представленного в настоящем документе, приводит к одному или более клинически благоприятным результатам. В определенных вариантах осуществления введение улучшает функцию почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет скорость снижения функции почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение уменьшает общий объем почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет скорость увеличения общего объема почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение уменьшает общий объем почек с поправкой на рост (HtTKV). В определенных вариантах осуществления введение замедляет скорость увеличения в HtTKV.

[000181] В определенных вариантах осуществления введение увеличивает полицистин-1 (PC1) в моче субъекта. В определенных вариантах осуществления введение увеличивает полицистин-2 (PC2) в моче субъекта. В определенных вариантах осуществления введение повышает полицистин-1 (PC1) и полицистин-2 (PC2) в моче субъекта.

[000182] В определенных вариантах осуществления введение подавляет рост кисты у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет скорость увеличения роста кисты у субъекта. В некоторых вариантах осуществления в почке субъекта присутствует киста. В некоторых вариантах осуществления киста присутствует в органе, отличном от почки, например, в печени.

[000183] В определенных вариантах осуществления введение облегчает боль в почках у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет

усиление боли в почках у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение задерживает возникновение боли в почках у субъекта.

[000184] В определенных вариантах осуществления введение снижает гипертензию у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет ухудшение гипертензии у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение задерживает возникновение гипертензии у субъекта.

[000185] В определенных вариантах осуществления введение уменьшает фиброз в почках субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет ухудшение фиброза в почке субъекта.

[000186] В определенных вариантах осуществления введение задерживает начало терминальной стадии почечной недостаточности у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение задерживает время диализа для субъекта. В определенных вариантах осуществления введение задерживает время трансплантации почки у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение увеличивает продолжительность жизни субъекта.

[000187] В определенных вариантах осуществления введение снижает альбуминурию у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет ухудшение альбуминурии у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение задерживает возникновение альбуминурии у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение снижает гематурию у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет ухудшение гематурии у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение задерживает возникновение гематурии у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение снижает уровень азота мочевины в крови у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение снижает уровень креатинина в сыворотке крови у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение улучшает клиренс креатинина у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение снижает соотношение альбумин:креатинин у субъекта.

[000188] В определенных вариантах осуществления введение улучшает скорость клубочковой фильтрации у субъекта. В определенных вариантах осуществления введение замедляет скорость снижения скорости клубочковой фильтрации у субъекта. В определенных вариантах осуществления скорость клубочковой фильтрации представляет собой оцениваемую скорость клубочковой фильтрации (eGFR). В определенных вариантах осуществления скорость клубочковой фильтрации представляет собой измеренную скорость клубочковой фильтрации (mGFR).

[000189] В определенных вариантах осуществления введение снижает белок липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), в моче субъекта. В определенных вариантах осуществления введение снижает содержание белка молекулы-1 повреждения почек (KIM-1) в моче субъекта.

[000190] В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, субъект может быть подвергнут определенным тестам для оценки степени

заболевания у субъекта. Такие тесты включают, помимо прочего, определение общего объема почек у субъекта; определение гипертензии у субъекта; определение боли в почках у субъекта; определение фиброза в почке субъекта; определение уровня азота мочевины в крови у субъекта; определение уровня креатинина в сыворотке у субъекта; определение клиренса креатинина в крови субъекта; определение альбуминурии у субъекта; определение соотношения альбумин:креатинин у субъекта; определение скорости клубочковой фильтрации у субъекта, причем скорость клубочковой фильтрации оценивают или определяют; определение белка липокалина, связанного с желатиназой нейтрофилов (NGAL), в моче субъекта; и/или определение белка молекулы-1 повреждения почек (KIM-1) в моче субъекта.

[000191] В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, испытывает снижение качества жизни. Например, субъект, страдающий поликистозной болезнью почек, может испытывать боль в почках, что может снизить качество жизни субъекта. В определенных вариантах осуществления введение улучшает качество жизни субъекта.

[000192] В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, субъектом является человек. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является взрослый человек. В определенных вариантах осуществления взрослому лицу исполнился по меньшей мере 21 год. В определенных вариантах осуществления субъект-человек представляет собой субъекта детского возраста, т.е. возраст субъекта менее 21 года. Детские популяции могут определяться регулирующими органами. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является подросток. В определенных вариантах осуществления подростку должно быть по меньшей мере 12 лет и менее 21 года. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является ребенок. В определенных вариантах осуществления ребенку должно быть по меньшей мере два года и менее 12 лет. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является младенец. В определенных вариантах осуществления младенец находится в возрасте по меньшей мере одного месяца и менее двух лет. В определенных вариантах осуществления субъектом является новорожденный. В определенных вариантах осуществления возраст новорожденного составляет менее одного месяца.

[000193] Любое из соединений, описанных в данном документе, может быть использовано в терапии. Любое из соединений, представленных в настоящем документе, может быть использовано для лечения поликистозной болезни почек. В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек является аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек. В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек является аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек. В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек представляет собой нефронофтиз. В определенных вариантах осуществления субъект имеет синдром Жубера и родственные ему нарушения (JSRD), синдром Меккеля (MKS) или синдром Барде-Бидля

(BBS).

[000194] Любой из модифицированных олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе, можно использовать в терапии. Любой из модифицированных олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе, может быть использован для лечения поликистозной болезни почек.

[000195] Любое из соединений, представленных в настоящем документе, может быть использовано при получении лекарственного средства. Любое из соединений, представленных в настоящем документе, может быть использовано при получении лекарственного средства для лечения поликистозной болезни почек.

[000196] Любой из модифицированных олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе, можно использовать при получении лекарственного средства. Любой из модифицированных олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе, можно использовать при получении лекарственного средства для лечения поликистозной болезни почек.

[000197] Любая из фармацевтических композиций, представленных в настоящем документе, может быть использована для лечения поликистозной болезни почек.

Некоторые дополнительные способы лечения

[000198] Лечение поликистозной болезни почек или любого из состояний, перечисленных в настоящем документе, может включать более чем одну терапию. По существу, в некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены способы лечения субъекта, имеющего или у которого подозревается наличие поликистозной болезни почек, включающие введение по меньшей мере одного способа лечения в дополнение к введению соединения, представленного в настоящем документе, которое содержит последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17.

[000199] В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная терапия включает фармацевтический агент. В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антигипертензивное средство. Антигипертензивные средства используются для контроля артериального давления субъекта.

[000200] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антагонист рецептора адиуретина 2. В определенных вариантах осуществления антагонистом рецептора адиуретина 2 является толваптан.

[000201] В определенных вариантах осуществления фармацевтические агенты включают блокаторы рецепторов ангиотензина II (ARB). В определенных вариантах осуществления блокатор рецепторов ангиотензина II представляет собой кандесартан, ирбесартан, олмесартан, лозартан, валсартан, телмисартан или эпросартан.

[000202] В определенных вариантах осуществления фармацевтические агенты включают ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента II (ACE). В определенных вариантах осуществления ингибитор ACE представляет собой каптоприл, эналаприл,

лизиноприл, беназеприл, хинаприл, фозиноприл или рамиприл.

[000203] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой диуретик. В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой блокатор кальциевых каналов.

[000204] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой ингибитор глюкозилцерамидсинтазы. В определенных вариантах осуществления ингибитор глюкозилцерамидсинтазы представляет собой венглустат.

[000205] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антигипергликемическое средство. В определенных вариантах осуществления антигипергликемическое средство представляет собой бигуанид. В определенных вариантах осуществления бигуанид представляет собой метформин.

[000206] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой ингибитор киназы. В определенных вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой босутиниб или KD019.

[000207] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антагонист адренергических рецепторов.

[000208] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антагонист рецепторов альдостерона. В определенных вариантах осуществления антагонист рецепторов альдостерона представляет собой спиронолактон. В определенных вариантах осуществления спиронолактон вводят в дозе от 10 до 35 мг ежедневно. В определенных вариантах осуществления спиронолактон вводят в дозе 25 мг ежедневно.

[000209] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой мишень ингибитора рапамицина (mTOR) млекопитающих. В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой эверолимус, рапамицин или сиролимус.

[000210] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой аналог гормона. В определенных вариантах осуществления аналог гормона представляет собой соматостатин или адренокортикотропный гормон.

[000211] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антифиброзный агент. В определенных вариантах осуществления антифиброзный агент представляет собой модифицированный олигонуклеотид, комплементарный miR-21.

[000212] В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой диализ. В определенных вариантах осуществления дополнительной терапией является трансплантация почки.

[000213] В определенных вариантах осуществления фармацевтические агенты включают противовоспалительные средства. В определенных вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой стероидное противовоспалительное средство. В определенных вариантах осуществления стероидное противовоспалительное

средство представляет собой кортикостероид. В определенных вариантах осуществления кортикостероид представляет собой преднизолон. В определенных вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой нестероидное противовоспалительное средство. В определенных вариантах осуществления нестероидное противовоспалительное средство представляет собой ибупрофен, ингибитор СОХ-1 или ингибитор СОХ-2.

[000214] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой фармацевтический агент, который блокирует один или несколько ответов на фиброгенные сигналы.

[000215] В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия может представлять собой фармацевтический агент, усиливающий иммунную систему организма, включающий низкие дозы циклофосфамида, тимостимулин, витамины и пищевые добавки (например, антиоксиданты, включая витамины А, С, Е, бета-каротин, цинк, селен, глутатион, коэнзим Q-10 и эхинацея) и вакцины, например, иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), который включает состав вакцины, сочетающий в себе мультимерную презентацию антигена и адъюванта.

[000216] В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия выбрана для лечения или ослабления побочного эффекта одной или более фармацевтических композиций, представленных в настоящем документе. Такие побочные эффекты включают, помимо прочего, реакции в месте инъекции, отклонения функциональных проб печени, нарушения функции почек, печеночную токсичность, почечную токсичность, аномалии центральной нервной системы и миопатии. Например, повышение уровня аминотрансфераз в сыворотке крови может указывать на печеночную токсичность или нарушение функции печени. Например, повышенный билирубин может указывать на печеночную токсичность или нарушение функции печени.

Определенные последовательности азотистых оснований микроРНК

[000217] Семейство miR-17 включает miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a и miR-106b. Каждый член семейства miR-17 имеет последовательность азотистых оснований, содержащую последовательность азотистых оснований 5'-AAAGUG-3' или затравочную последовательность miR-17, которая представляет собой последовательность азотистых оснований в положениях со 2 по 7 SEQ ID NO: 1. Кроме того, каждый член семейства miR-17 имеет некоторую идентичность последовательности азотистых оснований за пределами затравочной области. Соответственно, модифицированный олигонуклеотид, содержащий последовательность азотистых оснований, комплементарную затравочной последовательности miR-17, может быть нацелен на другие микроРНК семейства miR-17, помимо miR-17. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид нацелен на две или более микроРНК семейства miR-17. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид нацелен на три или более микроРНК семейства miR-17. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид нацелен на четыре или

более микроРНК семейства miR-17. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид нацелен на пять или более микроРНК семейства miR-17. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид нацелен на шесть микроРНК семейства miR-17. Например, модифицированный олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований 5'-AGCACUUU-3', нацелен на всех членов семейства miR-17.

[000218] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACUUU-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AGCACUUU-3'.

[000219] В некоторых вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACUUUX-3', где X представляет собой урацильное азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-GCACUUUX-3', где X представляет собой урацильное азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AGCACUUUX-3', где X представляет собой урацильное азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид представляет собой последовательность азотистых оснований 5'-AGCACUUUX-3', где X представляет собой урацильное азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6.

[000220] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AGCACUUUA-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AGCACUUU-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AGCACUU-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AGCACU-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AGCAC-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AGCA-3'. В определенных вариантах

осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-GCACUUUA-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACUUUA-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-ACUUUA-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CUUUA-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-AAGCACUUUA-3'.

[000221] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACTTT-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACUTT-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACUUT-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACTUT-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACUTT-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность азотистых оснований 5'-CACTTU-3'.

[000222] В определенных вариантах осуществления каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один цитозин представляет собой неметилированный цитозин. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один цитозин представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

[000223] В определенных вариантах осуществления количество связанных нуклеозидов модифицированного олигонуклеотида меньше длины его целевой микроРНК. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий число связанных нуклеозидов, меньшее длины целевой микроРНК, где каждое азотистое основание модифицированного олигонуклеотида комплементарно азотистому основанию в соответствующем положении целевой микроРНК, считается модифицированным олигонуклеотидом, имеющим последовательность азотистых оснований, которая полностью комплементарна (также называемая 100% комплементарной) области целевой последовательности микроРНК. Например, модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 9 связанных нуклеозидов, где каждое азотистое основание комплементарно соответствующему положению miR-17, полностью комплементарен miR-17.

[000224] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых оснований, имеющую одно

несоответствие по отношению к последовательности азотистых оснований целевой микроРНК. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых оснований, имеющую два несоответствия по отношению к последовательности азотистых оснований целевой микроРНК. В определенных таких вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность азотистых оснований, имеющую не более двух несоответствий по отношению к последовательности азотистых оснований целевой микроРНК. В определенных таких вариантах осуществления несовпадающие азотистые основания являются смежными. В определенных таких вариантах осуществления несовпадающие нуклеиновые основания не являются смежными.

[000225] Хотя в списке последовательностей, сопровождающем данную заявку, каждая последовательность азотистых оснований идентифицируется как «РНК» или «ДНК», в зависимости от необходимости, на практике эти последовательности могут быть модифицированы с помощью комбинации химических модификаций, указанных в настоящем документе. Специалист в данной области техники легко поймет, что в списке последовательностей такое обозначение как «РНК» или «ДНК» для описания модифицированных олигонуклеотидов является несколько произвольным. Например, модифицированный олигонуклеотид, содержащий нуклеозид, содержащий фрагмент 2'-О-метоксиэтилового сахара и тиминное основание, может быть описан как остаток ДНК в списке последовательностей, даже если нуклеозид модифицирован и не является природным нуклеозидом ДНК.

[000226] Соответственно, последовательности нуклеиновых кислот, представленные в списке последовательностей, охватывают нуклеиновые кислоты, содержащие любую комбинацию природных или модифицированных РНК и/или ДНК, включая, помимо прочего, такие нуклеиновые кислоты, имеющие модифицированные азотистые основания. В качестве дополнительного примера и без ограничений, модифицированный олигонуклеотид, имеющий последовательность азотистых оснований «ATCGATCG» в списке последовательностей, охватывает любой олигонуклеотид, имеющий такую последовательность азотистых оснований, модифицированную или немодифицированную, включая, помимо прочего, такие соединения, содержащие основания РНК, такие как олигонуклеотиды, имеющие последовательность «AUCGAUCG», и олигонуклеотиды, имеющие некоторые основания ДНК и некоторые основания РНК, такие как «AUCGATCG», и олигонуклеотиды, имеющие другие модифицированные основания, такие как «AT^{me}CGAUCG», где ^{me}C обозначает 5-метилцитозин.

Определенные модификации

[000227] В определенных вариантах осуществления олигонуклеотиды, представленные в настоящем документе, могут содержать одну или несколько модификаций азотистого основания, сахара и/или межнуклеозидной связи и, как таковые, представляют собой модифицированный олигонуклеотид. Модифицированное азотистое

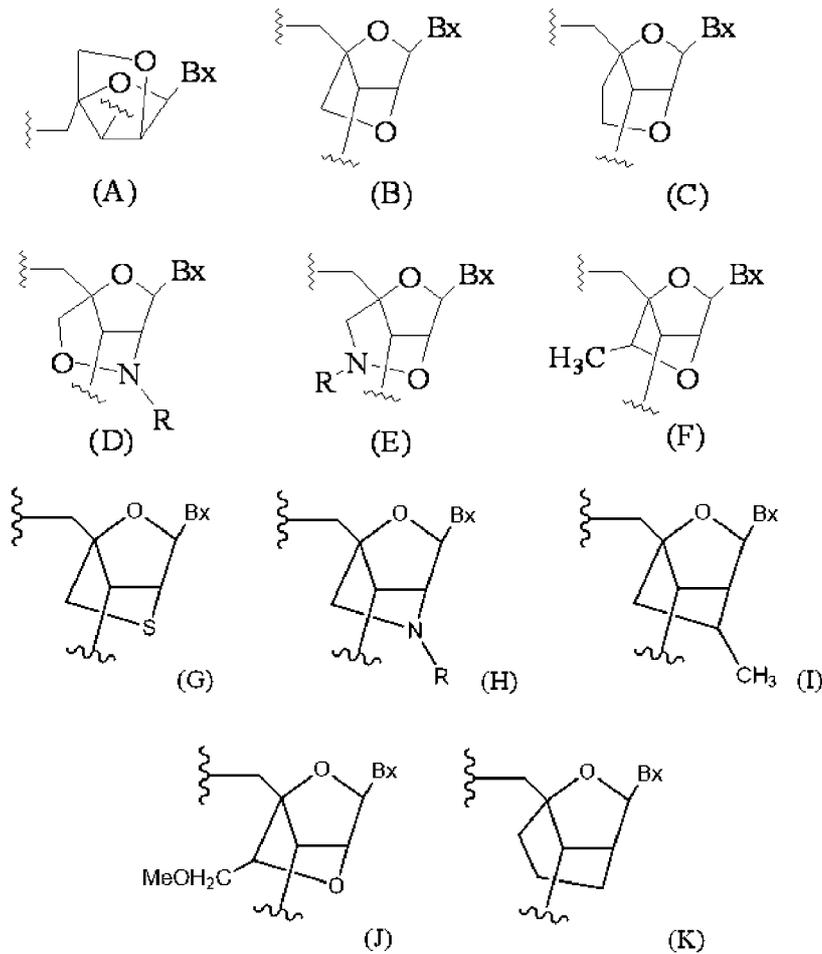
основание, сахар и/или межнуклеозидная связь могут быть выбраны вместо немодифицированной формы из-за желательных свойств, таких как, например, усиленное клеточное поглощение, повышенная аффинность с другими олигонуклеотидами или мишенями нуклеиновой кислоты и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

[000228] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит один или несколько модифицированных нуклеозидов.

[000229] В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой нуклеозид с модифицированным сахаром. В определенных таких вариантах осуществления модифицированные сахаром нуклеозиды могут дополнительно содержать природный или модифицированный гетероциклический основной фрагмент и/или могут быть соединены с другим нуклеозидом посредством природной или модифицированной межнуклеозидной связи и/или могут включать дополнительные модификации, независимые от модификации сахара. В определенных вариантах осуществления нуклеозид, модифицированный сахаром, представляет собой 2'-модифицированный нуклеозид, где сахарное кольцо модифицировано по 2'-углероду из природной рибозы или 2'-дезоксирибозы.

[000230] В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид имеет бициклический сахарный фрагмент. В определенных таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент представляет собой D-сахар в альфа-конфигурации. В определенных таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент представляет собой D-сахар в бета-конфигурации. В определенных таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент представляет собой L-сахар в альфа-конфигурации. В определенных таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент представляет собой L-сахар в бета-конфигурации.

[000231] Нуклеозиды, содержащие такие бициклические сахарные фрагменты, называются бициклическими нуклеозидами или BNA. В определенных вариантах осуществления бициклические нуклеозиды включают, помимо прочего, (A) α -L-метиленокси (4'-CH₂-O-2') BNA; (B) β -D-метиленокси (4'-CH₂-O-2') BNA; (C) этиленокси (4'-(CH₂)₂-O-2') BNA; (D) аминоокси (4'-CH₂-O-N(R)-2') BNA; (E) оксиамино (4'-CH₂-N(R)-O-2') BNA; (F) метил(метиленокси) (4'-CH(CH₃)-O-2') BNA (также называемый ограниченным этилом или cEt); (G) метилен-тио(4'-CH₂-S-2') BNA; (H) метилен-амино (4'-CH₂-N(R)-2') BNA; (I) метил-карбоциклический (4'-CH₂-CH(CH₃)-2') BNA; (J) с-МОЕ (4'-CH(CH₂-OMe)-O-2') BNA и (K) пропилен-карбоциклический (4'-(CH₂)₃-2') BNA, как изображено ниже.



