

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201991360 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2019.11.29

(22) Дата подачи заявки
2017.12.04

(51) Int. Cl. C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ПОЛИКИСТОЗНОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

(31) 62/430,139

(32) 2016.12.05

(33) US

(86) PCT/US2017/064428

(87) WO 2018/106566 2018.06.14

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

(72) Изобретатель:
Аллерсон Чарльз Р. (US)

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

(57) В данном документе представлены способы лечения поликистозной болезни почек, в том числе аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек, с использованием модифицированных олигонуклеотидов, нацеленных на miR-17.

A1

201991360

201991360

A1

**МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОЛИКИСТОЗНОЙ
БОЛЕЗНИ ПОЧЕК**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/430139, поданной 5 декабря 2016 г., которая полностью включена в данное описание посредством ссылки для любых целей.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

В данном документе представлены композиции и способы лечения поликистозной болезни почек.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Поликистозная болезнь почек характеризуется накоплением многочисленных заполненных жидкостью кист в почке. Эти кисты выстланы одним слоем эпителиальных клеток, который называется эпителием кисты. Со временем размеры кист увеличиваются из-за повышенной пролиферации клеток и активной секреции жидкости эпителием кисты. Увеличенные кисты сжимают окружающие нормальные ткани, что приводит к ухудшению функции почек. Болезнь в конечном итоге прогрессирует до терминальной стадии почечной недостаточности, требующей диализа или пересадки почки. На этой стадии кисты могут быть окружены участками фиброза, содержащими атрофированные каналы.

Ряд генетических нарушений может привести к поликистозной болезни почек (ПБП). Различные формы ПБП различаются по типу наследования, например, аутосомно-доминантное или аутосомно-рецессивное наследование; вовлечению органов и проявлению фенотипов вне почек; возрасту начала терминальной стадии почечной недостаточности, например, при рождении, в детстве или в зрелом возрасте; и основной генетической мутации, которая связана с болезнью. См., например, Kurschat et al., 2014, Nature Reviews Nephrology, 10: 687-699.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Вариант осуществления 1. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 9 связанных нуклеозидов, в котором модифицированный олигонуклеотид имеет

следующую структуру нуклеозидов в ориентации от 5' к 3':



при этом нуклеозиды, за которыми следует подстрочное «М», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует подстрочное «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует подстрочное «S», представляют собой S-cEt нуклеозиды, и все связи представляют собой тиофосфатные связи; а также

при этом последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CACUUU-3', причем каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина; или их фармацевтически приемлемой соли.

Вариант осуществления 2. Соединение по варианту осуществления 1, в котором последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-GCACUUU-3', причем каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина.

Вариант осуществления 3. Соединение по варианту осуществления 1, в котором последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-AGCACUUUG-3', причем каждый цитозин независимо выбран из неметилированного цитозина и 5-метилцитозина.

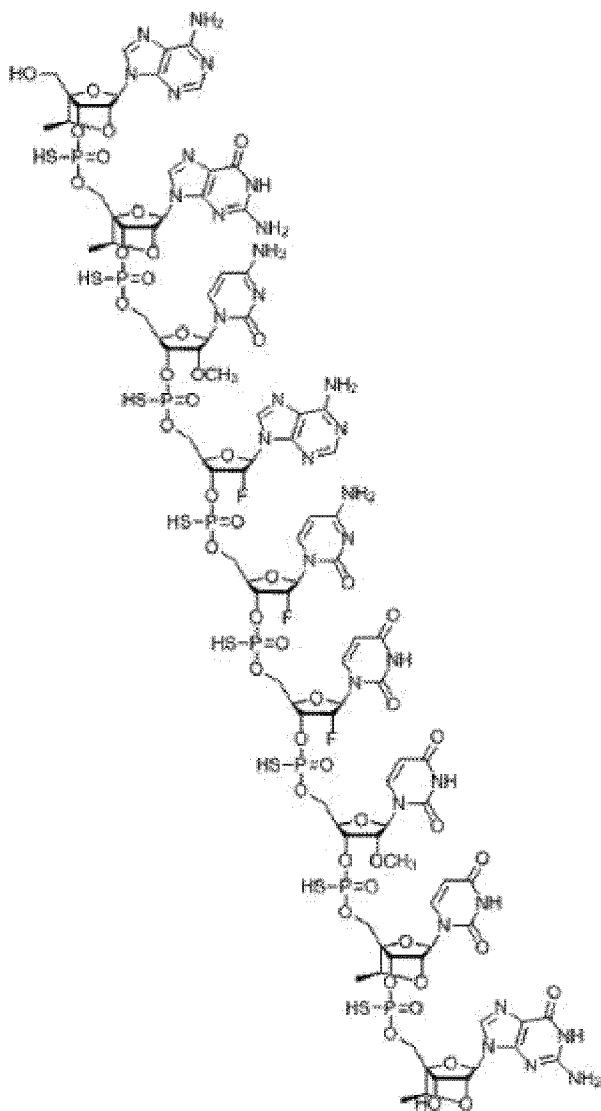
Вариант осуществления 4. Соединение по любому из вариантов осуществления 1, 2 или 3, в котором каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

Вариант осуществления 5. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-4, в котором соединение состоит из модифицированного олигонуклеотида или его фармацевтически приемлемой соли.

Вариант осуществления 6. Соединение по любому из вариантов осуществления 1-5, в котором фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

Вариант осуществления 7. Модифицированный олигонуклеотид,

имеющий структуру:

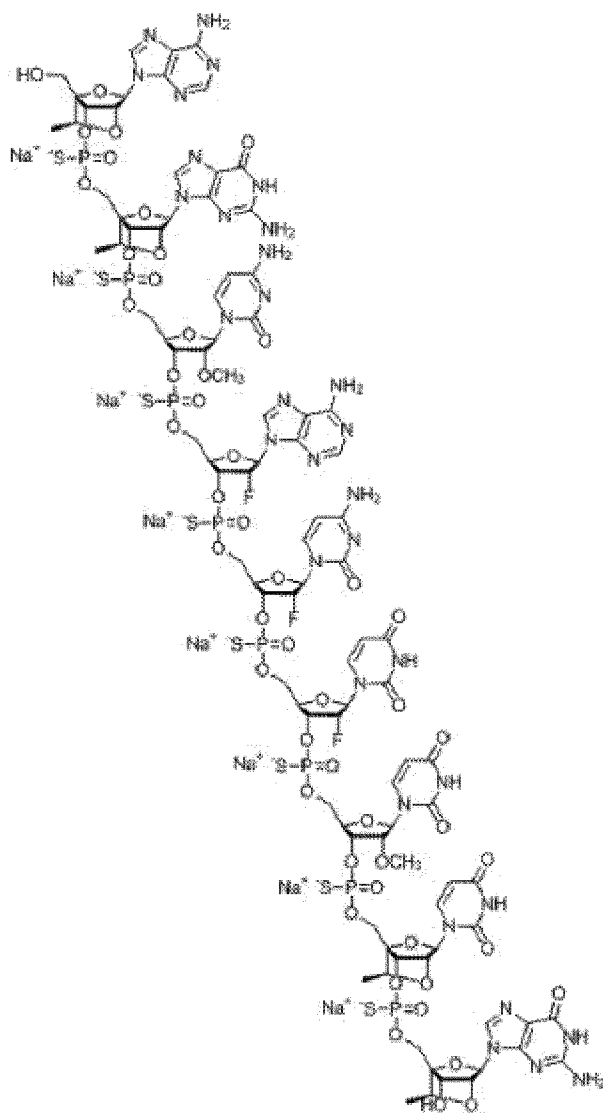


или его фармацевтически приемлемая соль.

Вариант осуществления 8. Модифицированный олигонуклеотид по варианту осуществления 7, который представляет собой фармацевтически приемлемую соль указанной структуры.

Вариант осуществления 9. Модифицированный олигонуклеотид по варианту осуществления 7, который представляет собой натриевую соль указанной структуры.

Вариант осуществления 10. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



Вариант осуществления 11. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из вариантов осуществления с 1 по 6 или модифицированный олигонуклеотид по любому из вариантов осуществления 7-10 и фармацевтически приемлемый разбавитель.

Вариант осуществления 12. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 11, в которой фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой водный раствор.

Вариант осуществления 13. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 12, в котором водный раствор представляет собой физиологический раствор.

Вариант осуществления 14. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из вариантов осуществления с 1 по 6 или модифицированный олигонуклеотид по любому из вариантов осуществления 7-10, которая представляет собой лиофилизированную композицию.

Вариант осуществления 15. Фармацевтическая композиция, состоящая по существу из соединения по любому из вариантов осуществления 1-6 или модифицированного олигонуклеотида по любому из вариантов осуществления 7-10 в физиологическом растворе.

Вариант осуществления 16. Способ ингибирования активности одного или нескольких членов семейства miR-17 в клетке, включающий контактирование клетки с соединением по любому из вариантов осуществления 1-6 или модифицированным олигонуклеотидом по любому из вариантов осуществления 7-10.

Вариант осуществления 17. Способ ингибирования активности одного или нескольких членов семейства miR-17 у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 11-15.

Вариант осуществления 18. Способ по варианту осуществления 17, в котором субъект имеет заболевание связанное с miR-17.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1A-1B. (A) Активность RG4326 в люциферазном анализе miR-17. (B) Активность RG4326 в люциферазных анализах членов семейства miR-17.

Фиг. 2. Значение характерного набора параметров ФД в клетках IMCD3 после обработки RG4326 или контролем RG5124.

Фиг. 3A-3B. miPSA (микроРНК анализ сдвига полисом), демонстрирующий целевое взаимодействие miR-17 с мишенью в (A) почках мышей дикого типа и (B) почках мышей, обработанных RG4326.

Фиг. 4A-4C. Эффективность RG4326 в модели ПБП Pkd2-KO. Влияние обработки на (A) коэффициент отношения массы почек к массе тела, (B) уровень азота мочевины в крови (АМК) и (C) кистозный индекс.