где Bx представляет собой фрагмент в виде азотистого основания; и R независимо представляет собой H, защитную группу или C₁-C₁₂ алкил.

[000232] В определенных вариантах осуществления а 2'-модифицированный нуклеозид содержит 2'-заместительную группу, выбранную из F, OCF₃, O-CH₃ (также называемый "2'-ОМе"), OCH₂CH₂OCH₃ (также называемый "2'-О-метоксиэтил" или "2'-МОЕ"), 2'-O(CH₂)₂SCH₃, O-(CH₂)₂-O-N(CH₃)₂, -O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂ и O-CH₂-C(=O)-N(H)CH₃.

[000233] В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид содержит 2'-заместительную группу, выбранную из F, O-CH₃ и OCH₂CH₂OCH₃.

[000234] В определенных вариантах осуществления нуклеозид, модифицированный сахаром, представляет собой 4'-тио-модифицированный нуклеозид. В определенных вариантах осуществления нуклеозид, модифицированный сахаром, представляет собой 4'-тио-2'-модифицированный нуклеозид. 4'-тио-модифицированный нуклеозид содержит β-D-рибонуклеозид, в котором 4'-O заменен на 4'-S. 4'-тио-2'-модифицированный нуклеозид представляет собой 4'-тиомодифицированный нуклеозид, в котором 2'-ОН заменен на 2'-заместительную группу. Подходящие группы 2'-заместителей включают 2'-OCH₃, 2'-OCH₂CH₂OCH₃ и 2'-F.

[000235] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит одну или несколько межнуклеозидных модификаций. В определенных таких вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь

модифицированного олигонуклеотида представляет собой модифицированную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь содержит атом фосфора.

[000236] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит по меньшей мере одну тиофосфатную межнуклеозидную связь. В определенных вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

[000237] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит одно или несколько модифицированных азотистых оснований. В определенных вариантах осуществления модифицированное азотистое основание выбрано из 5-гидроксиметилцитозина, 7-деазагуанина и 7-дезааденина. В определенных вариантах осуществления модифицированное азотистое основание выбрано из 7-дезааденина, 7-деазагуанозина, 2-аминопиридина и 2-пиридона. В определенных вариантах осуществления модифицированное азотистое основание выбрано из 5-замещенных пиримидинов, 6-азапиримидинов и N-2, N-6 и O-6 замещенных пуринов, включая 2-аминопропиладенин, 5-пропинилурацил и 5-пропинилцитозин.

[000238] В определенных вариантах осуществления модифицированное азотистое основание содержит полициклический гетероцикл. В определенных вариантах осуществления модифицированное азотистое основание содержит трициклический гетероцикл. В определенных вариантах осуществления модифицированное азотистое основание включает производное феноксазина. В определенных вариантах осуществления феноксазин может быть дополнительно модифицирован с образованием азотистого основания, известного в данной области техники как G-фиксирующее основание.

[000239] В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид конъюгирован с одним или несколькими фрагментами, которые усиливают активность, клеточное распределение или клеточное поглощение полученных антисмысловых олигонуклеотидов. В определенных таких вариантах осуществления фрагмент представляет собой холестеринный фрагмент. В определенных вариантах осуществления фрагмент представляет собой липидный фрагмент. Дополнительные фрагменты для конъюгации включают углеводы, пептиды, антитела или фрагменты антител, фосфолипиды, биотин, феназин, фолат, фенантридин, антрахинон, акридин, флуоресцеины, родамины, кумарины и красители. В определенных вариантах осуществления углеводный фрагмент представляет собой N-ацетил-D-галактозамин (GalNac). В определенных вариантах осуществления группа конъюгата присоединена непосредственно к олигонуклеотиду. В определенных вариантах осуществления группа конъюгата присоединена к модифицированному олигонуклеотиду посредством связывающего фрагмента, выбранного из amino, azido, гидроксила, карбоновой кислоты, тиола, ненасыщенностей (например, двойных или тройных связей), 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-

карбоксилата (SMCC), 6-аминогексановой кислоты (АНЕХ или АНА), замещенного C1-C10 алкила, замещенного или незамещенного C2-C10 алкенила и замещенного или незамещенного C2-C10 алкинила. В определенных таких вариантах осуществления группа заместителя выбрана из гидроксила, амино, алкокси, азидо, карбокси, бензила, фенила, нитро, тиола, тиоалкокси, галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила.

[000240] В определенных таких вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий одну или несколько стабилизирующих групп, которые присоединены к одному или обоим концам модифицированного олигонуклеотида для улучшения свойств, таких как, например, стабильность нуклеазы. В стабилизирующие группы входят кэп-структуры. Эти концевые модификации защищают модифицированный олигонуклеотид от расщепления экзонуклеазой и могут способствовать доставке и/или локализации внутри клетки. Кэп может присутствовать на 5'-конце (5'-кэп) или на 3'-конце (3'-кэп) или может присутствовать на обоих концах. Кэп-структуры включают, например, инвертированные дезокси-абазовые кэпы.

Определенные фармацевтические композиции

[000241] В настоящем документе предложены фармацевтические композиции, содержащие соединение или модифицированный олигонуклеотид, представленный в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой водный раствор. В определенных вариантах осуществления водный раствор представляет собой солевой раствор. Под фармацевтически приемлемыми разбавителями в данном документе понимают стерильные разбавители. Подходящие пути введения включают, помимо прочего, внутривенное и подкожное введение. В определенных вариантах осуществления введение представляет собой внутривенное введение. В определенных вариантах осуществления введение представляет собой подкожное введение. В определенных вариантах осуществления введение представляет собой пероральное введение.

[000242] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в форме стандартной дозировки. Например, в определенных вариантах осуществления единичная дозировка находится в форме таблетки, капсулы или болюсной инъекции.

[000243] В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой модифицированный олигонуклеотид, который был получен в подходящем разбавителе, доведен до pH 7,0-9,0 с помощью кислоты или основания во время приготовления, а затем лиофилизирован в стерильных условиях. Лيوфилизированный модифицированный олигонуклеотид затем восстанавливают подходящим разбавителем, например, водным раствором, таким как вода, или физиологически совместимыми буферами, такими как физиологический раствор, раствор Хэнкса или раствор Рингера. Восстановленный продукт вводят в виде подкожной инъекции или внутривенной инфузии. Лيوфилизированный лекарственный препарат

может быть упакован в флакон из прозрачного стекла типа I емкостью 2 мл (обработанный сульфатом аммония), закупоренный пробкой из бромбутилкаучука и запечатанной алюминиевой крышкой.

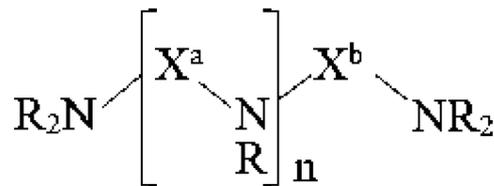
[000244] В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут дополнительно содержать другие вспомогательные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях, при уровнях их применения, установленных в данной области техники. Так, например, композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства.

[000245] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, могут содержать дополнительные материалы, полезные при физическом составлении различных лекарственных форм композиций, представленных в настоящем документе, такие как красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, замутнители, загустители и стабилизаторы; такие дополнительные материалы также включают, помимо прочего, вспомогательные вещества, такие как спирт, полиэтиленгликоли, желатин, лактоза, амилаза, стеарат магния, тальк, кремниевая кислота, вязкий парафин, гидроксиметилцеллюлоза и поливинилпирролидон. В различных вариантах осуществления такие материалы при добавлении не должны чрезмерно мешать биологической активности компонентов композиций, представленных в настоящем документе. Составы можно стерилизовать и, при желании, смешивать со вспомогательными агентами, например, смазывающими веществами, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, эмульгаторами, солями для воздействия на осмотическое давление, буферами, красителями, ароматизаторами и/или ароматическими веществами и т.п., которые не вредно взаимодействуют с олигонуклеотидом(-ами) состава. Определенные фармацевтические композиции для инъекций представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Определенные растворители, пригодные для использования в фармацевтических композициях для инъекций, включают, помимо прочего, 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 вещества, повышающие вязкость суспензии, такие как натрийкарбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. Необязательно такие суспензии могут также содержать подходящие стабилизаторы или агенты, повышающие растворимость фармацевтических агентов, что позволяет готовить высококонцентрированные растворы.

[000246] Липидные фрагменты использовались в терапии нуклеиновыми кислотами различными способами. В одном способе нуклеиновую кислоту вводят в предварительно сформированные липосомы или липоплексы, состоящие из смесей

катионных липидов и нейтральных липидов. В другом способе комплексы ДНК с моно- или поликатионными липидами образуются без присутствия нейтрального липида. В определенных вариантах осуществления липидный фрагмент выбирают для увеличения распределения фармацевтического агента в конкретной клетке или ткани. В определенных вариантах осуществления липидный фрагмент выбран для увеличения распределения фармацевтического агента в жировой ткани. В определенных вариантах осуществления липидный фрагмент выбран для увеличения распределения фармацевтического агента в мышечной ткани.

[000247] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит полиаминное соединение или липидный фрагмент, образующий комплекс с нуклеиновой кислотой. В определенных вариантах осуществления такие препараты содержат одно или несколько соединений, каждое из которых отдельно имеет структуру, определенную формулой (Z), или их фармацевтически приемлемую соль,



где каждый X^a и X^b в каждом случае независимо представляет собой C_{1-6} алкилен; n представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5; каждый R независимо представляет собой H , где по меньшей мере $n+2$ фрагментов R в по меньшей мере около 80% молекул соединения формулы (Z) в препарате не представляют собой H ; m представляет собой 1, 2, 3 или 4; Y представляет собой O , NR^2 или S ; R^1 представляет собой алкил, алкенил или алкинил; каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями; и R^2 представляет собой H , алкил, алкенил или алкинил; каждый из которых необязательно замещен, каждый из которых необязательно замещен одним или несколькими заместителями; при условии, что если $n=0$, то по меньшей мере $n+3$ фрагментов R не представляют собой H . Такие препараты описаны в публикации PCT WO/2008/042973, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для описания липидных препаратов. Определенные дополнительные препараты описаны в публикации *Nature Biotechnology* **26**, 561-569 (01 мая 2008 г.), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для описания липидных препаратов.

[000248] В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию, предусмотренную в данном документе, получают с использованием известных методик, включая, помимо прочего, процессы смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, отмучивания, эмульгирования, инкапсулирования,

улавливания или таблетирования.

[000249] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, представляет собой твердое вещество (например, порошок, таблетку и/или капсулу). В определенных из таких вариантов осуществления твердую фармацевтическую композицию, содержащую один или несколько олигонуклеотидов, получают с использованием ингредиентов, известных в данной области техники, включая, помимо прочего, крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие агенты, смазочные вещества, связующие и разрыхляющие агенты.

[000250] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, составлена в виде депо-препарата. Определенные такие депо-препараты обычно действуют дольше, чем не-депо-препараты. В определенных вариантах осуществления такие препараты вводят путем имплантации (например, подкожно или внутримышечно) или внутримышечной инъекции. В определенных вариантах осуществления депо-препараты получают с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, эмульсии в приемлемом масле) или ионообменных смол или в виде труднорастворимых производных, например, в виде труднорастворимой соли.

[000251] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит систему доставки. Примеры систем доставки включают, но не ограничиваясь ими, липосомы и эмульсии. Определенные системы доставки применимы для приготовления определенных фармацевтических композиций, включая композиции, содержащие гидрофобные соединения. В определенных вариантах осуществления используются определенные органические растворители, такие как диметилсульфоксид.

[000252] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит одну или несколько молекул для тканеспецифичной доставки, предназначенных для доставки одного или более фармацевтических агентов, представленных в настоящем документе, к конкретным тканям или типам клеток. Например, в определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции включают липосомы, покрытые тканеспецифическим антителом.

[000253] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, предложенная в настоящем документе, содержит систему замедленного высвобождения. Неограничивающим примером такой системы с замедленным высвобождением является полупроницаемая матрица из твердых гидрофобных полимеров. В определенных вариантах осуществления системы с замедленным высвобождением могут, в зависимости от их химической природы, высвобождать фармацевтические агенты в течение часов, дней, недель или месяцев.

[000254] Определенные фармацевтические композиции для инъекций представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в

контейнерах для нескольких доз.

[000255] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит модифицированный олигонуклеотид в терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество достаточно для предотвращения, облегчения или улучшения симптомов заболевания или для продления выживаемости субъекта, подвергающегося лечению.

[000256] В определенных вариантах осуществления один или несколько модифицированных олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе, составлены в виде пролекарства. В определенных вариантах осуществления при введении *in vivo* пролекарство химически превращается в биологически, фармацевтически или терапевтически более активную форму олигонуклеотида. В определенных вариантах осуществления пролекарства полезны, поскольку их легче вводить, чем соответствующую активную форму. Например, в определенных случаях пролекарство может быть более биодоступным (например, при пероральном введении), чем соответствующая активная форма. В определенных случаях пролекарство может иметь улучшенную растворимость по сравнению с соответствующей активной формой. В определенных вариантах осуществления пролекарства менее водорастворимы, чем соответствующая активная форма. В определенных случаях такие пролекарства обладают превосходной способностью проникать через клеточные мембраны, где растворимость в воде вредна для подвижности. В определенных вариантах осуществления пролекарство представляет собой сложный эфир. В определенных таких вариантах осуществления сложный эфир метаболически гидролизуется до карбоновой кислоты при введении. В определенных случаях соединение, содержащее карбоновую кислоту, представляет собой соответствующую активную форму. В определенных вариантах осуществления а пролекарство содержит короткий пептид (полиаминокислоту), связанный с кислотной группой. В определенных из таких вариантов осуществления пептид расщепляется при введении с образованием соответствующей активной формы.

[000257] В определенных вариантах осуществления пролекарство получают путем модификации фармацевтически активного соединения таким образом, что активное соединение будет регенерироваться при введении *in vivo*. Пролекарство может быть разработано для изменения метаболической стабильности или транспортных характеристик лекарственного средства, для маскировки побочных эффектов или токсичности, для улучшения вкуса лекарственного средства или для изменения других характеристик или свойств лекарственного средства. Благодаря знанию фармакодинамических процессов и метаболизма лекарственных препаратов *in vivo*, специалисты в данной области после того, как будет известно фармацевтически активное соединение, смогут разработать пролекарственные препараты данного соединения (см., например, Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

[000258] Дополнительные пути введения включают, помимо прочего, пероральный, ректальный, чресслизистый, кишечный, энтеральный, местный, суппозиторный, ингаляционный, интратекальный, внутрисердечный, внутрижелудочковый, внутрибрюшинный, интраназальный, внутриглазной, внутриопухолевый, внутримышечный и интрамедуллярный. В определенных вариантах осуществления фармацевтические интратекальные препараты вводятся для достижения местного, а не системного воздействия. Например, фармацевтические композиции можно вводить непосредственно в область желаемого эффекта (например, в почку).

Определенные наборы

[000259] Также предоставляются комплекты. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат одно или несколько соединений, содержащих модифицированный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы можно использовать для введения соединения субъекту.

[000260] В определенных вариантах осуществления набор содержит фармацевтическую композицию, готовую для введения. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция находится внутри флакона. Множество флаконов, например 10, могут находиться, например, в дозирующих упаковках. В некоторых вариантах осуществления флакон изготовлен таким образом, чтобы к нему можно было получить доступ с помощью шприца. В наборе также может содержаться инструкция по использованию соединений.

[000261] В некоторых вариантах осуществления набор содержит фармацевтическую композицию, находящуюся в предварительно заполненном шприце (таком как однократные шприцы, например, с иглой калибра 27, ½ дюйма с предохранителем иглы), а не во флаконе. Множество предварительно заполненных шприцев, например 10, могут находиться, например, в дозирующих упаковках. Набор также может содержать инструкции по введению соединений, содержащих модифицированный олигонуклеотид, раскрытый в настоящем документе.

[000262] В некоторых вариантах осуществления набор содержит модифицированный олигонуклеотид, представленный в настоящем документе в виде лиофилизированного лекарственного продукта, и фармацевтически приемлемый разбавитель. При подготовке к введению субъекту лиофилизированный лекарственный продукт восстанавливают в фармацевтически приемлемом разбавителе.

[000263] В некоторых вариантах осуществления, помимо соединений, содержащих модифицированный олигонуклеотид, описанный в настоящем документе, набор может дополнительно включать одно или более из следующих средств: шприц, спиртовой тампон, ватный тампон и/или марлевый тампон.

Определенные экспериментальные модели

[000264] В определенных вариантах осуществления представлены способы использования и/или тестирования модифицированных олигонуклеотидов, представленных в настоящем документе, в экспериментальной модели. Специалисты в

данной области техники могут выбирать и модифицировать протоколы таких экспериментальных моделей для оценки фармацевтического агента, представленного в настоящем документе.

[000265] Обычно модифицированные олигонуклеотиды сначала тестируют на культивируемых клетках. Подходящие типы клеток включают те, которые относятся к типу клеток, в которые желательна доставка модифицированного олигонуклеотида *in vivo*. Например, подходящие типы клеток для изучения описанных в данном документе способов включают первичные или культивируемые клетки.

[000266] В определенных вариантах осуществления степень, в которой модифицированный олигонуклеотид мешает активности одного или нескольких членов семейства miR-17, оценивается в культивируемых клетках. В определенных вариантах осуществления ингибирование активности микроРНК можно оценить путем измерения уровня одного или нескольких предсказанных или подтвержденных транскриптов, регулируемых микроРНК. Ингибирование активности микроРНК может привести к увеличению транскрипта, регулируемого членом семейства miR-17, и/или белка, кодируемого транскриптом, регулируемым членом семейства miR-17 (т.е. транскрипт, регулируемый членом семейства miR-17, дерепрессирован). Кроме того, в определенных вариантах осуществления определенные фенотипические результаты могут быть измерены.

[000267] Специалистам в данной области техники доступны несколько моделей животных для изучения одного или нескольких членов семейства miR-17 на моделях заболеваний человека. Модели поликистозной болезни почек включают, помимо прочего, модели с мутациями и/или делециями в *Pkd1* и/или *Pkd2*; и модели, включающие мутации в других генах. Неограничивающие типовые модели PKD, включающие мутации и/или делеции в *Pkd1* и/или *Pkd2*, включают гипоморфные модели, такие как модели, включающие миссенс-мутации в *Pkd1*, и модели со сниженной или нестабильной экспрессией *Pkd2*; индуцируемые модели условного нокаута; и модели условного нокаута. Неограничивающие иллюстративные модели PKD, включающие мутации в генах, отличных от *Pkd1* и *Pkd2*, включают модели с мутациями в *Pkhd1*, *Nek8*, *Kif3a* и/или *Nphp3*. Модели PKD рассмотрены, например, в Shibazaki *et al.*, *Human Mol. Genet.*, 2008; 17(11): 1505-1516; Happe and Peters, *Nat Rev Nephrol.*, 2014; 10(10): 587-601; и Patel *et al.*, *PNAS*, 2013; 110(26): 10765-10770.

Определенные количественные анализы

[000268] В определенных вариантах осуществления уровни микроРНК количественно оцениваются в клетках или тканях *in vitro* или *in vivo*. В определенных вариантах осуществления изменения уровней микроРНК определяют с помощью микроматричного анализа. В определенных вариантах осуществления изменения уровней микроРНК определяют с помощью одного из нескольких коммерчески доступных ПЦР-анализов, таких как анализ микроРНК TaqMan® (Applied Biosystems).

[000269] Модуляцию активности микроРНК с помощью мимика антитела к miR

или микроРНК можно оценить с помощью профилирования мРНК на микрочипах. Последовательности мРНК, которые модулируются (либо увеличиваются, либо уменьшаются) мимиком антитела к miR или микроРНК, ищутся для затравочных последовательностей микроРНК, чтобы сравнить модуляцию мРНК, которые являются мишенями микроРНК, с модуляцией мРНК, которые не являются мишенями микроРНК. Таким образом можно оценить взаимодействие антитела к miR с ее целевой микроРНК или мимика микроРНК с ее мишенями. В случае антитела к miR мРНК, уровень экспрессии которых повышен, проверяют на наличие последовательностей мРНК, которые содержат совпадение затравки с микроРНК, которой антитело к miR комплементарно.

[000270] Модуляцию активности микроРНК с помощью соединения антитела к miR можно оценить путем измерения уровня целевой информационной РНК микроРНК, либо путем измерения уровня самой информационной РНК, либо белка, транскрибируемого из нее. Антисмысловое ингибирование микроРНК обычно приводит к увеличению уровня информационной РНК и/или белка целевой информационной РНК микроРНК, *т.е.* обработка антителом к miR приводит к дерепрессии одной или нескольких целевых информационных РНК.

ПРИМЕРЫ

[000271] Следующие примеры представлены для более полной иллюстрации некоторых вариантов осуществления изобретения. Однако их никоим образом не следует рассматривать как ограничивающие широкий объем изобретения.

[000272] Специалисты в данной области могут легко принять принципы, лежащие в основе этого открытия, для создания различных соединений, не отступая от сущности настоящего изобретения.

Пример 1. Роль miR-17 при PKD

[000273] Члены семейства miR-17 из кластера микроРНК miR-17~92 активируются на мышинных моделях PKD. Генетическая делеция кластера miR-17~92 в мышинной модели PKD уменьшает рост кисты почки, улучшает функцию почек и продлевает выживаемость (Patel *et al.*, *PNAS*, 2013; 110(26): 10765-10770). Кластер miR-17~92 содержит 6 различных микроРНК, каждая из которых имеет отдельную последовательность: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19-b-1 и miR-92a-1.

[000274] Кластер miR-17~92 включает две микроРНК, miR-17 и miR-20a, которые являются членами семейства miR-17 микроРНК. Каждый член этого семейства имеет идентичность зародышевой последовательности и различную степень идентичности последовательности за пределами зародышевой области. Другими членами семейства miR-17 являются miR-20b, miR-93, miR-106a и miR-106b. miR-20b и miR-106a расположены в кластере miR-106a~363 на X-хромосоме человека, а miR-93 и miR-106b расположены в кластере miR-106b~25 на хромосоме 7 человека. Последовательности членов семейства miR-17 показаны в таблице 1.

Таблица 1. Семейство miR-17 микроРНК

микроРНК	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (ОТ 5' ДО 3') затравочная область выделена жирным шрифтом	SEQ ID NO:
miR-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	1
miR-20a	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	2
miR-20b	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	3
miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	4
miR-106a	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	5
miR-106b	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	6

[000275] Соединение антитела к miR-17 RGLS4326 было обнаружено путем скрининга химически разнообразной и рационально разработанной библиотеки олигонуклеотидов антитела к miR-17 на предмет оптимальных фармацевтических свойств. RGLS4326 преимущественно распределяется в почках и кистах, происходящих из собирательных протоков, вытесняет miR-17 из трансляционно активных полисом и дерепрессирует несколько мишеней мРНК miR-17, включая Pkd1 и Pkd2. Важно отметить, что RGLS4326 ослабляет рост кист в моделях ADPKD человека *in vitro* и множественных моделях мышей PKD после подкожного введения. В декабре 2017 года было начато клиническое исследование 1-й фазы RGLS4326 с однократной возрастающей дозой (SAD) на здоровых добровольцах, за которым последовало клиническое исследование 1-й фазы с множественной возрастающей дозой (MAD) на здоровых добровольцах, которое было начато в мае 2018 года. Клиническое исследование фазы 1b RGLS4326 для лечения пациентов с аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек (ADPKD) было начато в октябре 2020 года.

[000276] После начала клинического исследования 1-й фазы с MAD доклинические токсикологические исследования выявили изменения, связанные с центральной нервной системой (ЦНС), включая аномальную походку, снижение двигательной активности и/или протрацию при высоких дозах RGLS4326. Чтобы идентифицировать потенциальных кандидатов для нецелевой фармакологии, панель из 174 мишеней, включая рецепторы, сопряженные с G-белком, транспортеры, ионные каналы, ядерные рецепторы и цитокиновые рецепторы, была оценена *in vitro* на предмет возможных взаимодействий с RGLS4326. Было обнаружено, что RGLS4326 является антагонистом глутаматного рецептора AMPA с 50% ингибирующей концентрацией (IC₅₀) 4,6 мкМ (14,2 мкг/мл), основанной на связывании лиганда, и функциональным IC₅₀ 300-600 нМ (0,9-1,8 мкг/мл) на основе активности фиксации потенциала. Рецепторы AMPA представляют собой ионные каналы в возбуждающих синапсах ЦНС, которые опосредуют быструю возбуждающую нейротрансмиссию и, следовательно, являются ключевыми компонентами всех нейронных сетей. Такое взаимодействие с рецептором AMPA могло бы объяснить результаты, опосредованные ЦНС, наблюдаемые при высоких дозах RGLS4326 в моделях

доклинической токсикологии.

Пример 2. Скрининг соединений антитела к miR-17 со сниженным связыванием с рецептором AMPA

[000277] RGLS4326 имеет следующую последовательность и структуру химической модификации: $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S G_S$, где нуклеозиды, за которыми следует индекс «M», представляют собой 2'-O-метилнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой нуклеозиды S-cEt, каждый цитозин представляет собой метилированный цитозин, а все связи представляют собой тиофосфатные связи. Варианты химической модификации и длины RGLS4326 были разработаны и проверены для идентификации соединения, которое сохраняет эффективность и фармакокинетический профиль RGLS4326 и демонстрирует пониженное связывание с рецептором AMPA (AMPA-R).

[000278] Была разработана библиотека соединений с различными химическими модификациями, последовательностью азотистых оснований и длиной относительно RGLS4326.

Таблица 2. Библиотека антител к miR-17

№ соединения	Химическое обозначение	Последовательность азотистых оснований	SEQ ID NO	Длина
RG-NG-1001	$A_S G_S C_S A_S C_S U_S U_S U_S G_S$	AGCACUUUG		9
RG-NG-1002	$A_S G_S C_S A_S C_S U_S U_S U_S$	AGCACUUU-		8
RG-NG-1003	$A_S G_S C_M A_S C_M U_S U_M U_S G_S$	AGCACUUUG		9
RG-NG-1004	$U_S A_S A_S G_S C_S A_S C_S U_S U_S U_S G_S$	UAAGCACUUUG	12	11
RG-NG-1005	$U_S A_S A_M G_C S A_S C_S U_M U_M U_S G_S$	UAAGCACUUUG	13	11
RG-NG-1006	$A_L G_L C_L A_L C_L T_L T_L T_L G_L$	AGCACTTTG		9
RG-NG-1007	$A_S G_S C_F A_F C_F U_F U_F U_S G_S$	AGCACUUUG		9
RG-NG-1008	$A_S G_E C_M A_F C_F U_F U_M T_E G_S$	AGCACUUTG		9
RG-NG-1009	$A_E G_E C_M A_F C_F U_F U_M T_E G_E$	AGCACUUTG		9
RG-NG-1010	$A_E G_E C_M A_F C_F U_F U_M U_S G_S$	AGCACUUUG		9
RG-NG-1011	$A_L G_L C_M A_F C_F U_F U_M U_S G_S$	AGCACUUUG		9
RG-NG-1012	$A_S G_L C_M A_F C_F U_F U_M T_L G_S$	AGCACUUTG		9
RG-NG-1013	$A_S A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S$	AAGCACUUU-		9
RG-NG-1014	$A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S$	AGCACUUU-		8
RG-NG-1015	$A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S A_S$	AGCACUUUA		9
RG-NG-1016	$A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S C_S$	AGCACUUUC		9
RG-NG-1017	$A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S U_S$	AGCACUUUU		9

RG-NG-1018	A _E C _E T _E G _S T _E A _A S _G S _C M _A F _C F _U F _U M _U S _C S	ACTGTAAGCACUUU C	14	15
RG-NG-1019	A _S C _S TG _S U _S A _A S _G S _C M _A F _C F _U U _M U _S C _S	ACTGUAAGCACUUU C	15	15
RG-NG-1020	T _E G _S T _E A _A S _G S _C M _A F _C F _U F _U M _U S _C S	TGTAAGCACUUUC	16	13
RG-NG-1021	T _E A _A S _G S _C M _A F _C F _U F _U M _U S _C S	TAAGCACUUUC	17	11
RG-NG-1022	T _E A _E A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S C _S	TAAGCACUUUC	18	11
RG-NG-1023	A _E G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _E	AGCACUUUG		9
RG-NG-1024	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M T _E G _E	AGCACUUTG		9
RG-NG-1025	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _E	AGCACUUUG		9
RG-NG-1026	A _S G _S C _M A _L C _F U _F U _M U _S C _S	AGCACUUUC		9
RG-NG-1027	A _S G _S C _S A _F C _F U _F U _M U _S C _S	AGCACUUUC		9
RG-NG-1028	A _S G _S C _S A _L C _F U _F U _M U _S C _S	AGCACUUUC		9
RG-NG-1029	A _M G _L C _L A _L C _L U _M T _L U _C _M	AGCACUTUC		9
RG-NG-1030	A _M A _M G _L C _L A _L C _L U _M T _L U _C _M	AAGCACUTUC	19	10
RG-NG-1031	A _M A _M G _L C _L A _L C _L U _M T _L U _M	AAGCACUTU-		9

Нуклеозиды, за которыми следует индекс «М», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды; нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды; нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой нуклеозиды S-cEt; нуклеозиды, за которыми следует индекс «E», представляют собой 2'-О-метоксиэтиловые (2'-МОЕ) нуклеозиды; а нуклеозиды, за которыми следует индекс «L», представляют собой нуклеозиды LNA.

[000279] Активность соединений антитела к miR-17 оценивали с помощью анализа связывания радиолиганда, в котором измеряли связывание лиганда [³H] АМРА с АМРА-R, присутствующим на синаптических мембранах головного мозга крысы, в присутствии возрастающих концентраций соединения антитела к miR-17. Соединения антитела к miR-17, обладающие аффинностью с АМРА-R, будут связываться с лигандом [³H] АМРА и конкурировать с ним.

[000280] Анализ проводили согласно ранее опубликованным методам (Honore et al., *J Neurochem.*, 1982, 38(1):173-178; Olsen et al., *Brain Res.*, 1987, 402(2):243-254). 5,0 нМ лиганда [³H] АМРА, 1,0 мМ неспецифического лиганда L-глутаминовой кислоты и соединение антитела к miR в мкМ концентрациях инкубировали с синаптическими мембранами, полученными из коры головного мозга крыс Wistar, в течение 90 минут. Соединения, представленные в таблице 2, были протестированы в трех экспериментах. Антитела к miR, нацеленные на микроРНК, отличные от miR-17, использовали в качестве

контрольных соединений (RG5124, нацеленный на miR-33a; RG5365, нацеленный на let-7a; RG8093, нацеленный на miR-214). RGLS4326 и RG-NG-1001 также тестировали в каждом эксперименте, поскольку было продемонстрировано их связывание и ингибирование активности AMPA-R. Количество лиганда [³H]-AMPA определяли количественно путем связывания радиолиганда и оно показано в таблицах 3, 4 и 5. Как иллюстрируют данные, соединения различаются по своей способности ингибировать связывание радиоактивно меченного лиганда с AMPA-R.

Таблица 3. Ингибирование связывания лиганда с AMPA-R, эксперимент № 1

№ соединения	SEQ ID NO	Последовательность азотистых оснований и химия (от 5' к 3')	% ингибирования при мкМ				IC ₅₀ (мкМ)
			100	10	1	0,1	
RG-NG-1001		A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S G _S	91,3	89,1	76,2	41,1	0,17
RGLS4326		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	104,1	93	55,5	17,6	0,70
RG-NG-1002		A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S	24,0	- 16,9	-2,0	0	>100
RG-NG-1003		A _S G _S C _M A _S C _M U _S U _M U _S G _S	77,8	56,9	13,9	5,7	9,26
RG-NG-1004	20	U _S A _S A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S G _S	76,1	44,2	4,7	-4,7	17,28
RG-NG-1005	21	U _S A _S A _M G _C <u>S</u> A _S C _S U _M U _M U _S G _S	28,3	0,8	-1,3	10,8	>100
RG-NG-1006		A _L G _L <u>C</u> _L A _L <u>C</u> _L T _L T _L T _L G _L	93,9	68,9	35,3	6,7	2,77
RG5124		A _S C _S A _M A _F U _F G _F C _M A _S C _S (антитело к miR-33a)	-5,1	-3,7	12,9	0,4	>100
RG5365		антитело к let7a	-4	6,5	-6,3	2,4	>100
RG8093		антитело к miR-214	-9,8	-2	11,5	-6,9	>100

Таблица 4. Ингибирование связывания лиганда с AMPA-R, эксперимент № 2

	SEQ ID		% ингибирования при				
--	--------	--	---------------------	--	--	--	--

№ соединения	NO	Химическое обозначение	мкМ				IC ₅₀ (мкМ)
			100	10	1	0,1	
RG-NG-1001		A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S G _S	93,5	90,1	68,3	42,2	0,19
RGLS4326		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	96,8	93,6	73,1	31,5	0,27
RG-NG-1002		A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S	24,6	-2,1	4,6	-5,5	>100
RG-NG-1007		A _S G _S C _F A _F C _F U _F U _F U _S G _S	94,3	83,2	39,7	3,1	1,69
RG-NG-1008		A _S G _E C _M A _F C _F U _F U _M T _E G _S	59,6	22,1	13,6	- 22,4	56,58
RG-NG-1009		A _E G _E C _M A _F C _F U _F U _M T _E G _E	32,6	13	2,7	- 11,8	>100
RG-NG-1010		A _E G _E C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	86,4	70,1	31,3	0,7	3,44
RG-NG-1011		A _L G _L C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	94	78,5	30,6	-2,2	2,56
RG-NG-1012		A _S G _L C _M A _F C _F U _F U _M T _L G _S	88,3	69	38,5	9,9	2,56
RG-NG-1013		A _S A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S	37,2	3,7	-5,6	-3,8	>100
RG-NG-1014		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S	20,4	8,6	-5,5	14,9	>100
RG-NG-1015		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	19,9	6,5	11	2,3	>100
RG-NG-1016		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S C _S	5,9	12,3	10,4	4,7	>100
RG-NG-1017		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S U _S	8,1	4,3	-1,3	0,2	>100
RG-NG-1026		A _S G _S C _M A _L C _F U _F U _M U _S C _S	2,3	-3,5	-1,1	-3,3	>100
RG-NG-1027		A _S G _S C _S A _F C _F U _F U _M U _S C _S	3	-2,2	2,3	-2,2	>100
RG-NG-1028		A _S G _S C _S A _L C _F U _F U _M U _S C _S	2,7	2	2,1	15,7	>100
RG-NG-1029		A _M G _L <u>C</u> _L A _L <u>C</u> _L U _M T _L <u>U</u> _M	38,4	7	15,9	0,9	>100
RG-NG-1030	19	A _M A _M G _L <u>C</u> _L A _L <u>C</u> _L U _M T _L <u>U</u> _M	1,9	15	6,5	2,9	>100
RG-NG-1031		A _M A _M G _L <u>C</u> _L A _L <u>C</u> _L U _M T _L <u>U</u> _M	16,7	2,7	1	-4,3	>100
RG5124		A _S C _S A _M A _F U _F G _F C _M A _S C _S (антитело к miR-33a)	7,2	-4,2	1,6	-1,2	>100

Таблица 5. Ингибирование связывания лиганда с АМРА-Р, эксперимент № 3

SEQ ID NO	% ингибирования при мкМ
-----------	-------------------------

№ соединения		Химическое обозначение	100	10	1	0,1	IC ₅₀ (мкМ)	
RG-NG-1001		A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S G _S	96,6	94,6	84,8	59,4	0,10	
RGLS4326		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	97,2	89	55,8	14,6	0,78	
RG-NG-1018	22	A _F C _E T _E G _S T _E A _A S _G S _C M _A F _C F _U F _U M _U S _C S	12,3	1	8,1	3	>100	
RG-NG-1019	23	A _S C _S T _G S _U S _A A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S C _S	21	15,6	17,2	12,9	>100	
RG-NG-1020	24	T _E G _S T _E A _A S _G S _C M _A F _C F _U F _U M _U S _C S	-7,9	-	23,3	6,6	17	>100
RG-NG-1021	25	T _E A _A S _G S _C M _A F _C F _U F _U M _U S _C s	-1,5	-11,5	-	10,9	-2	>100
RG-NG-1022	26	T _E A _E A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S C _S	10,9	-	-7	-5,4	23,5	>100
RG-NG-1023		A _E G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _E	95,3	75,2	25,6	3,1	3,12	
RG-NG-1024		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M T _E G _E	35,2	6,5	-4,7	-17	>100	
RG-NG-1025		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _E	96,4	84,1	36,5	-3,8	1,85	
RG5124		A _S C _S A _M A _F U _F G _F C _M A _S C _S (антитело к miR-33a)	23	16,1	9,3	5,1	>100	

[000281] Чтобы оценить функциональный антагонизм олигонуклеотидов антитела к miR-17 по отношению к AMPA-R, некоторые олигонуклеотиды были протестированы с использованием ручного метода фиксации потенциала целых клеток, который регистрирует мембранные токи как меру активности AMPA-R.

[000282] Ручные исследования фиксации потенциала целых клеток были проведены компанией Metrion Biosciences (Кембридж, Великобритания). Эксперименты с фиксированием напряжения целых клеток проводились при комнатной температуре (18-21°C) с использованием усилителя фиксации потенциала EPC10 с использованием программного обеспечения Patchmaster (НЕКА Elektronik). Стекланные пэтч-пипетки были изготовлены из капилляров из боросиликатного стекла (Гарвардский аппарат) с сопротивлением от 1,4 до 2,5 МОм. Мембранные токи регистрировали с использованием метода фиксации потенциала целых клеток. Клетки ChanTest® GluA1/GluA4 EZCells фиксировали при удерживающем потенциале -80 мВ и мембранных токах, вызываемых 10 мкМ (S)-AMPA, доставленными с использованием перфузионной системы VC38 (ALA Scientific Instruments). Минимальные значения амплитуды тока измерялись при каждом применении 10 мкМ (S)-AMPA. Дробное изменение амплитуды тока, вызываемое каждой концентрацией соединения, рассчитывали относительно контрольного тока (предварительное соединение) и выражали в виде процентного изменения (%).

ингибирования) для каждой клетки. Исследуемые соединения показаны в таблице 6. RGLS4326 тестировался в отдельном исследовании от всех других соединений в таблице 6.

[000283] Как показано в таблице 6, по сравнению с RGLS4326, соединения RG-NG-1015, RG-NG-1016 и RG-NG-1017 проявляют пониженный функциональный антагонизм по отношению к AMPA-R на основании ручных исследований с использованием фиксации потенциала целых клеток на EZ-клетках ChanTest® GluA1/GluA4 человека.

Таблица 6. Функциональный антагонизм AMPA-R в исследованиях с фиксацией потенциала целых клеток

ID соединения	Последовательность и химия (5'-3')	Мишень	% ингибирования мембранных токов, вызванного 10 мкМ (s)-AMPA (Среднее значение ± SD)	
			0,3 мкМ	3 мкМ
RG-NG-1001	A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S G _S	miR-17	80,5 ± 6,3	88,8 ± 4,5
RGLS4326	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	miR-17	46,9 ± 9,8	87,4 ± 7,9
RG-NG-1015	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	miR-17	16,0 ± 5,0	39,5 ± 5,4
RG-NG-1016	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S C _S	miR-17	16,0 ± 6,2	27,1 ± 9,8
RG-NG-1017	A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S U _S	miR-17	20,0 ± 6,3	28,2 ± 5,5
RG5124	A _S C _S A _M A _F U _F G _F C _M A _S C _S	miR-33a	14,1 ± 7,2	42,1 ± 9,4

Пример 3. Связь между свойствами азотистых оснований и связыванием AMPA-R

[000284] Как показано в исследованиях связывания AMPA-R и исследованиях фиксации потенциала целых клеток, присутствие гуанозина на 3'-конце олигонуклеотида антитела к miR-17, в положении, комплементарном первому нуклеотиду miR-17, влияет на функциональный антагонизм AMPA-R. Как и гуанозин, аденозин является пуриновым, однако аденозин не ингибирует AMPA-R. Гуанозин и аденозин схожи по некоторым свойствам, за исключением водородных связей, поэтому были оценены различия в водородных связях в положениях 1, 2 и 6 пуринового основания. Испытанные пуриновые азотистые основания показаны на фигуре 1 и в таблице 7. В столбце «Положение пурина» таблицы 7 «А» указывает положение пурина, которое является акцептором водорода, а «D» указывает положение пурина, которое является донором водорода. В столбце «Пуриновое положение» таблицы 7 «N» указывает на нейтральное положение, которое не является ни акцептором, ни донором водорода. Также были протестированы различные 2'-сахарные фрагменты пуринового азотистого основания, чтобы оценить влияние химического состава 2'-сахарного фрагмента на способность пуринового азотистого основания ингибировать AMPA-R.