Фиг. 5A-5C. Эффективность RG4326 в модели Pcu ПБП. Влияние обработки на (A) коэффициент отношения массы почек к массе тела, (B) уровень азота мочевины в крови (АМК) и (C) кистозный индекс.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое

обычно понимают специалисты в области техники, к которой относится данное изобретение. Если не даны конкретные определения, номенклатура, используемая в связи с описанными в данном документе процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, хорошо известна и широко используется в данной области. В случае, когда в данном документе существует множество определений, преобладают те, что указаны в этом разделе. Стандартные методы могут быть использованы для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки и обработки субъектов. Некоторые такие методы и процедуры могут быть найдены, например, в "Carbohydrate Modifications in Antisense Research" Edited by Sanghvi and Cook, American Chemical Society, Washington D. C., 1994; и "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., 18th edition, 1990; которые включены в данную заявку посредством ссылки для любых целей. В тех случаях, когда это допустимо, все патенты, патентные заявки, опубликованные заявки и публикации, последовательности GENBANK, веб-сайты и другие опубликованные материалы, упоминаемые в тексте описания данного документа, если не указано иное, включены в качестве ссылки в полном объеме. Если делается ссылка на URL-адрес или другой такой идентификатор или адрес, следует понимать, что такие идентификаторы могут изменяться и конкретная информация в интернете может измениться, но эквивалентную информацию можно найти с помощью функции поиска в интернете. Ссылка на них свидетельствует о доступности и открытом распространении такой информации.

Прежде чем данные композиции и способы будут раскрыты и описаны, следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, приведена исключительно с целью описания конкретных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничения. Следует отметить, что в контексте описания данного изобретения и прилагаемой формулы данного изобретения существительные в единственном числе включают существительные во множественном числе, если контекст явно не указывает на иное.

Определения

«Поликистозная болезнь почек» или «ПБП» – это кистозное заболевание почек, характеризующееся накоплением многочисленных заполненных жидкостью кист в почке. Множественные кисты образуются, по крайней мере, в одной почке, часто приводя к увеличению пораженной почки (почек) и прогрессирующей потере функции почек.

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

«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.

"Аутосомно-доминантная поликистозная болезнь почек" или "АДПБП", представляет собой поликистозную болезнь почек, вызванную одной или более мутациями в гене PKD1 и/или PKD2. 85% АДПБП вызвано мутациями в PKD1, который расположен на хромосоме 16, а большинство остальных случаев АДПБП вызвано мутациями в PKD2, который расположен на хромосоме 4.

"Аутосомно-рецессивная поликистозная болезнь почек" или "АРПБП" представляет собой поликистозную болезнь почек, вызванную одной или более генетическими мутациями в гене PKHD1, который расположен на хромосоме 6. До 50% новорожденных с АРПБП умирают от осложнений внутриутробного заболевания почек, а у около трети выживших развивается терминальная стадия почечной недостаточности (ТСПН) в течение 10 лет.

«Нефронофтизис» или «НФ» означает аутосомно-рецессивное кистозное заболевание почек, которое характеризуется кортикомедуллярными кистами, разрывом трубчатой базальной мембраны и тубулоинтерстициальной нефропатией.

"Общий объем почек" или "ООП" является измерением общего объема почек, который может быть определен методом магнитно-резонансной томографии (МРТ), компьютерной томографии (КТ) или ультразвуковой (УЗИ) визуализации, а также объем, рассчитанный по стандартной методике, например, формуле объема эллипсоида (для ультразвука) или с помощью количественной стереологии или прослеживания границ (для КТ/МРТ).

"Общий объем почек с поправкой на рост" или "ООППР" (HtTKV-Height-adjusted total kidney volume) является мерой общего объема почки на единицу роста. У пациентов со значением ООППР ≥ 600 мл/м прогнозируется развитие хронической почечной недостаточности 3-й стадии в течении 8 лет.

"Боль в почках" означает клинически значимую боль в почках, требующую отпуска по болезни, фармакологического лечения (наркотическими средствами или болеутоляющими средствами последней надежды) или инвазивного вмешательства.

"Прогрессирование гипертонии" означает изменение артериального давления, которое требует начала или усиления гипертонического лечения.

"Фиброз" означает образование или развитие избыточной волокнистой соединительной ткани в органах или тканях. В определенных вариантах осуществления изобретения фиброз возникает как восстановительный или реактивный процесс. В определенных вариантах осуществления изобретения 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 восстановительный или реактивный процесс, в отличие от образования волокнистой ткани в качестве нормальной составляющей органа или ткани.

"Гематурия" означает наличие красных кровяных клеток в моче.

"Альбуминурия" означает наличие избытка альбумина в моче и включает в себя, без ограничений, нормальную альбуминурию, высокую/нормальную альбуминурию, микроальбуминурию и

макроальбуминурию. Обычно барьер проницаемости клубочковой фильтрации, который состоит из подоцитов, клубочковой базальной мембраны и эндотелиальных клеток, предотвращает утечку сывороточного белка в мочу. Альбуминурия может отражать повреждение барьера проницаемости клубочковой фильтрации. Альбуминурия может быть рассчитана по 24-часовому образцу мочи, пробе мочи в течение ночи или образцу разовой порции мочи.

"Высокая/нормальная альбуминурия" означает повышенную альбуминурию, характеризующуюся (i) экскрецией от 15 до < 30 мг альбумина в моче 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.

"Микроальбуминурия" означает повышенную альбуминурию, характеризующуюся (i) экскрецией от 30 до 300 мг альбумина в моче 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.

"Макроальбуминурия" означает повышенную альбуминурию, характеризующуюся экскрецией более чем 300 мг альбумина в моче 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.

"Соотношение альбумин/креатинин" означает отношение альбумина мочи (мг/дл) к креатинину мочи (г/дл) и выражается в мг/г. В определенных вариантах осуществления изобретения соотношение альбумин/креатинин может быть рассчитано по образцу разовой порции мочи и может быть использовано в качестве оценки экскреции альбумина в течение 24-часового периода.

«Скорость клубочковой фильтрации» или «СКФ» означает скорость потока фильтрованной жидкости через почку и используется в качестве показателя функции почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления СКФ субъекта определяют путем вычисления предполагаемой скорости клубочковой фильтрации. В определенных вариантах осуществления СКФ субъекта измеряется непосредственно у субъекта с использованием способа с

применением инулина.

«Расчетная скорость клубочковой фильтрации» или «рСКФ» означает измерение того, насколько хорошо почки фильтруют креатинин, и используется для приблизительной оценки скорости клубочковой фильтрации. Поскольку прямое измерение СКФ является сложным, рСКФ часто используется в клинической практике. Нормальные результаты могут находиться в диапазоне от 90 до 120 мл/мин/1,73 м². Уровни ниже 60 мл/мин/1,73 м² на протяжении 3 и более месяцев могут быть показателем хронического заболевания почек. Уровни ниже 15 мл/мин/1,73 м² могут быть показателем почечной недостаточности.

«Протеинурия» означает наличие избытка сывороточных белков в моче. Протеинурия может характеризоваться выделением > 250 мг белка в мочу за 24 часа и/или соотношением белка и креатинина в моче > 0,20 мг/мг. Белки сыворотки, повышенные в связи с протеинурией, включают, без ограничения, альбумин.

«Уровень азота мочевины в крови» или «уровень АМК» означает меру количества азота в крови в форме мочевины. Печень вырабатывает мочевину в цикле мочевины как отходы переваривания белка, и мочевина выводится из крови почками. Нормальная 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 в качестве показателя здоровья почек. Если почки не способны нормально удалять мочевину из крови, уровень АМК у субъекта повышается.

«Повышенный» означает увеличение медицинского показателя, который считается клинически значимым. Медицинский работник может определить, является ли увеличение клинически значимым.

"Терминальная стадия почечной недостаточности (ТСПН)" означает полное или почти полное нарушение функции почек.

«Качество жизни» означает степень, в которой физическое, психологическое и социальное функционирование субъекта ухудшается вследствие заболевания и/или лечения заболевания. Качество жизни может быть снижено у пациентов с поликистозной болезнью почек.

«Нарушение функции почек» означает снижение функции почек

относительно нормальной функции почек.

"Замедление прогрессирования" и "медленное прогрессирование" означают снижение скорости, с которой патологическое состояние переходит в прогрессивное состояние.

"Отсрочка времени до диализа" означает поддержание достаточной функции почек, вследствие чего потребность в лечении диализом отсрочивается.

"Отсрочка времени пересадки почки" означает поддержание достаточной функции почек, вследствие чего потребность в пересадке почки отсрочивается.

"Повышение ожидаемой продолжительности жизни" означает увеличение продолжительности жизни субъекта путем лечения одного или более симптомов заболевания у субъекта.

«Субъект» означает человека или животное отличное от человека, отобранное для обработки или терапии.

"Субъект, имеющий в этом необходимость" означает субъекта, который идентифицируется как нуждающийся в терапии или лечении.

"Субъект, подозреваемый в наличии" означает субъекта, демонстрирующего один или более клинических показателей заболевания.

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

"Введение" означает предоставление фармацевтического вещества или композиции субъекту и включает в себя, но без ограничений, введение препарата медицинским специалистом и самостоятельное введение.

"Парентеральное введение" означает введение посредством инъекции или инфузии. Парентеральное введение включает в себя, но не ограничивается этим, подкожное введение, внутривенное введение и внутримышечное введение.

"Подкожное введение" означает введение непосредственно под кожу.

"Внутривенное введение" означает введение в вену.

"Сопутствующее введение" обозначает совместное введение двух или более средств в любой форме, в которой

фармакологические эффекты обоих проявляются в организме пациента в одно и то же время.

При сопутствующем введении нет необходимости, чтобы оба вещества были введены в одной фармацевтической композиции, в одной лекарственной форме или одним и тем же способом введения. Эффекты обоих веществ не обязательно должны проявляться одновременно. Эффекты должны только перекрываться в промежутке времени и не обязательно должны иметь одинаковую продолжительность.

"Продолжительность" означает период времени, в течение которого действие или явление продолжается. В определенных вариантах осуществления изобретения продолжительность лечения являет собой период времени, в течение которого вводят дозы фармацевтического вещества или фармацевтической композиции.

"Терапия" означает способ лечения заболевания. В определенных вариантах осуществления изобретения терапия включает в себя, но не ограничивается ими, введение одного или более фармацевтических веществ субъекту, имеющему заболевание.

"Лечить" означает применение одной или более конкретных процедур, используемых для облегчения, по меньшей мере, одного показателя заболевания. В определенных вариантах осуществления изобретения конкретная процедура является введением одного или более фармацевтических агентов. В определенных вариантах осуществления изобретения лечение ПБП включает в себя, но не ограничивается ими, уменьшение общего объема почек, улучшение функции почек, снижение гипертонии и/или уменьшение боли в почках.

"Облегчать" означает уменьшить тяжесть, по меньшей мере, одного показателя патологического состояния или заболевания. В определенных вариантах осуществления изобретения облегчение включает в себя отсрочку или замедление развития одного или более показателей патологического состояния или заболевания. Степень тяжести показателей может быть определена субъективными или объективными мерами, которые известны специалистам в данной области техники.