Таблица 7. Соединения антитела к miR-17 с различной химией азотистых оснований и сахарных фрагментов

ID соединения	Азотистое основание на 3-конце (однобуквенное обозначение)	2'-сахарный фрагмент на 3'-конце	SE Q ID NO	Последовательность и химия (5'-3')	Положение пурина		
					№ 6	№ 1	№ 2
RG-NG-1001	гуанозин (G)	S-cEt		A _S G _S C _S A _S C _S U _S U _S U _S G _S	A	D	D
RG-NG-1040	гуанозин (G)	S-cEt	<u>27</u>	<u>C_ET_EG_SC_EA_EC_ET_EG_ST_E</u> A _D A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	A	D	D
RG-NG-1032	гуанозин (G)	S-cEt	28	G _S <u>C_EA_EC_ET_EG_ST_E</u> A _D A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	A	D	D
RG4326	гуанозин (G)	S-cEt		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _S	A	D	D
RG-NG-1033	гуанозин (G)	ДНК		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _D	A	D	D
RG-NG-1034	гуанозин (G)	2'-O-метил		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S G _M	A	D	D
RG-NG-1035	инозин (I)	S-cEt		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S I _M	A	D	N
RG-NG-1036	2-аминопурин (N)	2'-O-метил		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S N _M	N	A	D
RG-NG-1037	2,6-диаминопурин (D)	2'-O-метил		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S D _M	D	A	D
RG-NG-1039	изогуанин (F)	ДНК		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S F _D	D	D	A
RG-NG-1038	аденозин (A)	2'-O-		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S	D	A	N

		метил		A _M			
RG-NG-1015	аденозин (A)	S-cEt		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	D	A	N
RG5124	цитидин (C)	S-cEt		A _S C _S A _M A _F U _F G _F C _M A _S C _S			

[000285] Соединения тестировали в анализе связывания радиолиганда, описанном в настоящем документе, для определения способности соединений антитела к miR-17 связываться с лигандом [³H] АМРА и конкурировать с ним. Как показано в таблице 8, наблюдалась корреляция между ингибированием связывания лиганда с +АМРА-R и наличием акцептора водородной связи в пуриновом положении №6 азотистого основания на 3'-конце олигонуклеотида. Например, соединения, имеющие гуанозин или инозин на 3'-конце, приводят к ингибированию связывания лиганда с АМРА-R. Соединения с 3'-концевым азотистым основанием, имеющим акцептор водородной связи в пуриновом положении №6, например RG-NG-1037 и RG-NG-1039, с меньшей вероятностью ингибировали связывание лиганда с АМРА-R.

Таблица 8. Ингибирование связывания лиганда с АМРА-R

ID	Азотистое основание на 3'-конце	2'-сахарный фрагмент на 3'-конце	Положение пурина			% ингибирования при концентрации				IC50 (мкМ)
			№ 6	№ 1	№ 2	100 мкМ	10 мкМ	1 мкМ	0,1 мкМ	
RG-NG-1001	гуанозин	S-cEt	A	D	D	102,9	99,3	81,3	41,9	0,15
RG-NG-1040	гуанозин	S-cEt	A	D	D	64,1	38,9	14,4	10,4	28,61
RG-NG-1032	гуанозин	S-cEt	A	D	D	92	78,3	43,8	24,3	1,17
RG-NG-4326	гуанозин	S-cEt	A	D	D	99,7	83,5	40,8	-0,1	1,61
RG-NG-1033	гуанозин	ДНК	A	D	D	97,3	96,5	80,9	44,9	0,13
RG-NG-1034	гуанозин	2'-О-метил	A	D	D	99,7	85,2	44,8	14,3	1,20

RG-NG-1035	инозин	S-cEt	A	D	N	98,5	91,3	46,3	27,2	0,76
RG-NG-1036	2-аминопурин	2'-O-метил	N	A	D	78,1	36,2	11,3	19,2	18,61
RG-NG-1037	2,6-диаминопурин	2'-O-метил	D	A	D	10,7	2,4	9,2	11,1	100,00
RG-NG-1039	изогуанин	ДНК	D	D	A	30,2	35,8	27	27,3	100,00
RG-NG-1038	аденозин	2'-O-метил	D	A	N	81,3	47,4	25,4	17,9	8,23
RG-NG-1015	аденозин	S-cEt	D	A	N	5,6	-7	-	10,3	0,8
RG5124	цитидин	S-cEt				10,1	4,4	-0,6	-	8,6

Пример 4. Соединения антитела к miR-17 со сниженным связыванием и ингибированием АМРА-R не показали токсичности для ЦНС в исследованиях с высокими дозами

[000280] RG-NG-1015, RG-NG-1016 и RG-NG-1017 были протестированы в исследованиях токсичности высоких доз на мышах. Каждое соединение тестировали в однократной дозе 2000 мг/кг и в возрастающих дозах (100, 450 и 2000 мг/кг). Как показано в таблице 9, хотя увеличение доз RG-NG-1001 и RGLS4326 приводило к атаксии, летаргии, а в случае RGLS4326 к потере сознания при самой высокой дозе, токсичности для ЦНС не наблюдалось для RG-NG-1015, RG-NG-1016 или RG-NG-1017.

Таблица 9. Соединения антитела к miR-17 и данные, связанные с ЦНС

	Мыши/ группа	Подкожное введение (мг/кг/доза)	Схема введения	Результаты, связанные с ЦНС, отметили:
RG-NG-1001	8	100, 450, 2000	QDx3	Легкое расчесывание тела и атаксия наблюдаются при дозе 100 и усиливаются при дозе 450 мг/кг; летаргия наблюдалась при дозе 2000 мг/кг.
RGLS4326	10	100, 450, 2000	QDx4	Атаксия и/или летаргия наблюдались при дозе 450 мг/кг;

				атаксия, летаргия и/или потеря сознания наблюдались при дозе 2000 мг/кг.
RG-NG-1015	7	2000	Один раз	Нет
	6	100, 450, 2000	QDx4	Нет
RG-NG-1016	10	2000	Один раз	Нет
	6	100, 450, 2000	QDx4	Нет
RG-NG-1017	10	2000	Один раз	Нет
	6	100, 450, 2000	QDx4	Нет
RG5124	7-10	100, 450, 2000	QDx3	Легкая атаксия наблюдалась при дозе 2000 мг/кг.

Пример 5. Исследование максимально переносимой дозы (MTD) и сравнительная оценка доз различных соединений

[000286] Данные приведенных ниже исследований дополнительно подтверждают, что антагонизм AMPA-R ответственен за токсичность и смертность для ЦНС, наблюдавшиеся в предыдущих исследованиях токсичности RGLS4326.

[000287] Исследование 1. Исследование максимально переносимой дозы (MTD) и сравнительная оценка дозы RG-NG-1017, RGLS4326 и RG-NG-1001.

[000288] Соединения (RG-NG-1017, RGLS4326, RG-NG-1001) оценивали в первоначальном исследовании максимально переносимой дозы (MTD) (обсуждается ниже). RG-NG-1017, RGLS4326 и RG-NG-1001 первоначально оценивались при четырех уровнях доз каждый. RG-NG-1017 был включен для оценки как соединение, не связывающее AMPA-R, по сравнению с RGLS4326 и RG-NG-1001, которые связывают AMPA-R. В этом исследовании использовали самцов мышей C57Bl/6J (Jackson Laboratories) в возрасте 6-7 недель. Мышей случайным образом распределяли по группам лечения, и исследование было с обезличенными данными. Животным давали возможность акклиматизироваться в течение не менее 5 дней и содержали их при 12-часовом цикле света/темноты (свет в 7:00 утра). В каждой клетке в вентилируемой стеллажной системе содержалось не более 4 мышей. Рацион состоял из стандартного корма для грызунов и воды вволю.

[000289] Первоначальное исследование MTD

[000290] Для данного исследования были использованы следующие параметры:

1. Путь(-и) введения: интрацеребровентрикулярное (ICV) введение RG-NG-1017, RG-NG-1001, RGLS4326.
2. Объем(-ы) дозы: 4 мкл
3. Состав(-ы): среда-носитель, Ca^{2+} и Mg^{2+} , не содержащие dPBS
4. Частота дозы: один раз
5. Продолжительность исследования: 8 дней
6. Количество групп: 3
7. Количество животных на группу: (2-4 каждая группа)
8. Общее количество животных: 54

[000291] Для введения ICV мышей анестезировали и помещали для инъекций. Кожу над черепом разрезали и с помощью микросверла в черепе над мишенью делали небольшое отверстие. Стереотаксические координаты: переднезадний (AP), -0,4 мм; медиолатеральный (ML), +/- 1,0-1,5 мм; дорсовентральный (DV), -3,0 мм от брегмы для инъекции как в правый, так и в левый боковые желудочки мозга (Hironaka et al, 2015). Животным в одностороннем порядке вводили 4 мкл в правый боковой желудочек головного мозга. Соединения вводили в течение 1-2 мин, и иглу оставляли на месте на 0,5-1 мин перед извлечением. Разрез закрывали швами, зажимами или VetBond.

[000292] После лечения ICV (день 0) за животными наблюдали в течение 7 дней, в течение которых ежедневно регистрировали состояние здоровья, массу тела и смертность. На 7-й день мозг и почки собирали, фиксировали (10% формалин) и хранили для гистологического исследования.

[000293] Результаты исследования MTD показаны в таблице 10 и на фигуре 3. Сообщалось, что все случаи гибели животных происходили в течение первых 5-8 часов после инъекции ICV. Сообщалось, что у мышей, которым вводили 2,5 мкг RG4326, проявлялись некоторые немедленные признаки респираторного дистресса, и им давали грелки. RG-NG-1017 (соединение, не связывающее AMPA-R) хорошо переносился в высоких дозах, без установленной MTD для этого соединения (0 смертей при 600 мкг, 100 мкг или 50 мкг; 1 смерть при 300 мкг). 100% смертность наблюдалась при высоких дозах RG4326 и RG-NG-1001 (*например*, 600, 300, 100 мкг), в дополнение к 100% смертности, наблюдаемой при 50 мкг и 25 мкг для обоих соединений, связывающих AMPA-R. MTD RG-NG-1001 не была достигнута в этом исследовании, и прогнозировалось, что она будет ниже 2,5 мкг. MTD для RG4326 была предсказана ICV на уровне ~2,5 < 5,0 мкг. Сообщалось, что все животные полностью выздоровели на второй день наблюдения.

Таблица 10. Обобщенные результаты 7-дневного исследования MTD

Доза (мкг)	Смертность/общее количество мышей		
	RG-NG-1017	RGLS4326	RG-NG-1001
600	0/2	2/2	2/2

300	1/2	2/2	2/2
100	0/2	2/2	2/2
50	0/2	3/3	3/3
25		3/3	3/3
10		3/4	3/4
5		2/4	4/4
2,5		0/3	1/3

[000294] Исследование максимально переносимой дозы (MTD) для RGLS4326

[000295] Второе исследование MTD для RGL4326, проведенное ICV, было проведено для оценки выбора дозы для оценки соединения в моделях заболеваний (таблица 11). В этом исследовании оценивали другую линию мышей (самцы мышей Swiss:Rjor1, возраст 5 недель, от Janvier). Мышам вводили изофлурановую анестезию (5% для индукции и 2% для поддержания, под 100% O₂) и вводили подкожно 5 мг/кг карпрофена (Римадил®). Затем их поместили в стереотаксическую рамку. Был сделан срединный сагиттальный разрез черепа и просверлено отверстие в черепе над левым боковым желудочком. Канюлю из нержавеющей стали (наружный диаметр 0,51 мм) стереотаксически помещали в левый боковой желудочек по следующим координатам: +0,5 кзади от брегмы, L ± 0,7 мм, V=-2,7 мм. После 2-минутной задержки, позволяющей ткани головного мозга скользить по канюле, в течение 2 минут медленно вводили 4 мкл раствора, содержащего 0,625 мг/мл RG4326. После инфузии канюлю оставляли на месте еще на 5 минут, чтобы предотвратить обратный ток раствора по ходу канюли. Мышам вводили 5 мг/кг подкожно карпрофен (Римадил®) через 24 и 48 часов после операции. За мышами наблюдали в течение 3-7 дней после операции (начиная с 24 часов после введения ICV) и ежедневно измеряли массу их тела для проверки состояния их здоровья. У мышей, за которыми наблюдали в течение 7 дней, массу тела измеряли на 1-й и 7-й день после операции для проверки состояния их здоровья.

Таблица 11. Схема исследования MTD для RGLS4326

Группа	Количество животных	Обработка (RG4326)	Уровень дозы	Концентрация (мг/мл)	Объем введения
1	4 самца	RG4326 (i.c.v.)	3 мг/мышь	0,75 мг/мл	4 мл/мышь
2	4 самца	RG4326 (i.c.v.)	4 мг/мышь	1 мг/мл	4 мл/мышь
3	4 самца	RG4326 (i.c.v.)	5 мг/мышь	1,25 мг/мл	4 мл/мышь
4	4 самца	RG4326 (i.c.v.)	7,5 мг/мышь	1,875 мг/мл	4 мл/мышь

[000296] В исследовании 1 6 мышам вводили по 4 мкл раствора в концентрации 0,625 мг/мл (всего 2,5 мкг на ICV; таблица 10). По окончании анестезии мыши оставались лежать на боку. В первые часы после операции они были тихими, иногда чесались. Никаких токсических эффектов не наблюдалось через 24, 48 или 72 часа у 6 мышей, получивших дозу. В исследовании 2 четырем мышам вводили 4 разные дозы RGLS4326

(0,75, 1,0, 1,25 и 1,875 мг/мл, объем 4 мкл). Одна мышь, получившая самую высокую дозу (1,875 мг/мл, т.е. 7,5 мкг/мышь), была обнаружена мертвой примерно через 24 часа после инъекции ICV. Все остальные мыши были здоровы до конца предварительного исследования (7 дней после введения).

[000297] Совокупные результаты исследований 1 и 2 показали, что RG4326 в целом хорошо переносился испытуемыми, но только в дозах, значительно меньших, чем RG-NG-1017 (см. фиг. 3).

[000298] В таблице 12 обобщены данные MTD для RGLS4326 для мышинных моделей исследования 1 и 2. На основании этих результатов исследования 2 было предсказано MTD ~ 4 мкг для RGLS4326 у линии мышей Swiss:Rjorl.

Таблица 12. Данные 7-дневной выживаемости для исследований MTD 1 и 2

Доза (мкг) RGLS4326	Мертвые/всего Мыши	
	Исследование 1	Исследование 2
600	2/2	
300	2/2	
100	2/2	
50	3/3	
25	3/3	
10	3/4	
7,5	-	1/4
5	2/4	0/4
4		0/4
3		0/4
2,5	0/3	0/6

[000299] Таким образом, соединения RG-NG-1017, RGLS4326 и RG-NG-1001 оценивались в двух исследованиях MTD, продемонстрировав значительные различия в переносимости между соединениями, не связывающими AMPA-R (RG-NG-1017), и соединениями, связывающими AMPA-R (RGLS4326, RG-NG-1001) (см. фиг. 3). Несмотря на 1 смерть при дозе ICV 300 мкг, MTD не была установлена для RG-NG-1017, поскольку при более высокой испытанной дозе 600 мкг смертельных случаев не произошло. Кроме того, никакого влияния на смертность не наблюдалось при дозах 100 и 50 мкг RG-NG-1017. Для сравнения, явное влияние на смертность было очевидно для соединений, связывающих AMPA-R, RGLS4326 и RG-NG-1001, при этом в тестируемом диапазоне доз от 25 мкг до 600 мкг выживших животных не было. Тенденция к улучшению выживаемости наблюдалась при более низких дозах RGLS4326 (10 мкг): 50%

выживаемость у животных, получавших RGLS4326, при дозе 5 мкг и 100% выживаемость при дозе 2,5 мкг. Аналогичным образом, в случае RG-NG-1001 (который демонстрирует более сильное связывание AMPA-R по сравнению с RGLS4326) 100% смертность была очевидна при низкой дозе 5 мкг с тенденцией к улучшению выживаемости при дозе 2,5 мкг. Результаты для RGLS4326 из исследования 1 были дополнительно подтверждены во втором исследовании MTD (исследование 2) с использованием другой линии мышей. Это исследование показало, что между штаммами могут существовать умеренные различия в переносимости RGLS4326, при этом выживаемость влияет только на мышей при максимальной дозе 7,5 мкг по сравнению с 5 мкг в исследовании 1 с использованием C57/Bl/6J. Тем не менее, эти результаты по-прежнему подтверждают, что MTD для связывания AMPA-R RGLS4326 составляет от ~ 2,5 мкг до 5-7,5 мкг (в зависимости от штамма) по сравнению со значительно более высоким MTD для связывания RG-NG-1017, не связывающего AMPA-R (по меньшей мере > в 40 раз или выше) (фиг. 3).

Пример 6. Эффективность соединений антитела к miR-17 *in vitro* и *in vivo*.

[000300] Эффективность определенных соединений *in vitro* оценивали с помощью сенсорного анализа люциферазы miR-17, в котором используется репортерный вектор люциферазы для miR-17 с двумя полностью комплементарными сайтами связывания miR-17, расположенными в тандеме в 3'-UTR гена люциферазы. Клетки HeLa совместно трансфицировали репортерным вектором люциферазы и экзогенным вектором экспрессии miR-17, который подавлял сигнал люциферазы. Затем клетки HeLa отдельно обрабатывали олигонуклеотидами антитела к miR-17 в концентрациях 0,045, 0,137, 0,412, 1,23, 3,70, 11,1, 33,3, 100 и 300 нМ. В конце 18-24-часового периода трансфекции измеряли активность люциферазы. RG5124 был включен в качестве контрольного соединения. Как показано в таблице 13, эти соединения ингибировали функцию miR-17 и дерепрессировали репортерную активность люциферазы miR-17 с аналогичными значениями EC₅₀ по сравнению с RGLS4326 *in vitro*.

Таблица 13. Ингибирование miR-17 в анализе люциферазы

ID соединения	EC ₅₀ (нМ)	Log ₂ FC (37,5 нМ)
RGLS4326	18,50	2,70
RG-NG-1032	< 1	3,85
RG-NG-1015	22,40	2,51
RG-NG-1016	20,30	2,32
RG-NG-1017	15,00	2,67
RG5124	н/д	0,40

[000301] Как показано на фигуре 4, RG-NG-1015 ингибировал miR-17, а также miR-20a, miR-106a и miR-93 в анализе люциферазы в клетках HeLa, с аналогичными значениями EC₅₀ по сравнению с RGLS4326 *in vitro*.

[000302] RG-NG-1015 также дерепрессировал сенсоры люциферазы, содержащие

полноразмерную 3'-нетранслируемую область (UTR) целевых генов прямой miR-17 PKD1 и PKD2, с аналогичными значениями EC₅₀ по сравнению с RGLS4326 *in vitro*.

[000303] Активность определенных соединений оценивали с использованием мышинной фармакодинамической сигнатуры miR-17 (miR-17 PD-Sig), которая состоит из экспрессии 18 уникальных целевых генов miR-17, нормализованных шестью эталонными генами домашнего хозяйства, чтобы обеспечить объективную и комплексную оценку активности miR-17. Показатель PD-Sig мышинной miR-17 представлял собой рассчитанное среднее значение индивидуальных log₂-кратных изменений 18 генов (нормализованных по шести генам домашнего хозяйства) по сравнению с имитацией трансфекции (Lee et al., *Nat. Commun.*, 2019, 10, 4148).