"Подверженный риску развития" означает состояние, в котором

субъект предрасположен к развитию патологического состояния или заболевания. В определенных вариантах осуществления изобретения субъект, подверженный риску развития патологического состояния или заболевания, проявляет один или более симптомов патологического состояния или заболевания, но не проявляет достаточного количества симптомов, чтобы был поставлен диагноз патологического состояния или заболевания. В определенных вариантах осуществления изобретения субъект, подверженный риску развития патологического состояния или заболевания, проявляет один или более симптомов патологического состояния или заболевания, но в меньшей степени, чем требуется для постановки диагноза патологического состояния или заболевания.

"Предотвращение возникновения" означает предотвращение развития патологического состояния или заболевания у субъекта, который подвержен риску развития заболевания или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления изобретения субъект, подверженный риску развития заболевания или патологического состояния, получает лечение, подобное лечению, полученному субъектом, который уже имеет заболевание или патологическое состояние.

"Отсрочка возникновения" означает отсрочить развитие патологического состояния или заболевания у субъекта, который подвержен риску развития болезни или патологического состояния. В определенных вариантах осуществления изобретения субъект, подверженный риску развития заболевания или патологического состояния, получает лечение, подобное лечению, полученному субъектом, который уже имеет заболевание или патологическое состояние.

"Доза" означает определенное количество фармацевтического вещества, предоставленного при однократном введении. В определенных вариантах осуществления изобретения доза может быть введена в виде двух или более болюсов, таблеток или инъекций. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения, в которых желательно подкожное введение, желаемая доза требует объема, который нелегко обеспечить однократной инъекцией. В таких вариантах осуществления изобретения для достижения

желаемой дозы могут быть использованы две или более инъекций. В определенных вариантах осуществления изобретения доза может быть введена двумя или более инъекциями для минимизации реакции в месте инъекции у индивидуума. В определенных вариантах осуществления изобретения доза вводится в виде медленной инфузии.

"Стандартная дозировка" означает форму, в которой предоставляется фармацевтическое вещество. В определенных вариантах осуществления изобретения стандартная дозировка представляет собой флакон, содержащий лиофилизированный олигонуклеотид. В определенных вариантах осуществления изобретения стандартная дозировка представляет собой флакон, содержащий ресуспендированный олигонуклеотид.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству фармацевтического вещества, которое обеспечивает терапевтический эффект для животного.

"Фармацевтическая композиция" означает смесь веществ, пригодных для введения индивидууму, которая включает фармацевтический агент. Например, фармацевтическая композиция может содержать стерильный водный раствор.

"Фармацевтический агент" означает субстанцию, которая обеспечивает терапевтический эффект при введении субъекту.

"Активный фармацевтический ингредиент" означает субстанцию в фармацевтической композиции, которая обеспечивает желаемый эффект.

"Фармацевтически приемлемые соли" означают физиологически и фармацевтически приемлемые соли соединения, представленного в данном документе, то есть, соли, которые сохраняют желаемую биологическую активность соединения и не имеют нежелательных токсикологических эффектов при введении субъекту. Неограничивающие типовые фармацевтически приемлемые соли соединений, представленных в данном документе, включают в себя формы натриевой и калиевой соли. Используемые в данном документе термины «соединение», «олигонуклеотид» и «модифицированный олигонуклеотид» включают его фармацевтически приемлемые соли, если специально не указано иное.

«Физиологический раствор» означает раствор хлорида натрия в воде.

"Улучшенная функция органа" означает изменение функции органа в нормальных пределах. В определенных вариантах осуществления изобретения функцию органа оценивают путем измерения молекул, обнаруженных в крови или моче субъекта. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения, улучшение функции почек измеряется по уменьшению азота мочевины крови, снижению протеинурии, снижению альбуминурии и т. д.

"Приемлемый профиль безопасности" означает набор побочных эффектов, который находится в клинически приемлемых пределах.

"Побочный эффект" означает физиологическую реакцию, обусловленную лечением, отличную от желаемых эффектов. В определенных вариантах осуществления изобретения побочные эффекты включают, без ограничения, реакции в месте инъекции, отклонения функциональных проб печени, отклонения в функции почек, гепатотоксичность, нефротоксичность, нарушения центральной нервной системы и миопатии. Такие побочные эффекты могут быть обнаружены прямо или косвенно. Например, повышенные уровни аминотрансферазы в сыворотке могут указывать на гепатотоксичность или нарушение функции печени. Например, повышенный билирубин может указывать на гепатотоксичность или нарушение функции печени.

Используемый в данном документе термин «кровь» охватывает цельную кровь и фракции крови, такие как сыворотка и плазма.

"Анти-miR" означает олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную микроРНК. В определенных вариантах осуществления изобретения анти-miR представляет собой модифицированный олигонуклеотид.

«Анти-miR-17» означает модифицированный олигонуклеотид, имеющий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную одному или нескольким членам семейства miR-17. В определенных вариантах осуществления анти-miR-17 является полностью комплементарным (т.е. комплементарным на 100%) одному или нескольким членам семейства miR-17. В определенных вариантах осуществления анти-miR-17 является, по меньшей мере, на 80%, по

меньшей мере, на 85%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95%, комплементарным одному или нескольким членам семейства miR-17.

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

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

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

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

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

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

«Центральная последовательность miR-17» означает последовательность нуклеиновых оснований 5'-AAAGUG-3, которая присутствует в каждом из членов семейства miR-17.

«Член семейства miR-17» означает зрелую микроРНК, имеющую последовательность нуклеиновых оснований, содержащую центральную последовательность miR-17, и которая выбрана из miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a и miR-106b.

«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 нуклеиновых оснований, включающую центральную последовательность miR-17.

«Целевая нуклеиновая кислота» означает нуклеиновую кислоту, с которой олигомерное соединение гибридизуется по предназначению.

«Нацеливание» означает процесс конструирования и отбора последовательности нуклеиновой кислоты, которая будет гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой.

«Нацеливание на» означает наличие нуклеотидной последовательности, которая позволит гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой.

«Модуляция» означает изменение функции, количества или активности. В определенных вариантах осуществления модуляция означает усиление/возрастание функции, количества или активности. В определенных вариантах осуществления модуляция означает уменьшение/ослабление функции, количества или активности.

«Экспрессия» означает любые функции и этапы, посредством которых закодированная информация гена преобразуется в структуры, присутствующие и работающие в клетке.

«Последовательность нуклеиновых оснований» означает порядок смежных нуклеиновых оснований в олигомерном соединении или нуклеиновой кислоте, обычно перечисленных в ориентации от 5' к 3' и не зависящих от каких-либо модификаций сахара, связи и/или нуклеобазы.

"Смежные нуклеиновые основания" означают нуклеиновые основания, непосредственно смежные друг с другом в нуклеиновой кислоте.

"Комплементарность нуклеиновых оснований" означает способность двух нуклеиновых оснований нековалентно спариваться посредством водородной связи.

"Комплементарный" означает, что одна нуклеиновая кислота способна гибридизоваться с другой нуклеиновой кислотой или олигонуклеотидом. В определенных вариантах осуществления изобретения комплементарный относится к олигонуклеотиду, способному гибридизоваться с целевой нуклеиновой кислотой.

"Полностью комплементарный" означает, что каждое нуклеиновое основание олигонуклеотида способно спариваться с нуклеиновым основанием в каждом соответствующем положении в целевой нуклеиновой кислоте. В определенных вариантах

осуществления изобретения олигонуклеотид является полностью комплементарным (также называемым 100% комплементарным) микроРНК, то есть каждое нуклеиновое основание олигонуклеотида является комплементарным нуклеиновому основанию в соответствующем положении в микроРНК. Модифицированный олигонуклеотид может быть полностью комплементарным микроРНК и содержать ряд связанных нуклеозидов, который меньше, чем длина микроРНК. Например, олигонуклеотид с 16 связанными нуклеозидами, в котором каждое нуклеиновое основание олигонуклеотида является комплементарным нуклеотидному основанию в соответствующем положении в микроРНК, является полностью комплементарным микроРНК. В определенных вариантах осуществления изобретения олигонуклеотид, в котором каждое нуклеиновое основание обладает комплементарностью к нуклеиновому основанию в области последовательности шпильки микроРНК, является полностью комплементарным последовательности шпильки микроРНК.

"Процент комплементарности" означает процентное содержание нуклеиновых оснований олигонуклеотида, которые являются комплементарными участку равной длины целевой нуклеиновой кислоты. Процент комплементарности рассчитывают путем деления числа нуклеиновых оснований олигонуклеотида, которые являются комплементарными нуклеиновым основаниям в соответствующих положениях целевой нуклеиновой кислоты, на общее число нуклеиновых оснований в олигонуклеотиде.

"Процент идентичности" означает число нуклеиновых оснований в первой нуклеиновой кислоте, которые являются идентичными нуклеиновым основаниям в соответствующих положениях во второй нуклеиновой кислоте, деленное на общее число нуклеиновых оснований в первой нуклеиновой кислоте. В определенных вариантах осуществления изобретения первая нуклеиновая кислота представляет собой микроРНК, и вторая нуклеиновая кислота представляет собой микроРНК. В определенных вариантах осуществления изобретения первая нуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид, и вторая нуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид.

"Гибридизировать" означает отжиг комплементарных

нуклеиновых кислот, который происходит за счет комплементарности нуклеиновых оснований.

"Неправильно спаренный" означает нуклеиновое основание первой нуклеиновой кислоты, которое не способно к уотсон-криковскому спариванию с нуклеиновым основанием в соответствующем положении второй нуклеиновой кислоты.

"Идентичный" в контексте последовательностей нуклеиновых оснований означает наличие тождественной последовательности нуклеиновых оснований, независимо от сахара, связи и/или модификаций нуклеинового основания и независимо от состояния метилирования любых присутствующих пиримидинов.

"МикроРНК" означает эндогенную некодирующую РНК длиной между 18 и 25 нуклеиновых оснований, которая является продуктом расщепления пре-микроРНК ферментом дайсер (Dicer). Примеры зрелых микроРНК находятся в базе данных микроРНК, известной как miRBase (microrna.sanger.ac.uk/). В определенных вариантах осуществления изобретения микроРНК сокращается как "miR".

«Регулируемый микроРНК транскрипт» означает транскрипт, который регулируется микроРНК.

«Последовательность комплементарная центральной» означает последовательность нуклеиновых оснований, которая является комплементарной центральной последовательности и имеет такую же длину, что и центральная последовательность.

"Олигомерное соединение" означает соединение, которое содержит множество связанных мономерных субъединиц. Олигомерные соединения включают олигонуклеотиды.

"Олигонуклеотид" означает соединение, содержащее множество связанных нуклеозидов, каждый из которых может быть модифицированным или немодифицированным, независимо друг от друга.

"Встречающаяся в природе межнуклеозидная связь" означает 3'-5' фосфодиэфирную связь между нуклеозидами.

"Природный сахар" означает сахар, находящийся в ДНК (2'-H) или РНК (2'-OH).

"Межнуклеозидная связь" означает ковалентную связь между соседними нуклеозидами.

"Связанные нуклеозиды" означает нуклеозиды, соединенные ковалентной связью.

"Нуклеиновое основание" означает гетероциклический компонент, способный нековалентно спариваться с другим нуклеиновым основанием.

"Нуклеозид" означает нуклеиновое основание, связанное с сахарным компонентом.

"Нуклеотид" означает нуклеозид, содержащий фосфатную группу, ковалентно связанную с сахарной частью нуклеозида.

"Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, состоящий из" ряда связанных нуклеозидов, означает соединение, которое включает в себя модифицированный олигонуклеотид, имеющий указанное количество связанных нуклеозидов. Таким образом, соединение может включать в себя дополнительные заместители или конъюгаты. Если не указано иное, модифицированный олигонуклеотид не гибридизуется с комплементарной цепью, и соединение не включает никаких дополнительных нуклеозидов, кроме нуклеозидов модифицированного олигонуклеотида.

«Модифицированный олигонуклеотид» означает одноцепочечный олигонуклеотид, имеющий одну или более модификаций, относящихся к встречающимся в природе терминальной части, сахару, нуклеиновому основанию и/или межнауклеозидной связи. Модифицированный олигонуклеотид может содержать немодифицированные нуклеозиды.

"Модифицированный нуклеозид" означает нуклеозид, имеющий любое изменение по сравнению с нуклеозидом естественного происхождения. Модифицированный нуклеозид может содержать модифицированный сахар и не модифицированное нуклеиновое основание. Модифицированный нуклеозид может содержать модифицированный сахар и модифицированное нуклеиновое основание. Модифицированный нуклеозид может содержать естественный сахар и модифицированное нуклеиновое основание. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный нуклеозид представляет собой бициклический нуклеозид. В определенных вариантах осуществления изобретения модифицированный нуклеозид представляет собой не бициклический нуклеозид.

"Модифицированная межнуклеозидная связь" означает любое изменение межнуклеозидной связи естественного происхождения.

"Тиофосфатная межнуклеозидная связь" означает связь между нуклеозидами, в которой один из немостиковых атомов представляет собой атом серы.

"Модифицированный сахарный компонент" означает замещение и/или любое изменение природного сахара.

"Немодифицированное нуклеиновое основание" означает встречающееся в природе гетероциклические основания РНК или ДНК: пуриновые основания аденин (А) и гуанин (Г) и пиримидиновые основания тимин (Т), цитозин (Ц) (включая 5-метилцитозин) и урацил (У).

"5-метилцитозин" означает цитозин, содержащий метильную группу, прикрепленную в 5 положении.

"Неметилованный цитозин" означает цитозин, который не содержит метильную группу, прикрепленную в 5 положении.

"Модифицированное нуклеиновое основание" означает любое нуклеиновое основание, которое не является немодифицированным нуклеиновым основанием.

"Сахарный компонент" означает встречающийся в природе фуранозил или модифицированный сахарный компонент.

"Модифицированный сахарный компонент" означает замещенный сахарный компонент или заменитель сахара.

"2'-О-метил сахара" или "2'-ОМе сахара" означает сахар, содержащий О-метильную модификацию в 2' положении.

"2'-О-метоксиэтил сахара" или "2'-МОЕ сахара" означает сахар, содержащий О-метоксиэтильную модификацию в 2' положении.

"2'-фтор" или "2'-F" означает сахар, имеющий модификацию фтором в 2' положении.

"Бициклический сахарный компонент" означает модифицированный сахарный компонент, содержащий 4-7-членное кольцо (включая, но не ограничиваясь им, фуранозил), содержащее мостик, связывающий два атома 4-7-членного кольца с образованием второго кольца, что приводит к получению бициклической структуры. В определенных вариантах осуществления изобретения 4-

7-членное кольцо представляет собой кольцо сахара. В определенных вариантах осуществления изобретения 4-7-членное кольцо представляет собой фуранозил. В определенных вариантах осуществления изобретения мостик соединяет 2'-углерод и 4'-углерод фуранозила.

Неограничивающие типовые бициклические сахарные компоненты включают в себя ЗНК, ЭНК, cEt, S-cEt и R-cEt.

«Сахарный фрагмент заблокированной нуклеиновой кислоты (ЗНК/LNA-locked nucleic acid)» означает замещенный сахарный фрагмент, содержащий (CH_2) -O мостик между 4' и 2' атомами фуранозного кольца.

"Сахарный компонент ЭНК (нуклеиновая кислота с этиленовым мостиком)" означает замещенный сахарный компонент, содержащий $(\text{CH}_2)_2$ -O мостик между 4' и 2' атомами фуранозного кольца.

"Сахарный компонент, содержащий пространственно затрудненный этил (cEt)" означает замещенный сахарный компонент, содержащий $\text{CH}(\text{CH}_3)$ -O мостик между 4' и 2' атомами фуранозного кольца. В определенных вариантах осуществления изобретения $\text{CH}(\text{CH}_3)$ -O мостик пространственно затруднен в S ориентации. В определенных вариантах осуществления изобретения $\text{CH}(\text{CH}_3)$ -O пространственно затруднен в R ориентации.

"Сахарный компонент S-cEt" означает замещенный сахарный компонент, содержащий S-пространственно затрудненный мостик $\text{CH}(\text{CH}_3)$ -O между 4' и 2' атомами фуранозного кольца.

"Сахарный компонент R-cEt" означает замещенный сахарный компонент, содержащий R-пространственно затрудненный мостик $\text{CH}(\text{CH}_3)$ -O между 4' и 2' атомами фуранозного кольца.

"2'-O-метил нуклеозид" означает 2'-модифицированный нуклеозид, имеющий 2'-O-метильную модификацию сахара.

"2'-O-метоксиэтил нуклеозид" означает 2'-модифицированный нуклеозид, имеющий 2'-O-метоксиэтильную модификацию сахара. 2'-O-метоксиэтил нуклеозид может содержать модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

"2'-фтор нуклеозид" означает 2'-модифицированный нуклеозид,

имеющий 2'-фтор модификацию сахара. 2'-фтор нуклеозид может содержать модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

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

«Нуклеозид cEt» означает нуклеозид, содержащий фрагмент сахара cEt. Нуклеозид cEt может содержать модифицированное или немодифицированное нуклеиновое основание.

"Нуклеозид S-cEt" означает нуклеозид, содержащий сахарный компонент S-cEt.

"Нуклеозид R-cEt" означает нуклеозид, содержащий сахарный компонент R-cEt.

" β -D-дезоксирибонуклеозид" означает встречающийся в природе нуклеозид ДНК.

" β -D-рибонуклеозид" означает встречающийся в природе нуклеозид РНК.

"Нуклеозид ЗНК" означает нуклеозид, содержащий компонент сахара ЗНК.

"Нуклеозид ЭНК" означает нуклеозид, содержащий компонент сахара ЭНК.

Обзор

Поликистозная болезнь почек (ПБП) является наследственной формой заболевания почек, при которой в почках развиваются заполненные жидкостью кисты, что приводит к почечной недостаточности и часто к развитому заболеванию почек. Некоторые ПБП также характеризуются увеличением почек. Чрезмерная пролиферация кист является отличительной чертой патологии ПБП. При лечении поликистозных болезней основной целью лечения является лечение таких симптомов, как гипертония и инфекции, поддержание функции почек и предотвращение возникновения терминальной стадии почечной недостаточности (ТСПН), что, в свою очередь, улучшает ожидаемую продолжительность жизни субъектов с ПБП.

Уровень кластера микроРНК miR-17-92 членов семейства miR-17 повышен в мышинной модели ПБП. Генетическая делеция кластера miR-17-92 в мышинной модели ПБП снижает рост почечных кист, улучшает функцию почек и продлевает выживаемость (Patel et al, PNAS, 2013; 110(26): 10765-10770). Было показано, что ингибирование miR-17 экспериментальным соединением снижает отношение массы почки к массе тела и улучшает функцию почек в экспериментальной модели ПБП. Кроме того, ингибирование miR-17 также подавляло пролиферацию и рост первичных культур, полученных из кист доноров-людей.

Для идентификации ингибиторов одного или нескольких членов семейства miR-17, которые бы являлись достаточно эффективными, безопасными и удобными для введения субъектам с ПБП, было разработано приблизительно 200 модифицированных олигонуклеотидов, содержащих последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17, которые имеют различную длину и химический состав. Длина соединений составляла от 9 до 20 связанных нуклеозидов, а соединения различались по количеству, типу и размещению химических модификаций. Поскольку фармакология, фармакокинетическое поведение и безопасность не могут быть предсказаны просто на основании химической структуры соединения, соединения были оценены как *in vitro*, так и *in vivo* на наличие таких характеристик, как потентность, эффективность, фармакокинетическое поведение, безопасность и метаболическая стабильность, в серии анализов, разработанных для устранения соединений с неблагоприятными свойствами. Как описано в данном документе, каждое из почти 200 соединений было сначала протестировано в нескольких анализах *in vitro* (например, на активность, токсикологию, метаболическую стабильность), чтобы идентифицировать меньший набор соединений, пригодных для дальнейшего тестирования в более сложных анализах *in vivo* (например, фармакокинетический профиль, эффективность, токсикология). Этот процесс отбора выявил кандидатный фармацевтический агент, RG4326, для лечения ПБП. Как показано в данном документе, изменения в типе и расположении сахарных

фрагментов приводили к существенному влиянию на свойства тестируемых соединений, включая активность и распределение в тканях. RG4326 был выбран в качестве потенциального фармацевтического агента, так как это соединение демонстрировало наиболее подходящие профили фармакодинамики, безопасности и фармакокинетики по сравнению с другими соединениями, имеющими такую же длину и последовательность нуклеиновых оснований, но отличающиеся наборы модификаций сахарами.

Определенные Соединения Данного Изобретения

В данном документе представлены соединения, содержащие модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 9 связанных нуклеозидов, в котором модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру нуклеозидов в ориентации от 5' к 3':



при этом 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; и при этом указанная последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CACUUU-3', причем каждый цитозин представляет собой либо неметилированный цитозин, либо 5-метилцитозин; или его фармацевтически приемлемую соль. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-AGCACUUUG-3', причем каждый цитозин представляет собой либо неметилированный цитозин, либо 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин. В определенных вариантах осуществления каждая связь независимо выбрана из фосфодиэфирной связи и тифосфатной связи. В определенных вариантах осуществления все связи представляют собой тифосфатные связи.