[000304] Как показано в таблице 13, тестируемые олигонуклеотиды ингибировали функцию miR-17 и дерепрессировали экспрессию множества прямых целевых генов miR-17 (согласно измерению по PD-сигнатуры miR-17) в здоровых линиях клеток почек и PKD (как мыши, так и человека) с аналогичными значениями EC₅₀ по сравнению с RGLS4326 *in vitro*. PD-Sig для RGLS4326 в клетках mIMCD3 (77,2, обозначено «*») в этом эксперименте не генерировался; значение в таблице 14 соответствует значению, указанному Lee et al., *Nat. Commun.*, 2019, 10, 4148. Пустые ячейки в таблице указывают на то, что соединение не тестировалось в конкретной клеточной линии.

Таблица 14. PD-Sig miR-17 в здоровых клеточных линиях и линиях PKD

Клеточная линия	Вид	Получено из	Антитело к miR				
			RGLS4326	RG-NG-1015	RG-NG-1016	RG-NG-1017	RG5124
mIMCD3	мышь	здоровая	77,2*	168	146,3	134,5	н/д
D52B5	мышь	PKD	92,8	82,4		74,1	506,6
HK-2	человек	здоровая	47,8	55,6		49,2	
WT9-7	человек	PKD	17,3	21,2		20,1	

[000305] Эффективность *in vivo* оценивали с использованием анализа полисомального сдвига микроРНК (miPSA). Этот анализ использовали для определения степени, в которой соединения непосредственно связываются с мишенью miR-17 в почках у здоровых мышей и мышей с PKD. В основе miPSA лежит принцип, согласно которому активные микроРНК связываются со своими мишенями мРНК в трансляционно активных полисомах с высокой молекулярной массой (HMW), тогда как ингибированные микроРНК находятся в полисомах с низкой молекулярной массой (LMW). Обработка антителом к miR приводит к сдвигу микроРНК от полисом HMW к полисомам LMW. Таким образом, miPSA обеспечивает прямое определение связывания мишени микроРНК с помощью комплементарного антитела к miR (Androsavich et al., *Nucleic Acids Research*, 2015, 44: e13).

[000306] Мышам дикого типа вводили однократную дозу 0,3 мг/кг, 3 мг/кг или 30

Плазма крови	RGLS4326	26,0 мг/кг	1 ч	32 мг/мл	95,3 (мг*ч)/мл	2,9 ч	-
	RG-NG-1015	26,9 мг/кг	1 ч	26 мг/мл	86,9 (мг*ч)/мл	2,6 ч	-
Почки	RGLS4326	26,0 мг/кг	8 ч	54 мг/г	395 (мг*д)/г	9,4 д	23,9
	RG-NG-1015	26,9 мг/кг	8 ч	53 мг/г	447 (мг*д)/г	9,9 д	22,6
Печень	RGLS4326	26,0 мг/кг	1 ч	4,8 мг/г	16,5 (мг*д)/г	4,7 д	-
	RG-NG-1015	26,9 мг/кг	1 ч	5,2 мг/г	19,8 (мг*д)/г	6,2 д	-

Пример 7. Эффективность RG-NG-1015 в экспериментальной модели ADPKD

[000308] Эффективность RG-NG-1015 оценивали на мышинной модели *KspCre/Pkd1F/RC* (*Pkd1-F/RC*). *Pkd1-F/RC* представляет собой ортологическую модель ADPKD, которая содержит гипоморфную мутацию *Pkd1* зародышевой линии (мышинный эквивалент человеческого PKD1-R3277C (мутация RC) на одном аллеле и сайтах loxP, фланкирующих экзоны 2 и 4 *Pkd1* на другом аллеле. Рекомбинацию, опосредованную *KspCre*, использовали для удаления флоксированных экзонов *Pkd1* и получения сложной мутантной мыши со специфичной для почечных канальцев соматической нулевой мутацией на одном аллеле и гипоморфной мутацией зародышевой линии на другом. Это агрессивная, но долгоживущая модель ADPKD (Hajarnis et al., *Nat. Commun.*, 2017, 8, 14395).

[000309] В каждый из дней 8, 10, 12 и 15 жизни мышам *Pkd1-F/RC*, подобранным по полу, вводили подкожную инъекцию RGLS4326 в дозе 20 мг/кг (n=8; 4 самца и 4 самки на группу лечения), RG5124 в дозе 20 мг/кг (n=8), или RG-NG-1015 в дозе 20 мг/кг (n=8), или ФСБ (n=8). Мышей умерщвляли в возрасте 18 дней и измеряли массу почек, массу тела, показатель кист, уровень креатинина в сыворотке и уровень азота мочевины в крови (АМК). Уровень АМК является маркером функции почек. Более высокий уровень АМК коррелирует с ухудшением функции почек, поэтому снижение уровня АМК является показателем уменьшения повреждения почек и улучшения их функции. Статистическую значимость рассчитывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с множественной коррекцией Даннетта.

[000310] Результаты показаны в таблице 17 и на фигуре 2 (****=p<0,0001; ***=p<0,001; **=p<0,01; ns=незначительно). Эффективность RG-NG-1015 была аналогична эффективности RGLS4326. Среднее соотношение массы почек к массе тела (отношение KW/BW) было значительно ниже у мышей *Pkd1-F/RC*, получавших RGLS4326 и RG-NG-1015 соответственно, чем среднее соотношение KW/BW у мышей

Pkd1-F/RC, получавших ФСБ (фиг. 2А). Средние уровни АМК были значительно снижены у мышей *Pkd1*-F/RC, обработанных RGLS4326 и RG-NG-1015 соответственно, по сравнению с мышами, обработанными ФСБ (фиг. 2В). Средние уровни креатинина в сыворотке у мышей *Pkd1*-F/RC были снижены у мышей, обработанных RGLS4326 и RG-NG-1015 соответственно, по сравнению с мышами, обработанными ФСБ, однако снижение не было статистически значимым (фиг. 2С). Лечение контрольным олигонуклеотидом RG5124 не приводило к снижению соотношения массы почек к массе тела, сывороточного креатинина или сывороточного АМК, демонстрируя, что результаты, наблюдаемые с RGLS4329 и RG-NG-1015, были специфичны для ингибирования miR-17.

Таблица 17. Эффективность RG-NG-1015 на мышинной модели ADPKD

	ФСБ	RGLS4326	RG-NG-1015	RG5124
Среднее значение Соотношение BW/KW	65,61	16,81	16,83	91,75
Средняя разница по сравнению с ФСБ		-48,8	-48,79	26,14
Скорректированное Р-значение		<0,0001	<0,0001	0,0045
Среднее значение АМК в сыворотке	42,48	22,41	22,26	50,61
Средняя разница по сравнению с ФСБ		-20,06	-20,21	+8,138
Скорректированное Р-значение		<0,0001	<0,0001	0,1142
Среднее значение Креатинин в сыворотке крови	0,1619	0,1273	0,1279	0,2403
Средняя разница по сравнению с ФСБ		-0,03463	-0,03400	+0,07838
Скорректированное Р-значение		0,1456	0,1557	0,0004

[000311] Эффективность RG-NG-1015 также оценивали на мышинной модели *Pcu/DBA* PKD отдельно и в комбинации с толваптаном. У мышей *Pcu/DBA* наблюдается медленно прогрессирующая PKD, вызванная миссенс-мутацией в гене *Nrhp3*, который

отвечает за подростковый нефронофтиз у людей (Takahashi et al., *J Am Soc Nephrol* 1991, 1:980-989; Olbrich et al., *Nat Genet* 2003, 34:455-459). У мышей *Pcy* кисты возникают из дистальных канальцев, и целые сегменты нефронов становятся диффузно занятыми кистами, что сопровождается прогрессированием заболевания к 30-недельному возрасту, часто с возникновением ESRD (Nagao et al., *Exp Anim* 2012, 61:477-488). В частности, самцов мышей *Pcy/DBA* использовали для характеристики фармакологических профилей многих исследуемых продуктов для лечения ADPKD, включая толваптан и RGLS4326, антитело к miR-17 первого поколения (Aihara et al., *J Pharmacol Exp Ther* 2014 May;349(2):258-67 and Lee et al., *Nat. Commun.*, 2019, 10, 4148). Исследования на этих мышцах обычно включают начало лечения в возрасте примерно 5 недель и продолжают до 15-30 недель.

[000312] Как показано на фигурах 6А и 6В, пять групп самцов мышей *Pcy/DBA* (n=13 на группу лечения) получали подкожно ФСБ или RG-NG-1015 в дозе 25, 5, 1 или 0,2 мг/кг один раз каждые две недели (Q2W). Две группы самцов мышей *Pcy/DBA* (n=13 на группу) также обрабатывали RG-NG-1015 в дозе 50 мг/кг один раз каждые четыре недели (Q4W) или в дозе 12,5 мг/кг один раз в неделю (QW). Еще четыре группы самцов мышей *Pcy/DBA* (n=13 на группу) обрабатывали подкожно ФСБ или RG-NG-1015 в дозе 25, 5 или 1 мг/кг Q2W в комбинации с толваптаном в концентрации 0,3% (по массе корма) *вволю*. Группа самцов мышей WT-BDA/2J, получивших подкожные инъекции ФСБ Q2W, была включена в исследование в качестве эталонного диапазона нормы. Мышей рандомизировали на группы лечения в возрасте 5 недель, лечение начинали в возрасте 6 недель в течение 17 недель и умерщвляли через 7 дней после последней обработки. Измеряли массу почек, массу тела, индекс кисты почки, соотношение Ngal/креатинин в моче (Ngal/Cr). Ngal/Cr в моче является маркером повреждения почек.

[000313] Как видно на фигурах 6С-6Е и таблицах 18-20, RG-NG-1015 эффективен в мышинной модели *Pcy/DBA* PKD при различных дозировках и схемах лечения, а также обеспечивает аддитивные или синергические эффекты при использовании в комбинации с толваптаном. В частности, обработка RG-NG-1015 значительно снижала среднее значение KW/BW, Ngal/Cr в моче и показатель кист в почках у мышей *Pcy/DBA* дозозависимым образом (таблица 18 и фигуры 6С-6Е). Кроме того, лечение RG-NG-1015 одинаковой общей дозой (всего 212,5-250 мг на мышью на протяжении всего исследования), но с разными схемами дозирования (включая QW, Q2W и Q4W), снижало среднее значение KW/BW, Ngal/Cr в моче и показатель кист в почках на аналогичных уровнях у мышей *Pcy/DBA* (таблица 19; фигуры 6С-6Е). Лечение только толваптаном снижало среднее значение KW/BW, Ngal/Cr в моче и показатель кист в почках у мышей *Pcy/DBA*, а комбинация RG-NG-1015 с толваптаном дополнительно снижала среднее значение KW/BW, Ngal/Cr в моче и показатель кист в почках (таблица 20; фигуры 6С-6Е). Наблюдаемые эффекты комбинации лекарственных средств на KW/BW, Ngal/Cr в моче и показатель кист в почках были синергическими, в основном аддитивными и менее чем аддитивными, соответственно, как показано аддитивным анализом Блисса (таблица 20).

Таблица 18. Эффекты дозы

Испытуемый образец 1 1 введения дозы SC	Испытуемый образец 2 2 Подача корма	Доза	Схема	Среднее значение KW/BW		Среднее значение Ngal/Cr в моче		Средняя площадь кисты	
				мг/кг	% ингибирования	мг/мл	% ингибирования	%	% ингибирования
Среденоситель	-	-	Q2W	91,3	0	21,07	0	60,62	0
RG-NG-1015	-	25 мг/кг	Q2W	66,87	34,3	11,36	48,8	46,46	26,0
RG-NG-1015	-	5 мг/кг	Q2W	70,02	29,9	14,65	32,3	44,58	29,4
RG-NG-1015	-	1 мг/кг	Q2W	82,43	12,5	15,18	29,6	50,58	18,4
RG-NG-1015	-	0,2 мг/кг	Q2W	78,02	18,7	18,38	13,5	47,09	24,8

Таблица 19. Эффекты схемы

Испытуемый образец 1 1 введения дозы SC	Испытуемый образец 2 2 Подача корма	Доза	Схема	Среднее значение KW/BW		Среднее значение Ngal/Cr в моче		Средняя площадь кисты		Количество из доз	Всего доз (мг)
				мг/кг	% ингибирования	мг/мл	% ингибирования	%	% ингибирования		
Среденоситель	-	-	Q2W	91,3	0	21,07	0	60,62	0	17	
RG-NG-1015	-	25 мг/кг	Q2W	66,87	34,3	11,36	48,8	46,46	26,0	9	225
RG-NG-1015	-	50 мг/кг	Q4W	67,09	34,0	9,32	59,1	47,35	24,3	5	250

		кг									
RG-NG-1015	-	12,5 мг/кг	QW	74,52	23,6	8,82	61,6	44,99	28,7	17	212,5

Таблица 20. Эффекты комбинации

Испытуемый образец 1	Испытуемый образец 2	Доза	Схема	Среднее значение KW/BW			Среднее значение Ngal/Cr в моче			Средняя площадь кисты		
				мг/кг	% ингибирования	Анализ Блисса	мг/кг	% ингибирования	Анализ Блисса	%	% ингибирования	Анализ Блисса
Среденоситель	-	-	Q2W	91,3	0	-	21,07	0	-	60,62	0	-
Среденоситель	0,3% толваптана	-	-	59,26	44,9	-	8,73	62,1	-	44,68	29,2	-
RG-NG-1015	-	25 мг/кг	Q2W	66,87	34,3	-	11,36	48,8	-	46,46	26,0	-
RG-NG-1015	0,3% толваптана	25 мг/кг	Q2W	42,21	68,9	синергетический	5,04	80,6	аддитивный	38,61	40,4	<аддитивный
RG-NG-1015	-	5 мг/кг	Q2W	70,02	29,9	-	14,65	32,3	-	44,58	29,4	-
RG-NG-1015	0,3% толваптана	5 мг/кг	Q2W	45,62	64,1	синергетический	5,84	76,6	аддитивный	37,47	42,5	<аддитивный
RG-NG-1015	-	1 мг/кг	Q2W	82,43	12,5	-	15,18	29,6	-	50,58	18,4	-

RG-NG-1015	0,3% толвапт ана	1 мг/ кг	Q2 W	47, 11	62,0	синергети ческий	11, 16	49,8	<аддит ивный	41, 91	34,3	<аддит ивный
------------	------------------------	----------------	---------	-----------	------	---------------------	-----------	------	-----------------	-----------	------	-----------------

Пример 8. Метаболиты RG-NG-1015.

[000314] Для изучения метаболизма RG-NG-1015 были проведены исследования *in vitro* и *in vivo*. Для образцов как *in vitro*, так и *in vivo* образцы тканей гомогенизировали в лизирующем буфере на льду, а RG-NG-1015 и/или метаболиты выделяли из плазмы, гомогенатов тканей или мочи посредством стадий жидкостно-жидкостной экстракции и твердофазной экстракции. Калибровочные образцы, содержащие известные количества RG-NG-1015, экстрагировали параллельно с образцами тестируемой ткани, плазмы или мочи. Молекулярную массу (MW) RG-NG-1015 и потенциальных метаболитов рассчитывали по сигналу MS и сравнивали с теоретическими значениями.

[000315] Метаболическую стабильность RG-NG-1015 *in vitro* оценивали в тканях мышей, обезьян и человека (т.е. лизатах почек и печени), а также в сыворотке. RG-NG-1015 инкубировали в этих матрицах в концентрации 5 мкМ с гомогенатами почек и печени (что соответствует 307 мкг/г ткани) или образцами сыворотки (что соответствует 15,3 мкг/мл) в течение 24 часов при 37°C. Затем RG-NG-1015 и метаболиты экстрагировали и анализировали с помощью ВЭЖХ-TOF.

[000316] Метаболизм *in vivo* оценивали в печени и почках после однократного введения RG-NG-1015 мышам CD-1, а также в плазме, тканях и моче после однократного и/или многократного введения обезьянам. Мыши CD-1 получали однократную подкожную дозу RG-NG-1015 в дозе 2000 мг/кг, а обезьяны получали до 5 подкожных доз RG-NG-1015 в неделю в дозах 15, 75 или 150 мг/кг. Затем RG-NG-1015 и метаболиты экстрагировали и анализировали с помощью ВЭЖХ-TOF.

[000317] RG-NG-1015 подвергается последовательному гидролизу с 3'- и 5'-концов с образованием метаболитов с укороченной цепью (см. таблицу 21). Было идентифицировано девять потенциальных метаболитов: 5' N-1, 5' N-2, 5' N-3, 5' N-4, 3' N-1, 3' N-2, 3' N-3, 3' N-4 и 3' N-5, как указано ниже в таблице 21. Все метаболиты отличались от RG-NG-1015 последовательным удалением концевых нуклеотидов и терминацией гидроксильных групп на 3'- и 5'-концах. Шортмеры на 5'-конце (от N-5 до N-8) и 3'-конце (от N-6 до N-8) не наблюдались.

Таблица 21. Последовательности, точная масса нейтральной молекулы, m/z и зарядовое состояние RG-NG-1015 и его потенциальных метаболитов.

Название соединения	SE Q ID NO	Последовательность соединения (5' → 3')*	Точная масса нейтральной молекулы	Отношение массы к заряду (m/z)	Состояние заряда	Примечание
RG-NG-		A ₅ G ₅ C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	3064,31	1531,15	-2	Исходная

1015						молекула
3'N-1		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S	2693,26	1345,63	-2	Метаболит
3'N-2		A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M	2345,24	1171,62	-2	Метаболит
3'N-3		A _S G _S C _M A _F C _F U _F	2009,22	1003,61	-2	Метаболит
3'N-4		A _S G _S C _M A _F C _F	1685,23	841,61	-2	Метаболит
3'N-5		A _S G _S C _M A _F	1362,21	680,11	-2	Метаболит
3'N-6		A _S G _S C _M	1015,19	506,59	-2	Не наблюдается
3'N-7		A _S G _S	680,15	339,08	-2	Не наблюдается
3'N-8		A _S	293,11	145,56	-2	Не наблюдается
5'N-1		G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	2693,26	1345,63	-2	Метаболит
5'N-2		C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	2306,22	1152,11	-2	Метаболит
5'N-3		A _F C _F U _F U _M U _S A _S	1971,19	984,59	-2	Метаболит
5'N-4		C _F U _F U _M U _S A _S	1624,16	811,08	-2	Метаболит
5'N-5		U _F U _M U _S A _S	1301,15	649,57	-2	Не наблюдается
5'N-6		U _M U _S A _S	977,15	487,57	-2	Не наблюдается
5'N-7		U _S A _S	641,13	319,57	-2	Не наблюдается
5'N-8		A _S	293,11	145,56	-2	Не наблюдается
5'N+1	29	A _S A _S G _S C _M A _F C _F U _F U _M U _S A _S	3435,35	1717,17	-2	Синтетическ ая примесь

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, причем модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру в ориентации от 5' к 3':



где каждый N'' независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид;

p составляет от 0 до 14; при этом, если p не равно 0, последовательность азотистых оснований (N'') _p комплементарна части равной длины последовательности азотистых оснований miR-17;

каждый N из $(N)_r$ независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а последовательность азотистых оснований $(N)_r$ представляет собой 5'-AGCACUUU-3';

N' представляет собой нуклеозид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент;

q равно 0 или 1; при этом, если q равно 1, азотистое основание N' представляет собой урацильное азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; и

каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина; или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Соединение по п. 1, где структура $(N)_r$ представляет собой:



где нуклеозиды, за которыми следует индекс «M», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды;

нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды; и

нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой нуклеозиды S-cEt.

3. Соединение по п. 1 или п. 2, где по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

4. Соединение по любому из пп. 1-3, где каждая межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

5. Соединение по любому из пп. 1-4, где q равно 1.

6. Соединение по любому из пп. 1-4, где q равно 0.

7. Соединение по любому из пп. 1-6, где p равно 0.

8. Соединение по любому из пп. 1-6, где p выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

9. Соединение по п. 8, где последовательность азотистых оснований (N'') _p имеет не более одного несовпадения с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1).

10. Соединение по п. 8, где последовательность азотистых оснований (N^{''})_p не имеет несовпадений с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1).