В данном документе представлены соединения структуры $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S G_S$, в которых 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 S-cEt нуклеозиды, каждый цитозин представляет собой или неметилованный цитозин, или 5-метилцитозин; или его фармацевтически приемлемую соль. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин. В определенных вариантах осуществления каждая связь независимо выбрана из фосфодиэфирной связи и тиофосфатной связи. В определенных вариантах осуществления все связи представляют собой тиофосфатные связи.

В данном документе представлены соединения структуры $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S G_S$, в которых 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 S-cEt нуклеозиды, каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин; или его фармацевтически приемлемую соль. В определенных вариантах осуществления каждая связь независимо выбрана из фосфодиэфирной связи и тиофосфатной связи. В определенных вариантах осуществления все связи представляют собой тиофосфатные связи.

В данном документе представлены соединения, содержащие модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 9 связанных нуклеозидов, в котором модифицированный олигонуклеотид имеет следующую структуру нуклеозидов в ориентации от 5' к 3':



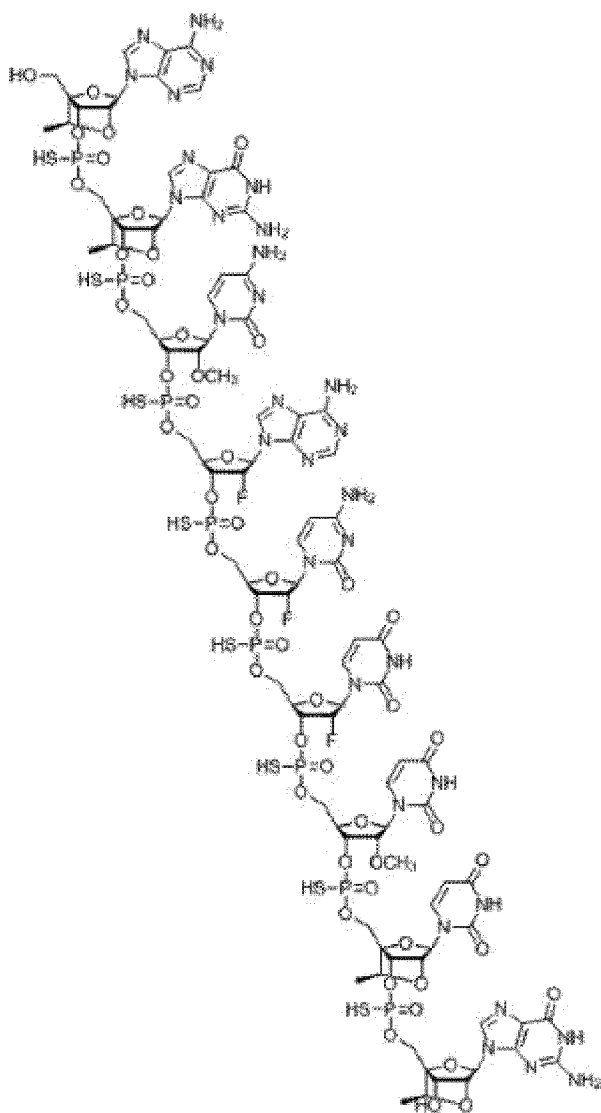
при этом нуклеозиды, за которыми следует индекс «М», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой нуклеозиды S-cEt, и все связи представляют собой тиофосфатные связи; и при этом последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CACUUU-3', причем каждый цитозин

представляет собой либо неметилированный цитозин, либо 5-метилцитозин; или его фармацевтически приемлемую соль. В определенных вариантах осуществления последовательность нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-AGCACUUUG-3', причем каждый цитозин представляет собой или неметилированный цитозин, или 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

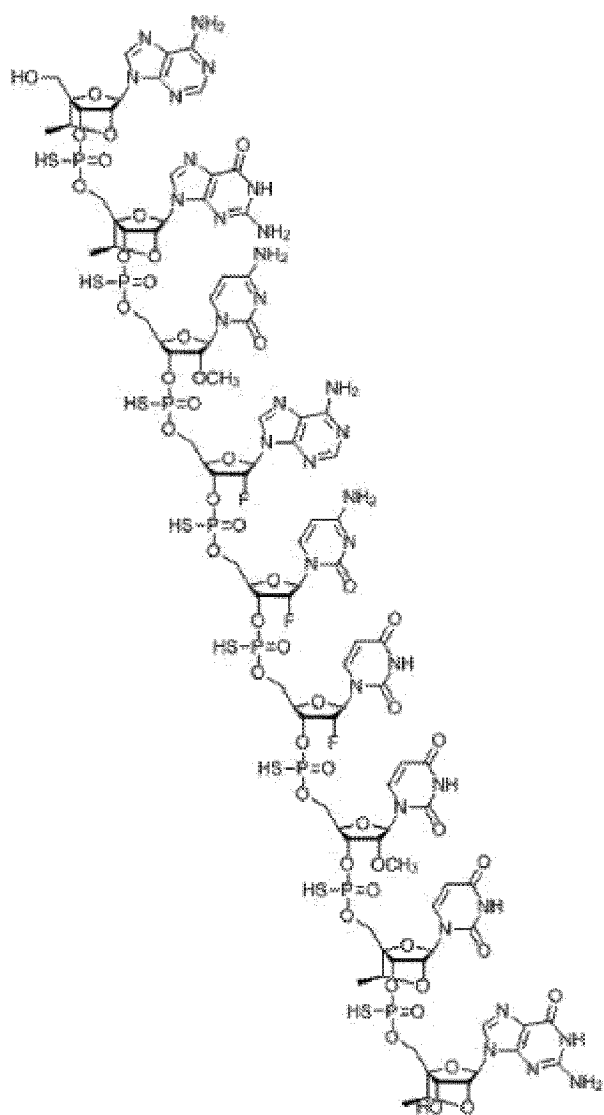
В данном документе представлены соединения структуры $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S G_S$, при этом нуклеозиды, за которыми следует индекс «М», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой S-cEt нуклеозиды, каждый цитозин представляет собой или неметилированный цитозин, или 5-метилцитозин, и все связи представляют собой тиофосфатные связи; или их фармацевтически приемлемую соль. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин.

В данном документе представлены соединения структуры $A_S G_S C_M A_F C_F U_F U_M U_S G_S$, при этом 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 S-cEt нуклеозиды, каждый цитозин представляет собой неметилированный цитозин, и все связи представляют собой тиофосфатные связи; или их фармацевтически приемлемую соль.

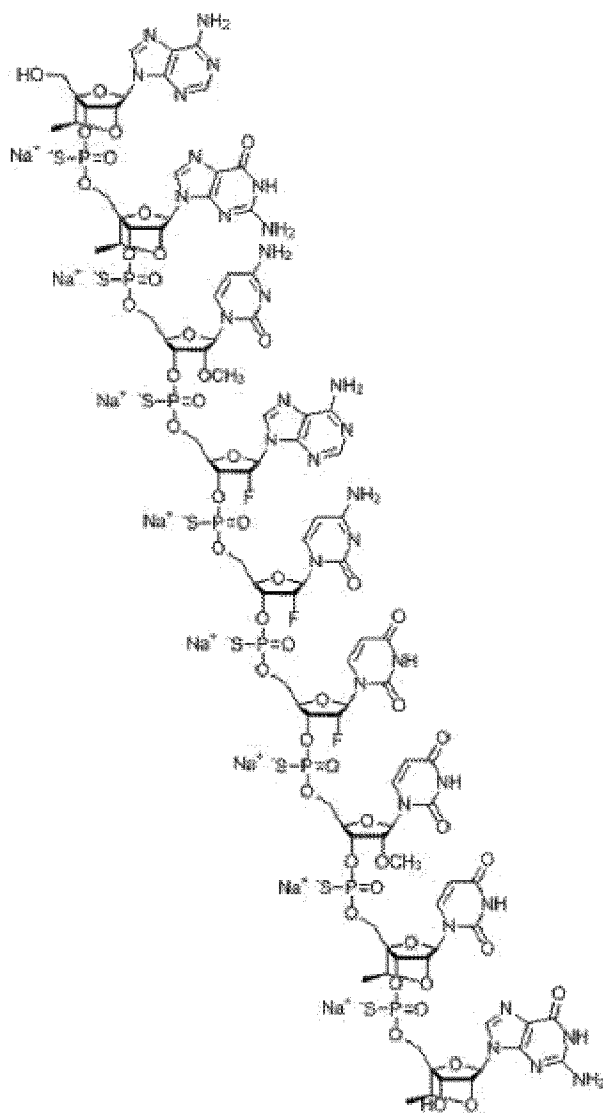
В данном документе представлен модифицированный олигонуклеотид, названный RG4326, в котором структура модифицированного олигонуклеотида представляет собой:



В данном документе также представлены фармацевтически приемлемые соли модифицированного олигонуклеотида RG4326. Таким образом, в определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет структуру:



или его фармацевтически приемлемую соль. Неограничивающая примерная фармацевтически приемлемая соль RG4326 имеет структуру:



В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль модифицированного олигонуклеотида содержит меньше катионных противоионов (таких как Na^+), чем присутствует тиофосфатных и/или фосфодиэфирных связей на молекулу (т. е. некоторые тиофосфатные и/или фосфодиэфирные связи являются протонированными). В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль RG4326 содержит менее 8 катионных противоионов (таких как Na^+) на молекулу RG4326. То есть в определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль RG4326 может содержать в среднем 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 катионных противоионов на молекулу RG4326, причем оставшиеся тиофосфатные группы протонируются.

Определенные применения данного изобретения

В данном документе представлены способы ингибирования активности одного или нескольких членов семейства miR-17 в

клетке, включающие контактирование клетки с соединением, представленным в данном документе, которое содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17.

В данном документе представлены способы ингибирования активности одного или нескольких членов семейства miR-17 у субъекта, включающие введение субъекту фармацевтической композиции, представленной в данном документе. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется заболевание, связанное с одним или несколькими членами семейства miR-17.

В данном документе представлены способы лечения поликистозных заболеваний почек (ПБП), включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, соединения, представленного в данном документе, которое содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется поликистозная болезнь почек. В определенных вариантах осуществления, поликистозную болезнь почек выбирают из аутосомно - доминантной поликистозной болезни почек (АДПБП), аутосомно - рецессивной поликистозной болезни почек (АРПБП) и нефронофтизиса (НФ). В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек выбрана из аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек (АДПБП) и аутосомно-рецессивной поликистозной болезни почек (АРПБП).