11. Соединение по любому из пп. 8, 9 или 10, где последовательность азотистых оснований (N^{''})_p выбрана из CUACCUGCACUGUA (SEQ ID NO: 7), CUACCUGCACUGU (SEQ ID NO: 8), CUACCUGCACUG (SEQ ID NO: 9), CUACCUGCACU (SEQ ID NO: 10), CUACCUGCAC (SEQ ID NO: 11), CUACCUGCA, CUACCUGC, CUACCUG, CUACCU, CUACC, CUAC, CUA, CU и C.

12. Соединение по любому из пп. 1-5 или 7-11, где азотистое основание N['] представляет собой пуриновое азотистое основание, не имеющее акцептора водородной связи в положении 6.

13. Соединение по п. 12, где азотистое основание N['] выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

14. Соединение по любому из пп. 1-13, где сахарный фрагмент N['] не представляет собой 2'-О-метиловый сахар.

15. Соединение по любому из пп. 1-14, где сахарный фрагмент N['] представляет собой 2'-О-метоксиэтиловый сахар или сахар S-cEt.

16. Соединение по п. 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_SA_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин.

17. Соединение по п. 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_SU_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин.

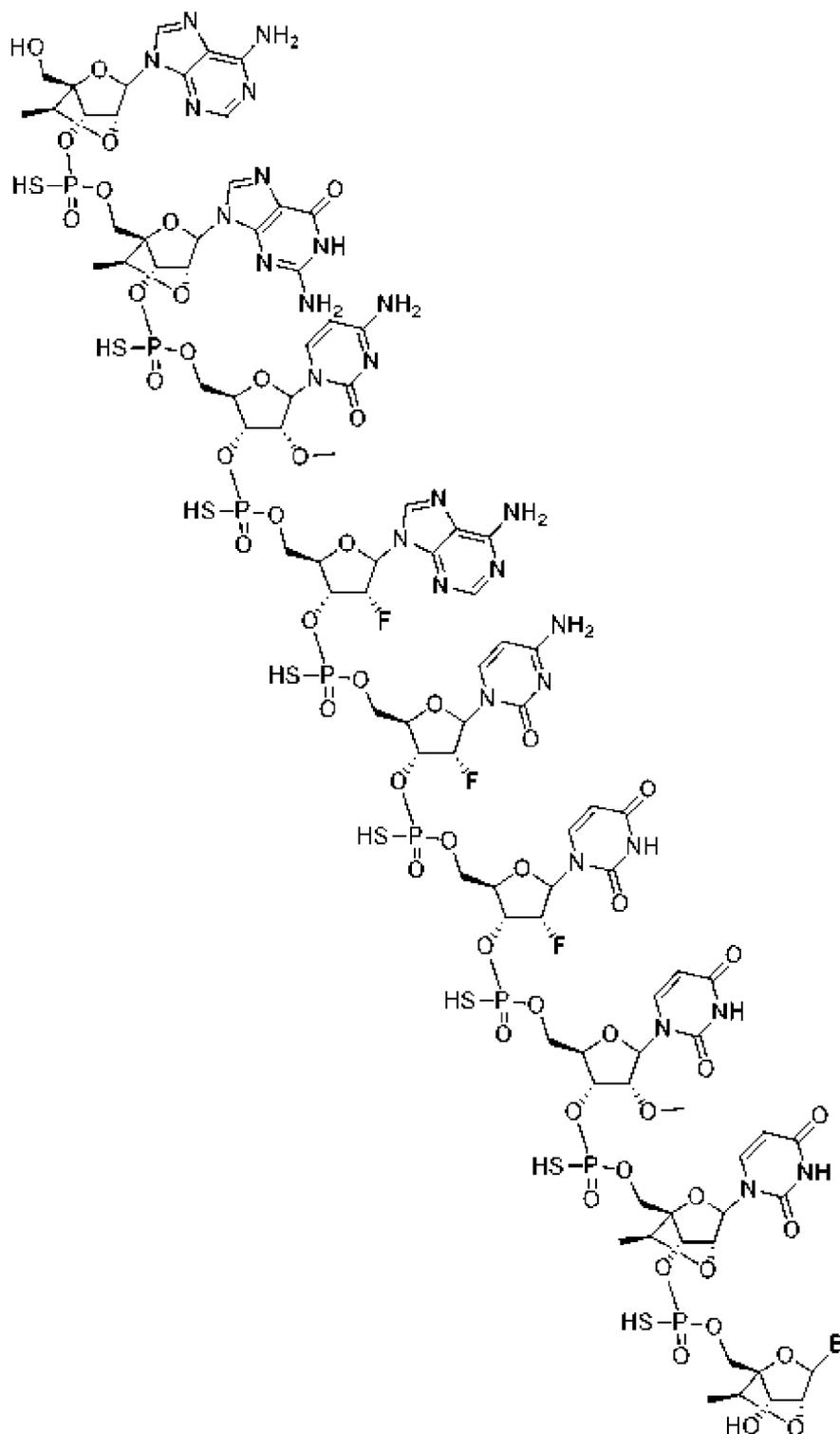
18. Соединение по п. 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_SA_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин.

19. Соединение по п. 2, где структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин.

20. Соединение по любому из пп. 1-19, где соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида.

21. Соединение по любому из пп. 1-20, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

22. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:

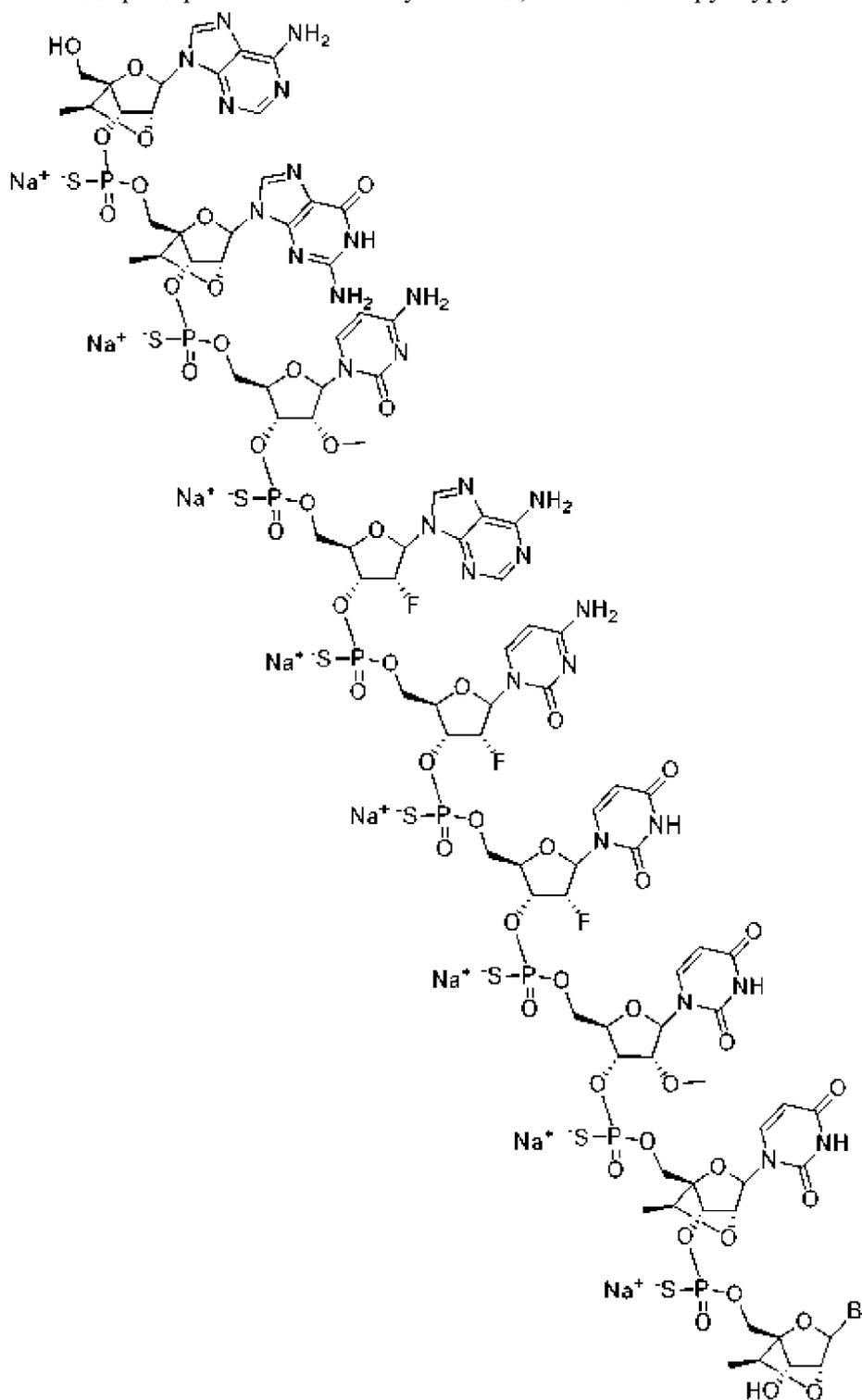


где В представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; или его фармацевтически приемлемая соль

23. Модифицированный олигонуклеотид по п. 22, где В выбран из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

24. Модифицированный олигонуклеотид по п. 22 или п. 23, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

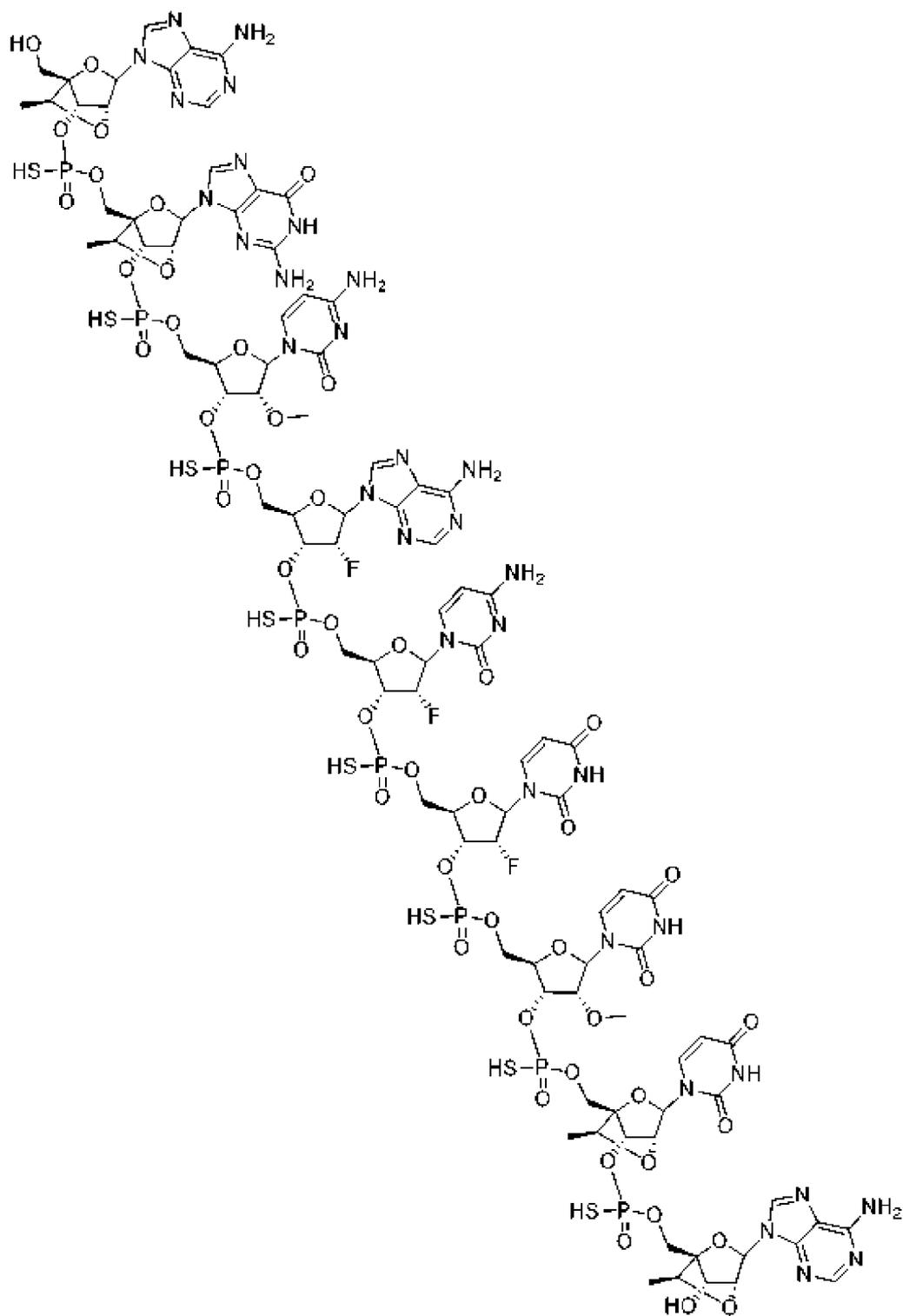
25. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



где В представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6.

26. Модифицированный олигонуклеотид по п. 25, где В выбран из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

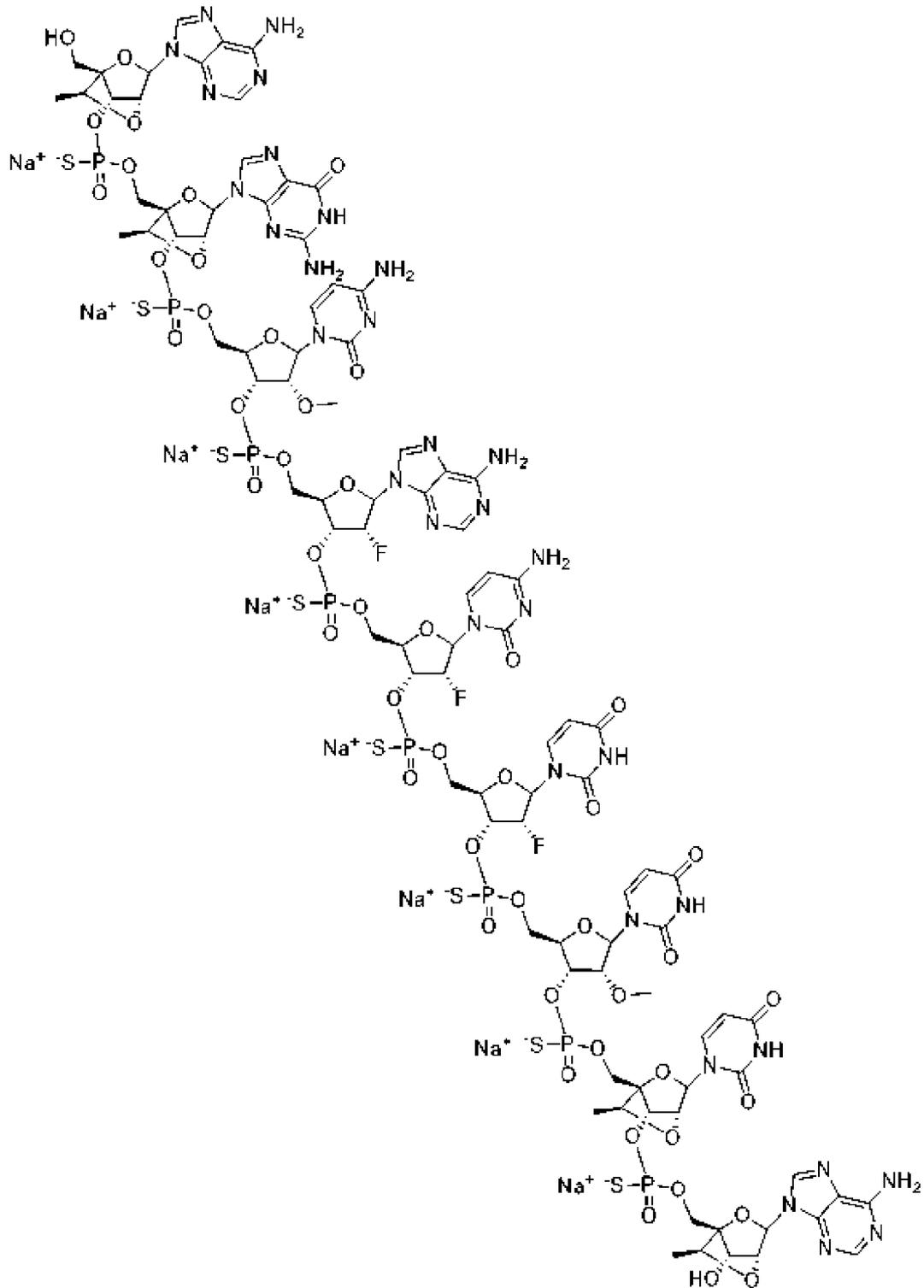
27. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

28. Модифицированный олигонуклеотид по п. 27, где фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

29. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



30. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-21 или модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 22-29 и фармацевтически приемлемый разбавитель.

31. Фармацевтическая композиция по п. 30, где фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой водный раствор.

32. Фармацевтическая композиция по п. 31, где водный раствор представляет собой солевой раствор.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-21

или модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 22-29, которая представляет собой лиофилизированную композицию.

34. Фармацевтическая композиция, состоящая по существу из соединения по любому из пп. 1-21 или модифицированного олигонуклеотида по любому из пп. 22-29 в солевом растворе.

35. Способ ингибирования активности одного или более членов семейства miR-17 в клетке, включающий приведение клетки в контакт с соединением по любому из пп. 1-21 или модифицированным олигонуклеотидом по любому из пп. 22-29.

36. Способ ингибирования активности одного или более членов семейства miR-17 у субъекта, включающий введение субъекту соединения по любому из пп. 1-21, модифицированного олигонуклеотида по любому из пп. 22-29 или фармацевтическую композицию по любому из пп. 30-34.

37. Способ по п. 36, где у субъекта имеется заболевание, связанное с miR-17.

38. Способ лечения поликистозной болезни почек, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения, содержащего модифицированный олигонуклеотид, в котором модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру в ориентации от 5' к 3':



где каждый N'' независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид;

p составляет от 0 до 14; при этом, если p не равно 0, последовательность азотистых оснований $(N'')_p$ комплементарна части равной длины последовательности азотистых оснований miR-17;

каждый N из $(N)_r$ независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а последовательность азотистых оснований $(N)_r$ представляет собой 5'-AGCACUUU-3';

N' представляет собой нуклеозид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент;

q равно 0 или 1; при этом, если q равно 1, азотистое основание N' представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; и

каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина; или его фармацевтически приемлемой соли.

39. Способ по п. 38, где структура $(N)_r$ представляет собой:



где нуклеозиды, за которыми следует индекс «M», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды;

нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды; и нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой

нуклеозиды S-cEt.

40. Способ по п. 38 или п. 39, в котором по меньшей мере одна межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

41. Способ по любому из пп. 38-40, в котором каждая межнуклеозидная связь представляет собой тиофосфатную межнуклеозидную связь.

42. Способ по любому из пп. 38-41, в котором q равно 1.

43. Способ по любому из пп. 38-41, в котором q равно 0.

44. Способ по любому из пп. 38-43, в котором r равно 0.

45. Способ по любому из пп. 38-43, в котором p выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14.

46. Способ по п. 45, в котором последовательность азотистых оснований $(N^m)_p$ имеет не более одного несовпадения с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1).

47. Соединение по п. 45, в котором последовательность азотистых оснований $(N^m)_p$ не имеет несовпадений с последовательностью азотистых оснований miR-17 (SEQ ID NO: 1).

48. Соединение по п. 47, в котором последовательность азотистых оснований $(N^m)_p$ выбрана из CUACCUGCACUGUA (SEQ ID NO: 7), CUACCUGCACUGU (SEQ ID NO: 8), CUACCUGCACUG (SEQ ID NO: 9), CUACCUGCACU (SEQ ID NO: 10), CUACCUGCAC (SEQ ID NO: 11), CUACCUGCA, CUACCUGC, CUACCUG, CUACCU, CUACC, CUAC, CUA, CU и C.

49. Способ по любому из пп. 38-42 или 44-48, в котором азотистое основание N^m представляет собой пуриновое азотистое основание, не имеющее акцептора водородной связи в положении 6.

50. Способ по п. 49, в котором азотистое основание N^m выбрано из аденозина, 2-аминопурина, 2,6-диаминопурина и изогуанозина.

51. Способ по любому из пп. 38-50, в котором сахарный фрагмент N^m не представляет собой 2'-О-метиловый сахар.

52. Соединение по любому из пп. 38-51, в котором сахарный фрагмент N^m представляет собой 2'-О-метоксиэтиловый сахар или сахар S-cEt.

53. Способ по п. 39, в котором структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой $5'-A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S A_S-3'$, и каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин.

54. Способ по п. 39, в котором структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой $5'-A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S U_S-3'$, где каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин.

55. Способ по п. 39, в котором структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой $5'-A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S C_S-3'$, где каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин.

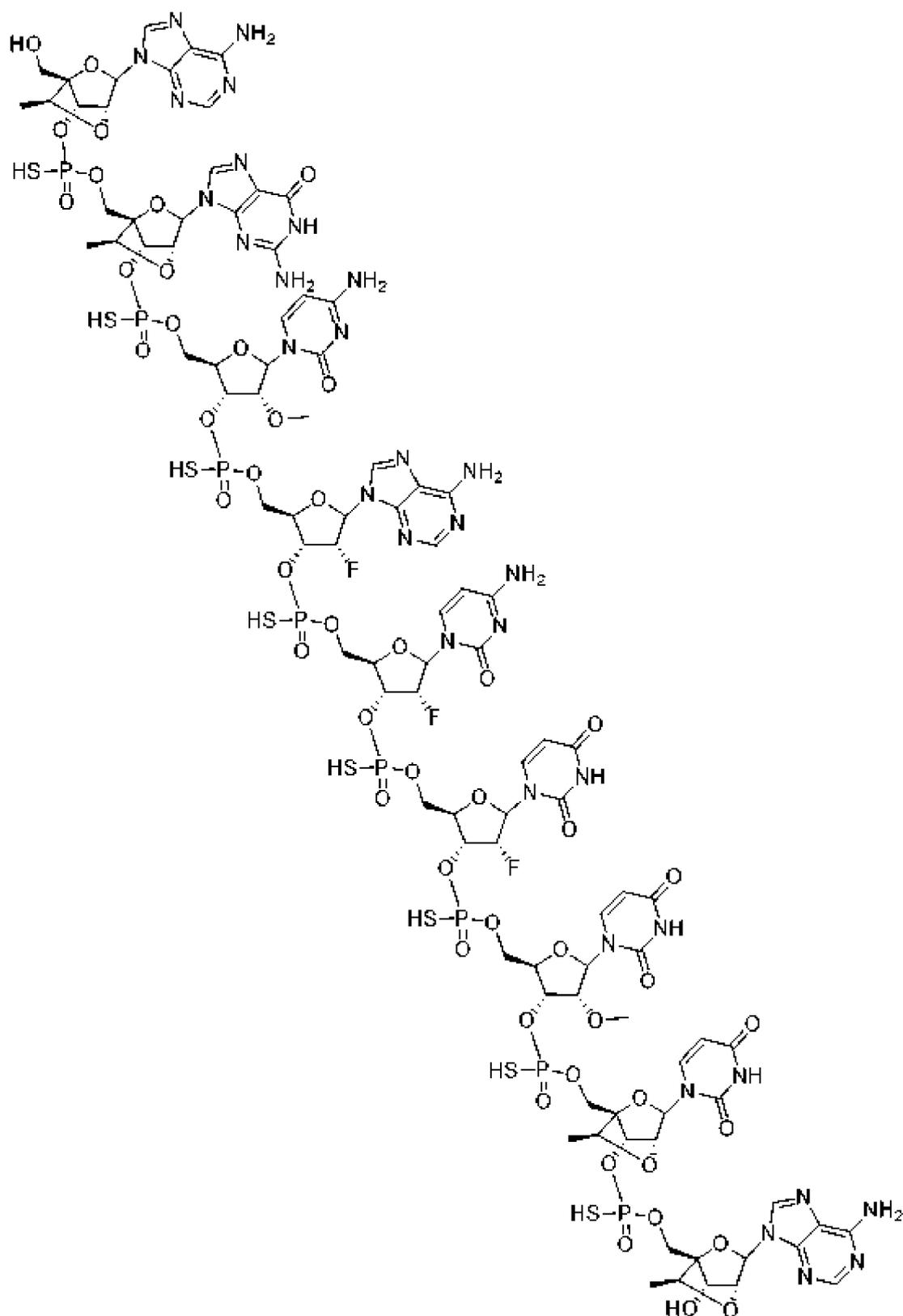
56. Способ по п.39, в котором структура модифицированного олигонуклеотида

представляет собой 5'-A_SG_SC_MA_FC_FU_FU_MU_S-3', где каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

57. Способ по любому из пп. 38-56, в котором соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида.

58. Способ по любому из пп. 38-57, в котором фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

59. Способ лечения поликистозной болезни почек, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, модифицированного олигонуклеотида, имеющего структуру:



или его фармацевтически приемлемой соли.

60. Способ по п. 59, в котором фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

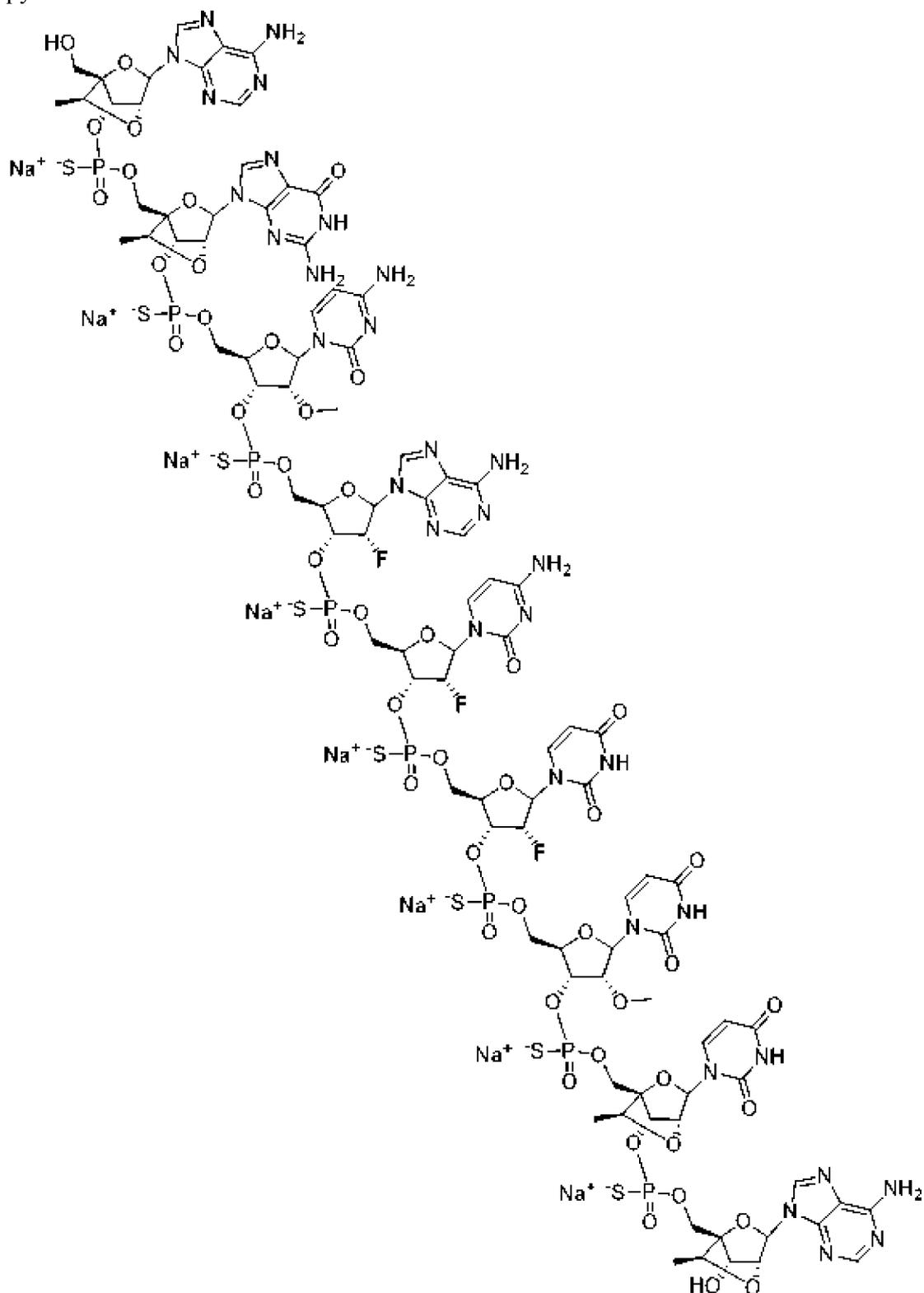
61. Способ по п. 60, в котором модифицированный олигонуклеотид присутствует в фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый разбавитель.

62. Способ по п. 61, в котором фармацевтически приемлемый разбавитель

представляет собой стерильный водный раствор.

63. Способ по п. 62, в котором стерильный водный раствор представляет собой солевой раствор.

64. Способ лечения поликистозной болезни почек, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, модифицированного олигонуклеотида, имеющего структуру:



65. Способ по п. 64, в котором модифицированный олигонуклеотид присутствует в

фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый разбавитель.

66. Способ по п. 65, в котором фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой стерильный водный раствор.

67. Способ по п. 66, в котором стерильный водный раствор представляет собой солевой раствор.

68. Способ по любому из пп. 38-67, в котором у субъекта имеется поликистозная болезнь почек.

69. Способ по любому из пп. 38-67, в котором у субъекта имеется подозрение на поликистозную болезнь почек.

70. Способ по любому из пп. 38-68, в котором у субъекта была диагностирована поликистозная болезнь почек с использованием клинических, гистопатологических и/или генетических критериев.

71. Способ по любому из пп. 38-70, в котором у субъекта перед введением соединения, модифицированного олигонуклеотида или фармацевтической композиции был установлен пониженный уровень полицистин-1 (PC1) и/или полицистин-2 (PC2) в почках, моче или крови субъекта.

72. Способ по любому из пп. 38-71, в котором поликистозная болезнь почек является аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек.

73. Способ по любому из пп. 38-71, в котором поликистозная болезнь почек является аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек.

74. Способ по любому из пп. 38-73, в котором у субъекта имеется мутация, выбранная из мутации гена *PKD1* или мутации гена *PKD2*.

75. Способ по любому из пп. 38-74, в котором у субъекта увеличен общий объем почек.

76. Способ по любому из пп. 38-75, в котором у субъекта присутствует гипертензия.

77. Способ по любому из пп. 38-76, в котором у субъекта нарушена функция почек.

78. Способ по любому из пп. 38-77, в котором введение уменьшает общий объем почек у субъекта.

79. Способ по любому из пп. 38-78, в котором введение замедляет скорость увеличения общего объема почек у субъекта.

80. Способ по п. 78 или п. 79, в котором общий объем почек представляет собой общий объем почек с поправкой на рост.

81. Способ по любому из пп. 38-80, в котором введение замедляет скорость снижения скорости клубочковой фильтрации у субъекта.

82. Способ по любому из пп. 38-81, в котором введение увеличивает скорость клубочковой фильтрации у субъекта.

83. Способ по п. 81 или п. 82, в котором скорость клубочковой фильтрации представляет собой оцениваемую скорость клубочковой фильтрации.

84. Способ по любому из пп. 38-83, в котором введение замедляет увеличение

роста кист в почках и/или печени субъекта.

85. Способ по любому из пп. 38-84, в котором введение:

улучшает функцию почек у субъекта;

задерживает ухудшение функции почек у субъекта;

уменьшает боль в почках у субъекта;

замедляет усиление боли в почках у субъекта;

задерживает возникновение боли в почках у субъекта;

снижает гипертензию у субъекта;

замедляет ухудшение гипертензии у субъекта;

задерживает возникновение гипертензии у субъекта;

уменьшает фиброз в почках субъекта;

замедляет ухудшение фиброза в почке субъекта;

задерживает начало терминальной стадии почечной недостаточности у субъекта;

задерживает время диализа для субъекта;

задерживает время трансплантации почки для субъекта; и/или

увеличивает продолжительность жизни субъекта.

86. Способ по любому из пп. 38-85, в котором введение:

снижает альбуминурию у субъекта;

замедляет ухудшение альбуминурии у субъекта;

задерживает возникновение альбуминурии у субъекта;

снижает гематурию у субъекта;

замедляет ухудшение гематурии у субъекта;

задерживает возникновение гематурии у субъекта;

снижает уровень азота мочевины в крови у субъекта;

снижает уровень креатинина в сыворотке у субъекта;

улучшает клиренс креатинина у субъекта;

снижает соотношение альбумин:креатинин у субъекта;

повышает полицистин-1 (PC1) в моче субъекта;

повышает полицистин-2 (PC2) в моче субъекта;

снижает белок липокалин, связанный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), в моче

субъекта; и/или

снижает белок молекулы повреждения почек-1 (KIM-1) в моче субъекта.

87. Способ по одному из пп. 38-86, включающий:

определение общего объема почек у субъекта;

определение гипертензии у субъекта;

определение боли в почках у субъекта;

определение полицистин-1 (PC1) в моче субъекта;

определение полицистин-2 (PC2) в моче субъекта;

определение фиброза в почке субъекта;

определение уровня азота мочевины в крови у субъекта;

определение уровня креатинина в сыворотке у субъекта;
определение клиренса креатинина у субъекта;
определение альбуминурии у субъекта;
определение соотношения альбумин:креатинин у субъекта;
определение скорости клубочковой фильтрации у субъекта;
определение белка липокалина, связанного с желатиназой нейтрофилов (NGAL), в моче субъекта; и/или

определение белка молекулы повреждения почек-1 (KIM-1) в моче субъекта.

88. Способ по любому из пп. 38-87, включающий введение по меньшей мере одной дополнительной терапии, причем по меньшей мере одна дополнительная терапия представляет собой антигипертензивное средство.

89. Способ по любому из пп. 38-87, включающий введение по меньшей мере одной дополнительной терапии, выбранной из ингибитора ангиотензинпревращающего фермента II (ACE), блокатора рецепторов ангиотензина II (ARB), диуретика, блокатора кальциевых каналов, ингибитора киназы, антагониста адренергических рецепторов, вазодилататора, бензодиазепина, ингибитора ренина, антагониста рецепторов альдостерона, блокатора рецепторов эндотелина, ингибитора мишени рапамицина (mTOR) у млекопитающих, аналога гормона, антагониста рецептора адиуретина 2, антагониста рецепторов альдостерона, ингибитора глюкозилцерамидсинтазы, антигиперлипидемического средства, диализа и трансплантации почки.

90. Способ по п. 89, в котором ингибитор ангиотензинпревращающего фермента II (ACE) выбран из каптоприла, эналаприла, лизиноприла, беназеприла, хинаприла, фозиноприла и рамиприла.

91. Способ по п. 89, в котором блокатор рецепторов ангиотензина II (ARB) выбран из кандесартана, ирбесартана, олмесартана, лозартана, валсартана, телмисартана и эпросартана.

92. Способ по п. 89, в котором антагонист рецептора адиуретина 2 представляет собой толваптан.

93. Способ по п. 89, в котором антагонист рецепторов альдостерона представляет собой спиронолактон.

94. Способ по п. 89, в котором ингибитор киназы выбран из босутиниба и KD019.

95. Способ по п. 89, в котором ингибитор mTOR выбран из эверолимуса, рапамицина и сиролимуса.

96. Способ по п. 89, в котором аналог гормона выбран из соматостатина и адренкортикотропного гормона.

97. Способ по п. 89, в котором ингибитор глюкозилцерамидсинтазы представляет собой венглустат.

98. Способ по п. 89, в котором антигипергликемическое средство представляет собой метформин.

99. Способ по любому из пп. 38-96, включающий введение терапевтически

эффективного количества соединения.

100. Способ по любому из пп. 38-99, в котором субъект представляет собой субъекта-человека.

101. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, причем модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру в ориентации от 5' к 3':



где каждый N'' независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеозид;

p составляет от 0 до 14; при этом, если p не равно 0, последовательность азотистых оснований $(N'')_p$ комплементарна части равной длины последовательности азотистых оснований miR-17;

каждый N из $(N)_r$ независимо представляет собой модифицированный или немодифицированный нуклеотид, а последовательность азотистых оснований $(N)_r$ представляет собой 5'-AGCACUUU-3';

N' представляет собой нуклеозид, содержащий модифицированный сахарный фрагмент;

q равно 0 или 1; при этом, если q равно 1, азотистое основание N' представляет собой уридиновое азотистое основание, цитозиновое азотистое основание или пуриновое азотистое основание, при условии, что пуриновое азотистое основание не имеет акцептора водородной связи в положении 6; и

каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина; или его фармацевтически приемлемая соль, для применения в терапии.

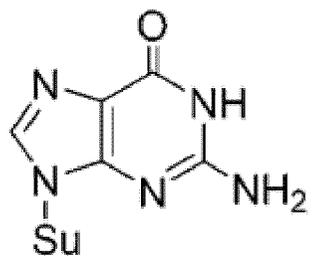
102. Соединение по п. 101, где терапия заключается в лечении поликистозной болезни почек.

103. Соединение по п. 102, где поликистозная болезнь почек является аутосомно-доминантной поликистозной болезнью почек (ADPKD).

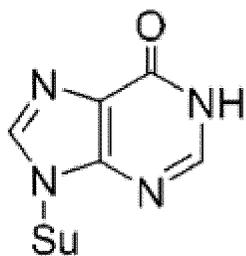
104. Соединение по п. 102, где поликистозная болезнь почек является аутосомно-рецессивной поликистозной болезнью почек (ARPKD).

105. Соединение по любому из пп. 1-22, модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 23-29 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 30-33 для применения в терапии.