В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется расстройство, которое характеризуется множественными не почечными симптомами, а также поликистозной болезнью почек. Такие расстройства включают, например, синдром Жубера и связанные с ним расстройства (JSRD), синдром Меккеля (MKS) или синдром Бардета-Бидля (BBS). Соответственно, в данном документе представлены способы лечения поликистозных заболеваний почек (ПБП), включающие введение субъекту соединения, представленного в данном документе, которое включает последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17, при этом у субъекта имеется синдром Жубера и связанные с ним нарушения (JSRD), синдром Меккеля (MKS)

или синдром Бардета-Бидля (BBS). В данном документе представлены способы лечения поликистозных заболеваний почек (ПБП), включающие введение соединения, представленное в данном документе, которое содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17, при этом субъект подозревается на наличие синдрома Жубера и связанных с ним нарушений (JSRD), синдрома Меккеля (MKS) или синдрома Бардета-Бидля (BBS).

В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек представляет собой аутосомно-доминантную поликистозную болезнь почек (АДПБП). АДПБП вызывается мутациями в гене PKD1 или PKD2. АДПБП является прогрессирующим заболеванием, при котором образование кист и увеличение почек приводят к почечной недостаточности и, в конечном итоге, к терминальной стадии почечной недостаточности у 50% пациентов к 60 годам. Пациентам с АДПБП может потребоваться пожизненный диализ и/или пересадка почки. АДПБП является наиболее частой генетической причиной почечной недостаточности. Чрезмерная пролиферация кист является отличительной чертой патологического признака АДПБП. При лечении поликистозных болезней почек (ПБП) основная цель лечения заключается в поддержании функции почек и предотвращении возникновения терминальной стадии почечной недостаточности (ТСПН), что, в свою очередь, улучшает ожидаемую продолжительность жизни пациентов с поликистозной болезнью почек. Общий объем почек обычно устойчиво увеличивается у пациентов с АДПБП, причем увеличение коррелирует с ухудшением функции почек. В данном документе представлены способы лечения АДПБП, включающие введение субъекту, имеющему или подозреваемому на наличие АДПБП, соединения, представленного в данном документе, которое содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17.

В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек представляет собой аутосомно-рецессивную поликистозную болезнь почек (АРПБП). АРПБП вызывается мутациями в гене PKHD1 и является причиной хронического заболевания почек

у детей. Типичный почечный фенотип АРПВП – увеличенные почки; тем не менее, АРПВП имеет заметное воздействие на другие органы, особенно на печень. Пациенты с АРПКВП прогрессируют до терминальной стадии почечной недостаточности и нуждаются в пересадке почки в возрасте 15 лет. В данном документе представлены способы лечения АРПВП, включающие введение субъекту, имеющему или подозреваемому на наличие АРПВП, соединения, представленного в данном документе, которое содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17.

В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек представляет собой нефронофтизис (НФ).

Нефронофтизис – это аутосомно-рецессивное кистозное заболевание почек, которое является частой причиной ТСПН у детей. НФ характеризуется почками нормального или уменьшенного размера, кистами, сконцентрированными в кортикально-медуллярном сочленении, и тубулоинтерстициальным фиброзом. Мутации в одном из нескольких генов НФ, например, NPHP1, были идентифицированы у пациентов с НФ. В данном документе представлены способы лечения НФ, включающие введение субъекту, имеющему или подозреваемому на наличие НФ, соединения, представленного в данном документе, которое содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17.

В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, имеет синдром Жубера и связанные с ним расстройства (JSRD). JSRD включает в себя широкий спектр отличительных признаков, в том числе аномалии головного мозга, сетчатки и скелета. Некоторые субъекты с JSRD имеют поликистозную болезнь почек, в дополнение к характерным признакам JSRD. Соответственно, в данном документе представлены способы лечения полиполикистозной болезни почек у субъекта, страдающего JSRD, включающие введение субъекту, страдающему JSRD, соединения, представленного в данном документе, которое содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17. В определенных вариантах осуществления субъект подозревается на

наличие JSRD.

В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, имеет синдром Меккеля (MKS). MKS – это расстройство с серьезными признаками и симптомами во многих частях тела, включая центральную нервную систему, скелетную систему, печень, почки и сердце. Общими чертами MKS является наличие многочисленных заполненных жидкостью кист в почках и увеличение почек. Соответственно, в данном документе предоставлены способы лечения MKS, включающие введение субъекту, имеющему MKS, соединения, представленного в данном документе, которое включает последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17. В определенных вариантах осуществления субъект подозревается на наличие MKS.

В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, имеет синдром Бардета-Бидля (BBS). BBS – это заболевание, поражающее многие части тела, включая глаза, сердце, почки, печень и пищеварительную систему. Отличительной чертой BBS является наличие почечных кист. Соответственно, в данном документе предоставлены способы лечения полиполикистозной болезни почек у субъекта, имеющего BBS, включающие введение субъекту, имеющему BBS, соединения, представленного в данном документе, которое содержит последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17. В определенных вариантах осуществления субъект подозревается на наличие BBS.

В определенных вариантах осуществления у субъекта был диагностирован ПБП до введения соединения, содержащего модифицированный олигонуклеотид. Диагностика ПБП может быть достигнута путем оценки параметров, включая, без ограничения, семейную историю субъекта, клинические особенности (включая без ограничения гипертонию, альбуминурию, гематурию и нарушение СКФ), исследования визуализации почек (включая без ограничения МРТ, УЗИ и КТ сканирование) и/или гистологический анализ.

В определенных вариантах диагностика ПБП включает скрининг мутаций в одном или нескольких генах PKD1 или PKD2. В

определенных вариантах диагностика АРПП включает скрининг мутаций в гене PKHP1. В определенных вариантах осуществления диагностика НФ включает скрининг одной или нескольких мутаций в одном или нескольких генах NRHP1, NRHP2, NRHP3, NRHP4, NRHP5, NRHP6, NRHP7, NRHP8, или NRHP9. В определенных вариантах осуществления диагностика JSRD включает скрининг мутаций в генах NRHP1, NRHP6, ANI1, MKS3 или RPGRIP1L. В определенных вариантах осуществления диагностика MKS включает скрининг мутаций в генах NRHP6, MKS3, RPGRIP1L, NRHP3, CC2D2A, BBS2, BBS4, BBS6 или MKS1. В определенных вариантах осуществления диагностика BBS включает скрининг мутаций в генах BBS2, BBS4, BBS6, MKS1, BBS1, BBS3, BBS5, BBS7, BBS7, BBS8, BBS9, BBS10, BBS11 или BBS12.

В определенных вариантах осуществления субъект имеет увеличенный общий объем почек. В определенных вариантах осуществления общий объем почек представляет собой общий объем почек с поправкой на рост (ООППР). В определенных вариантах осуществления субъект имеет гипертонию. В определенных вариантах осуществления субъект имеет нарушенную функцию почек. В определенных вариантах осуществления субъект нуждается в улучшении функции почек. В определенных вариантах осуществления субъект идентифицирован как имеющий нарушенную функцию почек.

В определенных вариантах осуществления уровни одного или нескольких членов семейства miR-17 повышаются в почке субъекта, имеющего ПБП. В определенных вариантах осуществления перед введением определяют, что у субъекта повышен уровень одного или нескольких членов семейства miR-17 в почке. Уровень члена семейства miR-17 можно измерить в материалах 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 любом из представленных в данном документе вариантов осуществления субъект может проходить определенные тесты для диагностики полиполикистозной болезни почек у субъекта, например, для определения причины полиполикистозной болезни почек, для оценки степени полиполикистозной болезни почек у субъекта, и/или определения реакции субъекта на лечение. Такие

тесты могут оценивать 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 поликистоза включают, без ограничения: измерение общего объема почек у субъекта; измерение артериальной гипертонии у субъекта; оценку болей в почках у субъекта; измерение фиброза у субъекта; измерение уровня азота мочевины в крови у субъекта; измерение уровня креатинина в сыворотке у субъекта; измерение клиренса креатинина у субъекта; измерение альбуминурии у субъекта; измерение отношения альбумин:креатинин у субъекта; измерение скорости клубочковой фильтрации у субъекта; измерение гематурии у субъекта; измерение белка NGAL в моче субъекта; и/или измерение белка KIM-1 в моче субъекта. Если не указано иное, уровень азота мочевины в крови, уровень креатинина в сыворотке, клиренс креатинина, альбуминурия, соотношение креатинина и альбумина, скорость клубочковой фильтрации и гематурия относятся к измерению в крови (такой как цельная кровь или сыворотка) субъекта.

Маркеры поликистозных заболеваний почек определяются лабораторными исследованиями. Контрольные диапазоны для отдельных маркеров могут варьироваться от лаборатории к лаборатории. Изменение может быть связано, например, с различиями в используемых конкретных анализах. Таким образом, верхний и нижний пределы нормального распределения маркера в популяции, также известные как верхний предел нормы (ВПН) и нижний предел нормы (НПН), 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.

В определенных вариантах осуществления указанное введение соединения, представленного в данном документе, приводит к одному или нескольким клинически благоприятным результатам. В

определенных вариантах осуществления указанное введение улучшает функцию почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет скорость снижения функции почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение уменьшает общий объем почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет скорость увеличения общего объема почек у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение уменьшает общий объем почек с поправкой на рост (ООППР). В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет скорость увеличения ООППР.

В определенных вариантах осуществления указанное введение ингибирует рост кист у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет скорость увеличения роста кист у субъекта. В определенных вариантах осуществления киста присутствует в почке субъекта. В определенных вариантах осуществления киста присутствует в органе, отличном от почки, например в печени.

В определенных вариантах осуществления указанное введение облегчает боль в почках у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет усиление боли в почках у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение задерживает начало боли в почках у субъекта.

В определенных вариантах осуществления указанное введение снижает артериальную гипертензию у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет ухудшение артериальной гипертензии у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение задерживает возникновение гипертонии у субъекта.

В определенных вариантах осуществления указанное введение уменьшает фиброз в почке субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет ухудшение фиброза в почке субъекта.

В определенных вариантах осуществления указанное введение задерживает начало терминальной стадии почечного заболевания у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное

введение отдалает время диализа для субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение отдалает время трансплантации почки для субъекта. В определенных вариантах введение улучшает ожидаемую продолжительность жизни субъекта.

В определенных вариантах осуществления указанное введение снижает альбуминурию у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет ухудшение альбуминурии у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение задерживает начало альбуминурии у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение снижает гематурию у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет ухудшение гематурии у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение задерживает начало гематурии у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение снижает уровень азота мочевины в крови у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение снижает уровень креатинина в сыворотке у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение улучшает клиренс креатинина у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение снижает отношение альбумин:креатинин у субъекта.

В определенных вариантах осуществления указанное введение улучшает скорость клубочковой фильтрации у субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение замедляет скорость снижения скорости клубочковой фильтрации у субъекта. В определенных вариантах осуществления скорость клубочковой фильтрации представляет собой предполагаемую скорость клубочковой фильтрации (пСКФ). В определенных вариантах осуществления скорость клубочковой фильтрации представляет собой измеренную скорость клубочковой фильтрации (иСКФ).

В определенных вариантах осуществления указанное введение снижает уровень белка связанного с нейтрофильной желатиназой, липокалина (NGAL) в моче субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение уменьшает уровень молекулы 1 повреждения почек (KIM-1) в моче у субъекта.

В любом из вариантов осуществления, предоставленных в

данном документе, субъект может быть подвергнут определенным тестам для оценки степени развития заболевания у субъекта. Такие тесты включают, без ограничения, измерение общего объема почек у субъекта; измерение артериальной гипертензии у субъекта; измерение боли в почках у субъекта; измерение фиброза в почке субъекта; измерение уровня азота мочевины в крови у субъекта; измерение уровня креатинина в сыворотке у субъекта; измерение клиренса креатинина в крови субъекта; измерение альбуминурии у субъекта; измерение отношения альбумин:креатинин у субъекта; измерение скорости клубочковой фильтрации у субъекта, при этом скорость клубочковой адаптации оценивается или измеряется; измерение белка липокалина, связанного с нейтрофильной желатиназой (NGAL) в моче субъекта; и/или измерение белка молекулы-1 повреждения почек (KIM-1) в моче субъекта.

В определенных вариантах осуществления субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, испытывает снижение качества жизни. Например, субъект, имеющий поликистозную болезнь почек, может испытывать боль в почках, которая может снижать качество жизни субъекта. В определенных вариантах осуществления указанное введение улучшает качество жизни субъекта.

В любом из вариантов осуществления, представленных в данном документе, субъект представляет собой человека. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является взрослый человек. В определенных вариантах осуществления взрослому человеку, по меньшей мере, 21 год. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является педиатрический субъект, то есть субъекту менее 21 года. Педиатрические популяции могут быть определены регулирующими органами. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является подросток. В определенных вариантах осуществления подросток имеет возраст, по меньшей мере, 12 лет и возраст менее 21 года. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является ребенок. В определенных вариантах осуществления ребенок имеет возраст, по меньшей мере, два года и возраст менее 12 лет. В определенных вариантах осуществления субъектом-человеком является младенец. В определенных вариантах

осуществления младенец имеет возраст, по меньшей мере, один месяц и возраст менее двух лет. В определенных вариантах осуществления субъект является новорожденным. В определенных вариантах осуществления новорожденный имеет возраст менее одного месяца.

Любое из описанных в данном документе соединений может быть использовано в терапии. Любое из представленных в данном документе соединений может быть использовано для лечения поликистозной болезни почек. В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек представляет собой аутосомно-доминантную поликистозную болезнь почек. В определенных вариантах осуществления поликистозная болезнь почек представляет собой аутосомно-рецессивную поликистозную болезнь почек. В определенном варианте осуществления поликистозная болезнь почек представляет собой нефронофтизис. В определенных вариантах осуществления у субъекта имеется синдром Жубера и связанные с ним расстройства (JSRD), синдром Меккеля (MKS) или синдром Бардета-Бидля (BBS).

Любой из модифицированных олигонуклеотидов, описанных в данном документе, может быть использован для терапии. Любой из модифицированных олигонуклеотидов, представленных в данном документе, может быть использован для лечения поликистозной болезни почек.

Любое из представленных в данном документе соединений может быть использовано для приготовления лекарственного средства. Любое из представленных в данном документе соединений может быть использовано для приготовления лекарственного средства для лечения поликистозной болезни почек.

Любой из модифицированных олигонуклеотидов, представленных в данном документе, может быть использован для приготовления лекарственного средства. Любой из модифицированных олигонуклеотидов, представленных в данном документе, может быть использован для приготовления лекарственного средства для лечения поликистозной болезни почек.

Любая фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, может быть использована для лечения поликистозной

болезни почек.

Некоторые дополнительные способы терапии

Способы лечения при поликистозной болезни почек или любом из перечисленных в данном документе патологических состояний могут включать более чем одну терапию. Таким образом, в определенных вариантах осуществления изобретения, представленных в данном документе, представлены способы лечения субъекта, имеющего поликистозную болезнь почек или подозреваемого в ее наличии, включающие введение, по меньшей мере, одного терапевтического средства в дополнение к введению соединения, предоставленного в данном изобретении, содержащего последовательность нуклеотидных оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17.

В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере, одна дополнительная терапия включает фармацевтический агент.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антигипертензивный агент. Антигипертензивные агенты используются для контроля артериального давления субъекта.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антагонист рецептора 2 вазопрессина. В определенных вариантах осуществления антагонистом рецептора 2 вазопрессина является толваптан.

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

В определенных вариантах осуществления фармацевтические агенты включают ингибиторы ангиотензин II-превращающего фермента (АПФ). В определенных вариантах осуществления ингибитором АПФ является каптоприл, эналаприл, лизиноприл, беназеприл, квинаприл, фозиноприл или рамиприл.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой диуретик. В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой блокатор

кальциевых каналов.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой ингибитор киназы. В определенных вариантах осуществления ингибитор киназы представляет собой бозутиниб или KD019.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антагонист адренергического рецептора.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой антагонист рецептора альдостерона. В определенных вариантах осуществления антагонистом рецептора альдостерона является спиронолактон. В определенных вариантах осуществления, спиронолактон вводят в дозе от 10 до 35 мг в день. В определенных вариантах осуществления спиронолактон вводят в дозе 25 мг в день.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой ингибитор мишени рапамицина млекопитающих (mTOR). В определенных вариантах осуществления ингибитор mTOR представляет собой эверолимус, рапамицин или сиролимус.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой аналог гормона. В определенных вариантах осуществления аналог гормона представляет собой соматостатин или адренокортикотрофный гормон.

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

В определенных вариантах дополнительной терапией является диализ. В определенных вариантах дополнительной терапией является пересадка почки.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические агенты включают противовоспалительные агенты. В определенных вариантах осуществления противовоспалительный агент представляет собой стероидный противовоспалительный агент. В определенных вариантах осуществления стероидный противовоспалительный агент представляет собой кортикостероид. В определенных вариантах

осуществления кортикостероид представляет собой преднизон. В определенных вариантах осуществления противовоспалительное средство представляет собой нестероидное противовоспалительное лекарственное средство. В определенных вариантах осуществления нестероидный противовоспалительный агент представляет собой ибупрофен, ингибитор COX-1 или ингибитор COX-2.

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

В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия может представлять собой фармацевтический агент, который усиливает иммунную систему организма, включая низкие дозы циклофосамида, тимостимулина, витаминов и пищевых добавок (например, антиоксидантов, включая витамины А, С, Е, бета-каротин, цинк, селен, глутатион, коэнзим Q-10 и эхинацею) и вакцины, например иммуностимулирующий комплекс (ISCOM), который содержит вакцинную композицию, которая сочетает в себе мультимерную презентацию антигена и адъюванта.

В определенных вариантах осуществления дополнительная терапия выбрана для обработки или ослабления побочного действия одной или нескольких фармацевтических композиций по данному изобретению. Такие побочные эффекты включают, без ограничения, реакции в месте инъекции, нарушения функции печени, нарушения функции почек, гепатотоксичность, почечную токсичность, нарушения центральной нервной системы и миопатии. Например, повышенные уровни аминотрансферазы в сыворотке могут указывать на гепатотоксичность или нарушение функции печени. Например, повышенный билирубин может указывать на гепатотоксичность или нарушение функции печени.

Определенные последовательности нуклеиновых оснований микроРНК

Семейство miR-17 включает miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-93, miR-106a и miR-106b. Каждый член семейства miR-17 имеет последовательность нуклеиновых оснований, содержащую последовательность нуклеиновых оснований 5'-AAAGUG-3' или центральную последовательность miR-17, которая представляет

собой последовательность нуклеиновых оснований в положениях от 2-го до 7-го из SEQ ID NO: 1. Кроме того, каждый член семейства miR-17 разделяет некоторую идентичность последовательности нуклеиновых оснований вне центральной области. Соответственно, модифицированный олигонуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17, может нацеливаться на другие микроРНК семейства miR-17, в дополнение к 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, который имеет последовательность нуклеиновых оснований 5'-AGCACUUUG-3', нацелен на всех членов семейства miR-17.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CACUUU-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-GCACUUUG-3'. В определенных вариантах осуществления, модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-AGCACUUU-3'. В определенных вариантах осуществления последовательностью нуклеиновых оснований модифицированного олигонуклеотида является 5'-AGCACUUUG-3'.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CACTTT-3'. В определенных вариантах осуществления, модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность

нуклеиновых оснований 5'-CAGUTT-3'. В определенных вариантах осуществления, модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CAGUUT-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CACTUT-3'. В определенных вариантах осуществления, модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CAGUTT-3'. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CACTTU-3'.

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, по меньшей мере, один цитозин представляет собой 5-метилцитозин. В определенных вариантах осуществления каждый цитозин представляет собой 5-метилцитозин.

В определенных вариантах осуществления количество связанных нуклеозидов модифицированного олигонуклеотида меньше, чем длина его целевой микроРНК. Модифицированный олигонуклеотид, рассматривается модифицированным олигонуклеотидом имеющим, последовательность нуклеотидных оснований, которая полностью комплементарна (также называемая 100% комплементарной) области последовательности микроРНК-мишени, если он имеет количество связанных нуклеозидов, длина которых меньше длины микроРНК-мишени, при этом каждая нуклеотидное основание модифицированного олигонуклеотида является комплементарным нуклеиновому основанию в соответствующем положении микроРНК-мишени. Например, модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 9 связанных нуклеозидов, в котром каждое нуклеиновое основание комплементарно соответствующему положению miR-17, является полностью комплементарным miR-17.

В определенных вариантах осуществления модифицированный

олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, имеющую одно неправильное спаривание по отношению к последовательности нуклеинового основания микроРНК-мишени. В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, имеющую два неправильных спаривания по отношению к последовательности нуклеинового основания микроРНК-мишени. В некоторых таких вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид имеет последовательность нуклеиновых оснований, имеющую не более двух неправильных спариваний по отношению к последовательности нуклеинового основания микроРНК-мишени. В некоторых таких вариантах осуществления неправильно спаренные нуклеиновые основания являются смежными. В некоторых таких вариантах осуществления неправильно спаренные нуклеиновые основания не являются смежными.