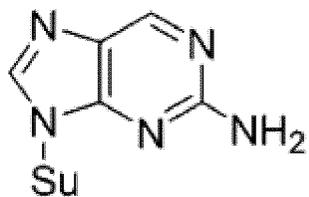
По доверенности



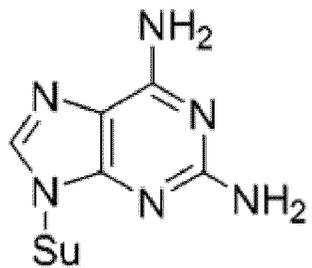
Гуанозин
G



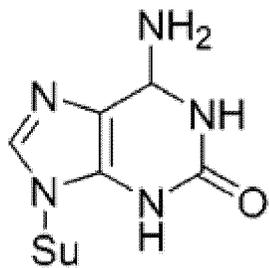
Инозин
I



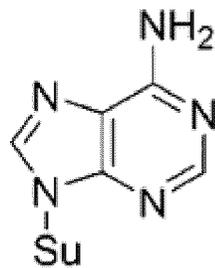
2-аминопурин
AP



2,6-диаминопурин
DAP

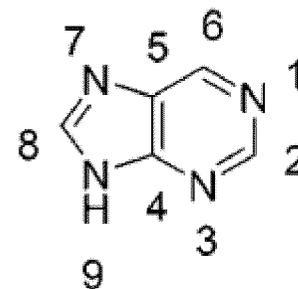


Изогуанозин
IsoG

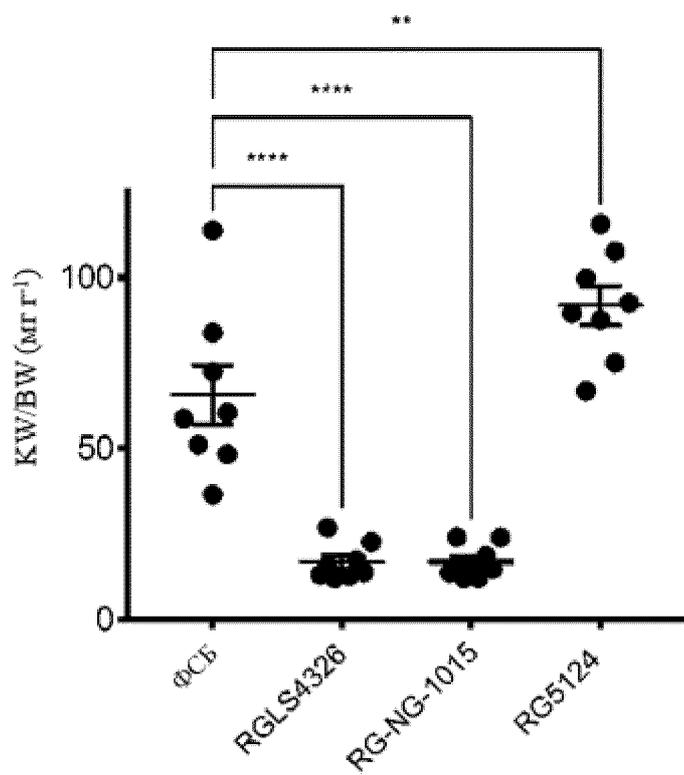


Аденозин
A

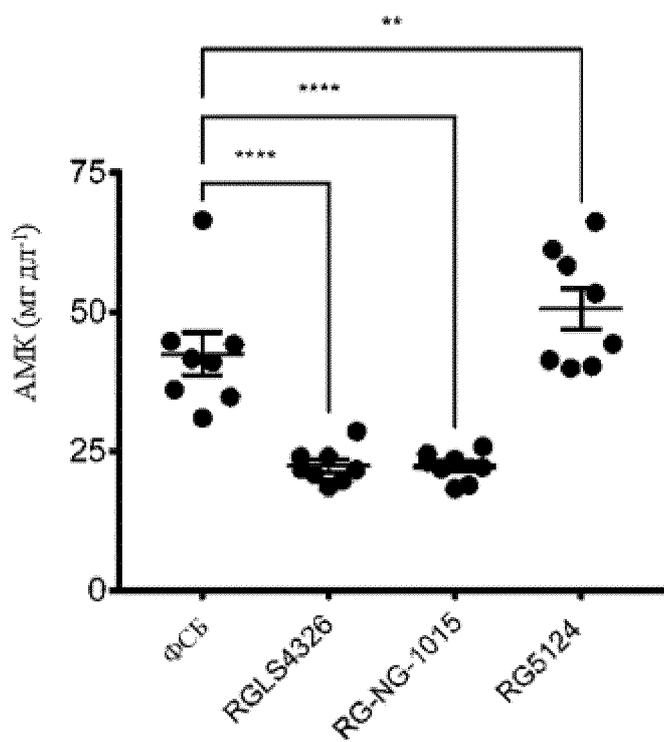
Нумерация пуринов



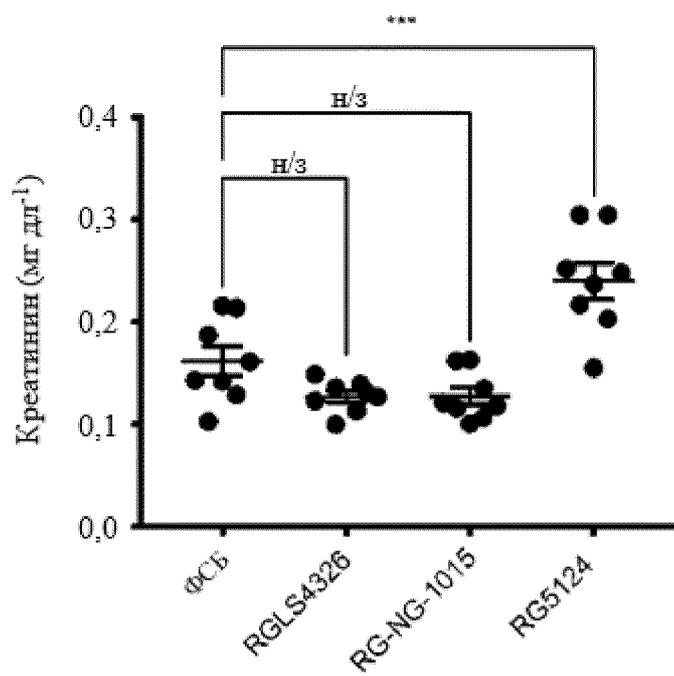
ФИГ. 1



ФИГ. 2А

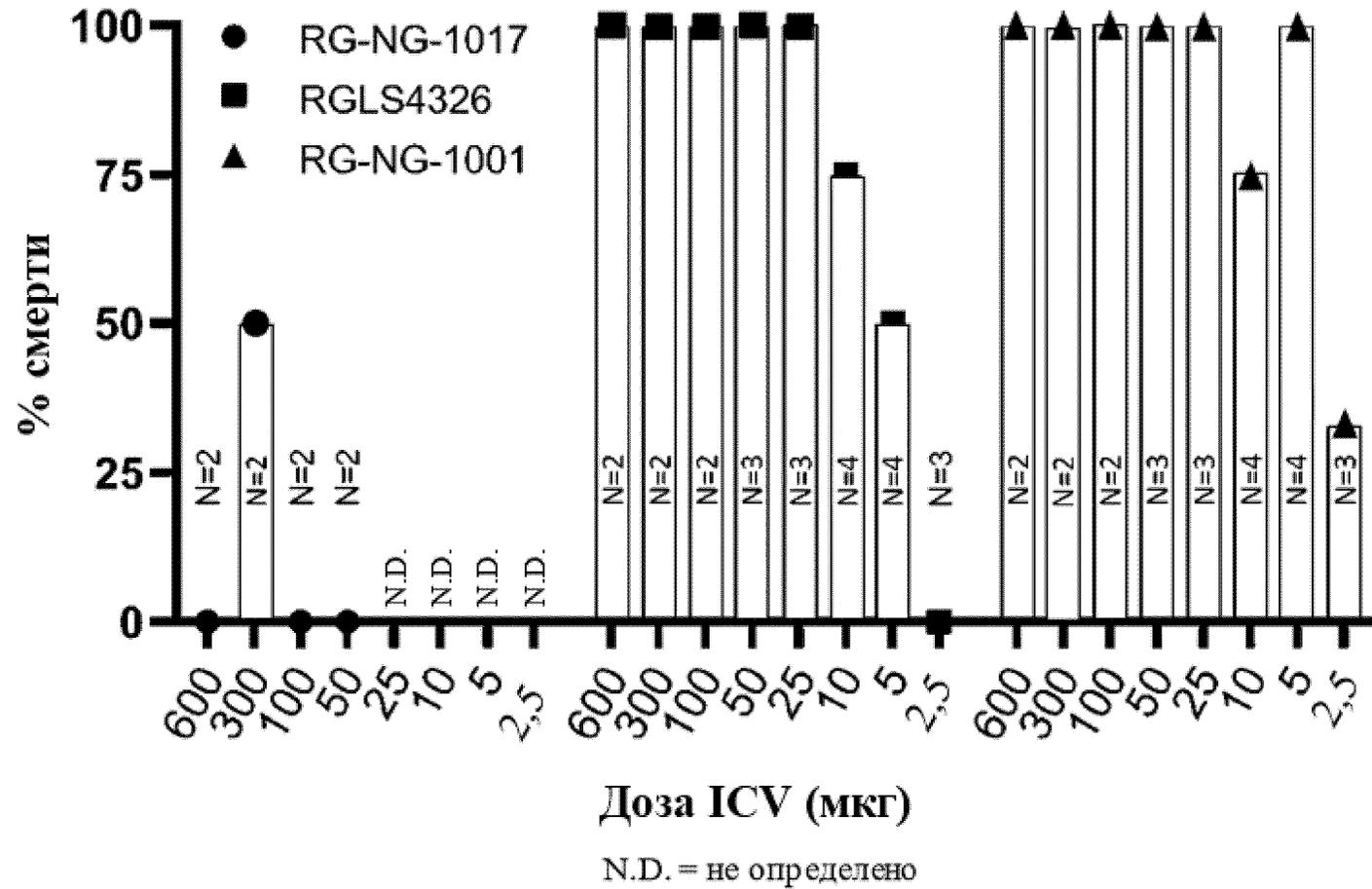


ФИГ. 2В

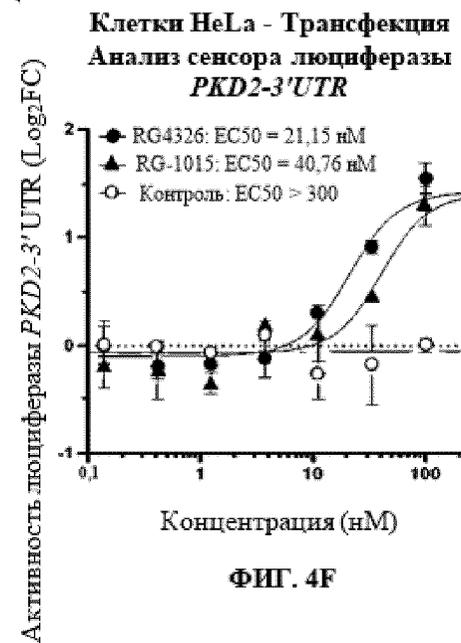
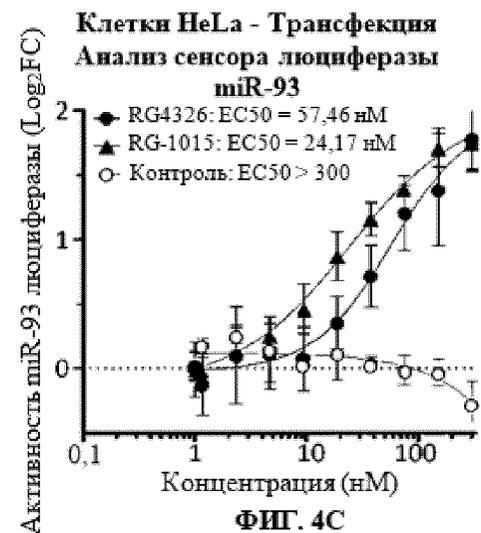
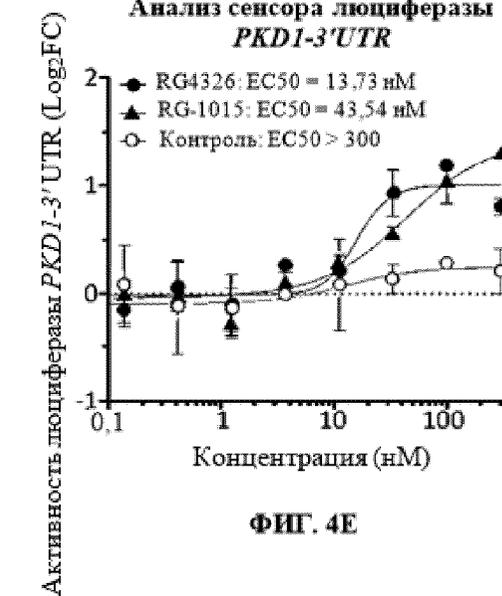
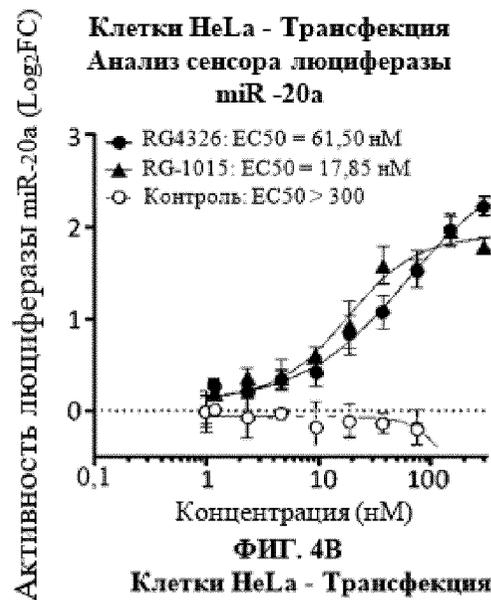
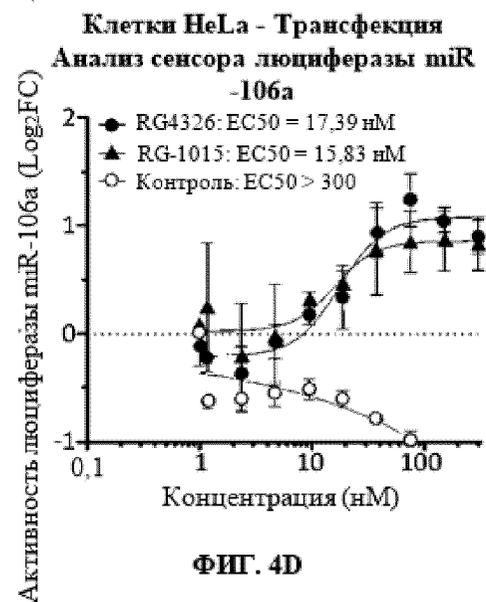
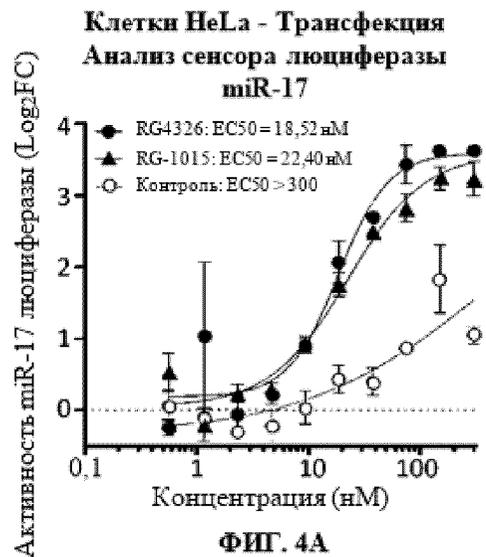


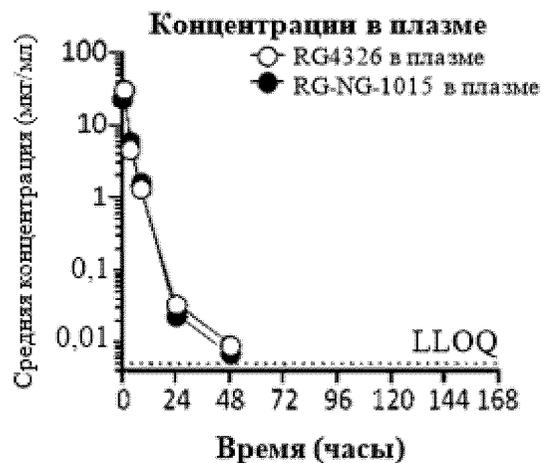
ФИГ. 2С

Смертность после введения ICV

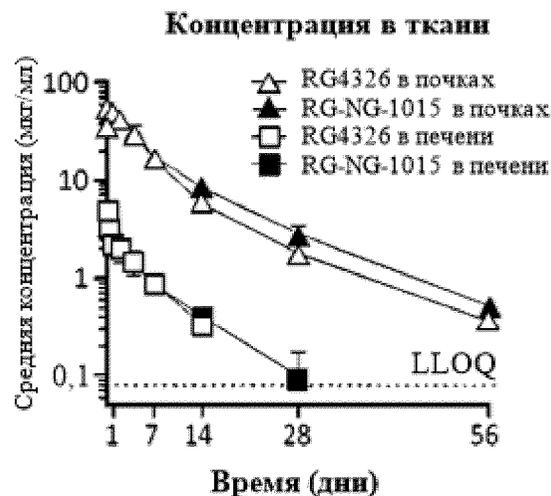


ФИГ. 3

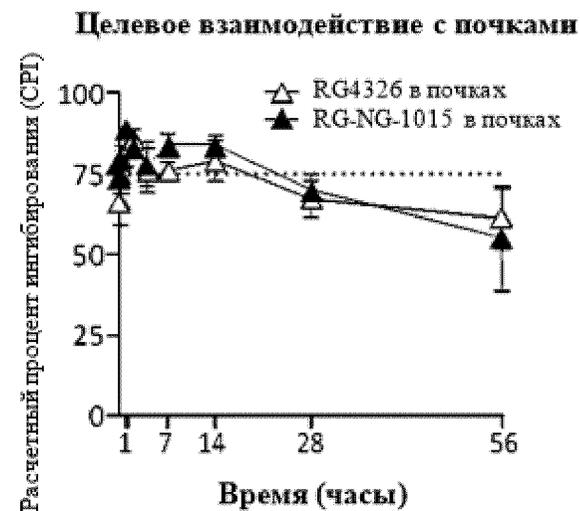




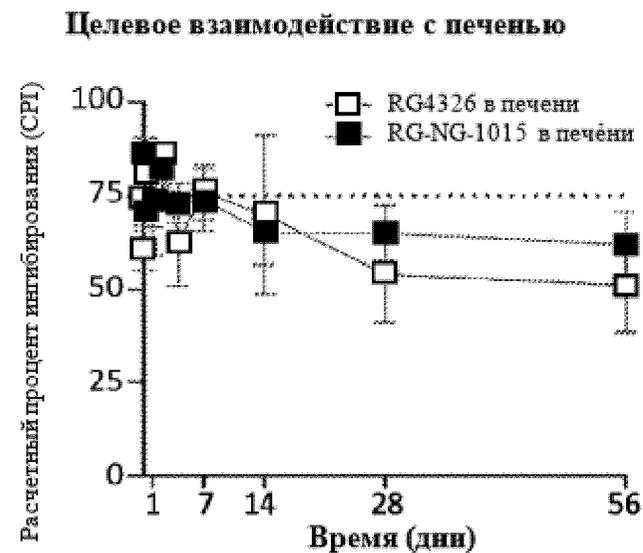
ФИГ. 5А



ФИГ. 5В



ФИГ. 5С

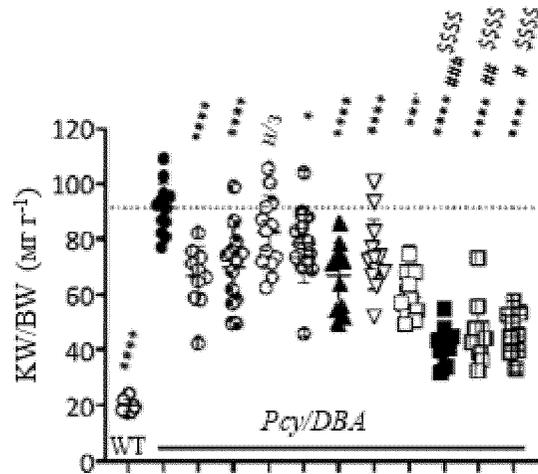


ФИГ. 5D

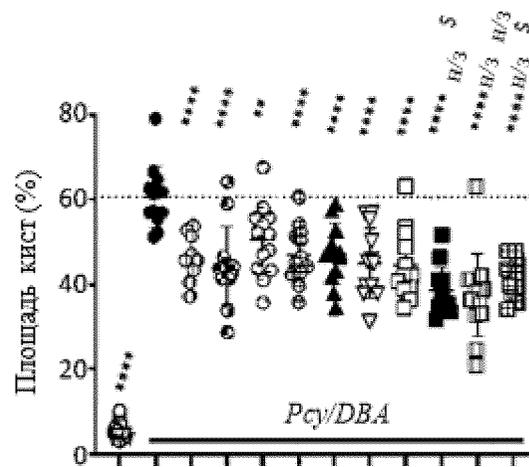


ФИГ. 6А

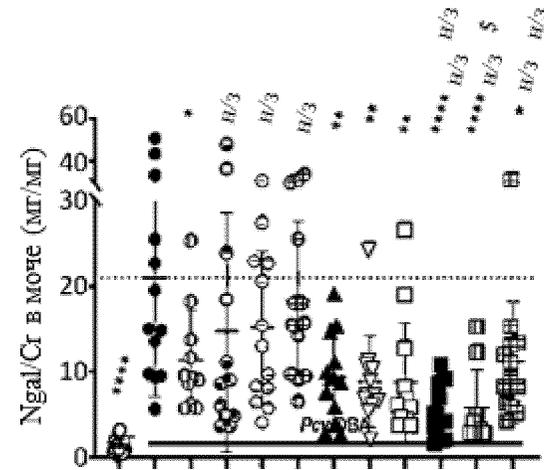
ФИГ. 6В



ФИГ. 6С



ФИГ. 6D



ФИГ. 6Е