Хотя перечень последовательностей, сопровождающий эту подачу, идентифицирует каждую последовательность нуклеиновых оснований как «РНК» или «ДНК», как требуется, на практике эти последовательности могут быть модифицированы комбинацией химических модификаций, указанных в данном документе. Специалист в данной области легко поймет, что в перечне последовательностей такое обозначение как «РНК» или «ДНК» для описания модифицированных олигонуклеотидов является несколько произвольным. Например, модифицированный олигонуклеотид, представленный в данном документе, содержащий нуклеозид, содержащий 2'-O- метоксиэтилсахаридную группу и тиминное основание, может быть описан как остаток ДНК в списке последовательностей, даже если нуклеозид модифицирован и не является природным нуклеозидом ДНК.

Соответственно, последовательности нуклеиновых кислот, представленные в перечне последовательностей, предназначены для охвата нуклеиновых кислот, содержащих любую комбинацию природных или модифицированных РНК и/или ДНК, включая, но не ограничиваясь этим, такие нуклеиновые кислоты, имеющие модифицированные нуклеиновые основания. В качестве дополнительного примера и без ограничения, модифицированный олигонуклеотид, имеющий

последовательность нуклеиновых оснований «ATCGATCG» в перечне последовательностей, охватывает любой олигонуклеотид, имеющий такую последовательность нуклеиновых оснований, модифицированную или немодифицированную, включая, но не ограничиваясь этим, такие соединения, содержащие основания РНК, такие как, имеющие последовательность «AUCGAUCG» и те, которые имеют некоторые основания ДНК и некоторые основания РНК, такие как «AUCGATCG» и олигонуклеотиды, имеющие другие модифицированные основания, такие как «AT^mCGAUCG», при этом ^mС обозначает 5-метилцитозин.

Определенные модификации

В определенных вариантах осуществления представленные в данном документе олигонуклеотиды могут содержать одну или несколько модификаций нуклеотидного основания, сахара и/или межнуклеозидной связи и, как таковые, представляют собой модифицированные олигонуклеотиды. Модифицированное нуклеотидное основание, сахар и/или межнуклеозидная связь могут быть выбраны в неизменной форме из-за желательных свойств, таких как, например, повышенное поглощение клетками, повышенное сродство к другим олигонуклеотидам или мишеням нуклеиновых кислот и повышенная стабильность в присутствии нуклеаз.

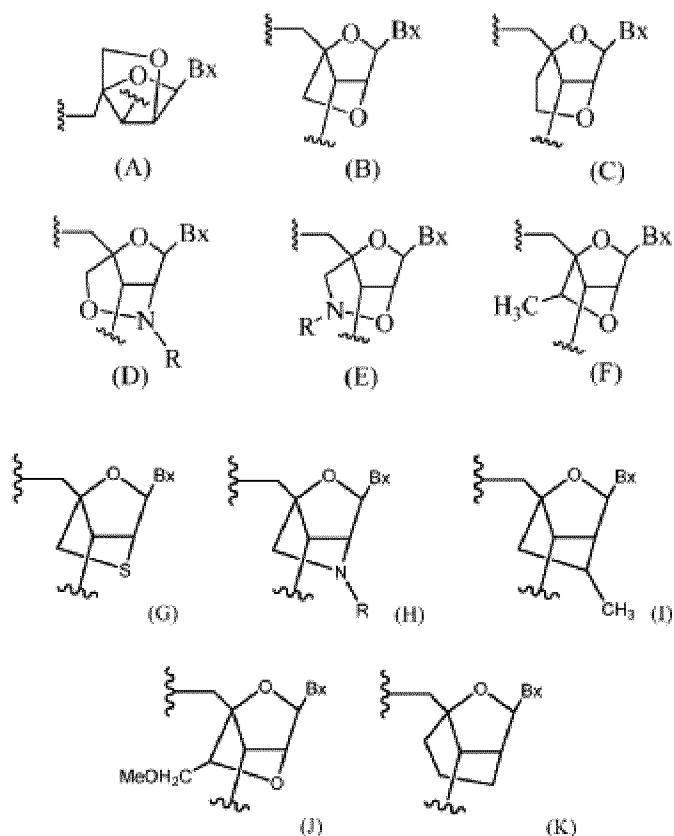
В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит один или несколько модифицированных нуклеозидов.

В определенных вариантах осуществления модифицированный нуклеозид представляет собой модифицированный сахаром нуклеозид. В некоторых таких вариантах осуществления модифицированные сахаром нуклеозиды могут дополнительно содержать природную или модифицированную гетероциклическую основную группу и/или могут быть связаны с другим нуклеозидом через природную или модифицированную межнуклеозидную связь и/или могут включать дополнительные модификации, независимые от модификации сахара. В определенных вариантах осуществления модифицированный по сахару нуклеозид представляет собой 2'-модифицированный нуклеозид, при этом сахарное кольцо модифицировано по 2' углероду природной рибозы или 2'-дезоксирибозы.

В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный

нуклеозид имеет бициклический сахарный фрагмент. В некоторых таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент представляет собой D-сахар в альфа-конфигурации. В некоторых таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент представляет собой D-сахар в бета-конфигурации. В некоторых таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент представляет собой L-сахар в альфа-конфигурации. В некоторых таких вариантах осуществления бициклический сахарный фрагмент представляет собой L-сахар в бета-конфигурации.

Нуклеозиды, содержащие такие бициклические сахарные фрагменты, называют бициклическими нуклеозидами или BNA. В определенных вариантах осуществления бициклические нуклеозиды включают, но не ограничиваются ими, (A) α -L- метиленокси ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$) BNA; (B) β -D-метиленокси ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - 2'$) BNA; (C) этиленокси ($4' - (\text{CH}_2)_2 - \text{O} - 2'$) BNA; (D) аминоокси ($4' - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{N}(\text{R}) - 2'$) BNA; (E) оксиамино ($4' - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}) - \text{O} - 2'$) BNA; (F) метил (метиленокси) ($4' - \text{CH}(\text{CH}_3) - \text{O} - 2'$) BNA (также называемый этилом или cEt); (G) метилен-тио ($4' - \text{CH}_2 - \text{S} - 2'$) BNA; (H) метилен-амино ($4' - \text{CH}_2 - \text{N}(\text{R}) - 2'$) BNA; (I) метилкарбоциклическая ($4' - \text{CH}_2 - \text{CH}(\text{CH}_3) - 2'$) BNA; (J) c-MOE ($4' - \text{CH}(\text{CH}_2 - \text{OMe}) - \text{O} - 2'$) BNA и (K) пропиленкарбоциклическая ($4' - (\text{CH}_2)_3 - 2'$) BNA, как изображено ниже.



где Bx представляет собой группу нуклеинового основания и R, независимо, представляет собой H, защитную группу или C₁-C₁₂ алкил.

В определенных вариантах осуществления 2'-модифицированный нуклеозид содержит 2'-замещающую группу, выбранную из F, OCF₃, O-CH₃ (также называемой "2'-OMe"), OCH₂CH₂OCH₃ (также называемой как «2'-O-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.

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

В определенных вариантах осуществления модифицированный сахаром нуклеозид представляет собой 4'-тио-модифицированный нуклеозид. В определенных вариантах осуществления модифицированный сахаром нуклеозид представляет собой 4'-тио-2'-модифицированный нуклеозид. 4'-тио-модифицированный нуклеозид имеет β-D-рибонуклеозид, при этом 4'-O заменен на 4'-S. 4'-Тио-2'-модифицированный нуклеозид представляет собой 4'-тио-модифицированный нуклеозид, имеющий 2'-ОН, замещенный 2'-замещающей группой. Подходящие 2'-замещающие группы включают 2'-

OCH_3 , $2'\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$ и $2'\text{-F}$.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит одну или несколько межнуклеозидных модификаций. В некоторых таких вариантах осуществления каждая межнуклеозидная связь модифицированного олигонуклеотида является модифицированной межнуклеозидной связью. В определенных вариантах осуществления модифицированная межнуклеозидная связь содержит атом фосфора.

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.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид содержит одно или несколько модифицированных нуклеиновых оснований. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание выбрано из 5-гидроксиметилцитозина, 7-деазагуанина и 7-деазааденина. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание выбрано из 7-деазааденина, 7-деазагуанозина, 2-аминопиридина и 2-пиридона. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное 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.

В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание содержит полициклический гетероцикл. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание содержит трициклический гетероцикл. В определенных вариантах осуществления модифицированное нуклеотидное основание содержит производное феноксазина. В определенных вариантах осуществления феноксазин может быть дополнительно модифицирован для формирования нуклеинового основания, известного в данной области как G-зажим.

В определенных вариантах осуществления модифицированный олигонуклеотид конъюгирован с одним или несколькими фрагментами,

которые усиливают активность, распределение в клетке или поглощение клеткой полученных антисмысловых олигонуклеотидов. В некоторых таких вариантах осуществления фрагмент представляет собой фрагмент холестерина. 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 конъюгатная группа присоединяется непосредственно к олигонуклеотиду. В определенных вариантах осуществления конъюгатная группа присоединяется к модифицированному олигонуклеотиду посредством связывающего фрагмента, выбранного из амина, азидо, гидроксила, карбоновой кислоты, тиола, ненасыщенных групп (например, двойных или тройных связей), 8-амино-3,6-диоксооктановой кислоты (ADO), сукцинимидил-4- (N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), 6-аминогексановая кислота (АНЕХ или АНА), замещенный C1-C10 алкил, замещенный или незамещенный C2-C10 алкенил и замещенный или незамещенный C2-C10 алкинил. В некоторых таких вариантах осуществления группа заместителя выбрана из гидроксила, амина, алкокси, азидо, карбокси, бензила, фенила, нитрила, тиола, тиалкокси, галогена, алкила, арила, алкенила и алкинила.

В некоторых таких вариантах осуществления соединение содержит модифицированный олигонуклеотид, имеющий одну или несколько стабилизирующих групп, которые присоединены к одному или обоим концам модифицированного олигонуклеотида для улучшения таких свойств, как, например, стабильность нуклеазы. В состав стабилизирующих групп входят кэп-структуры. Эти терминальные модификации защищают модифицированный олигонуклеотид от деградации экзонуклеазами и могут помочь в доставке и/или локализации внутри клетки. Указанный кэп может присутствовать на 5'-конце (5'-кэп) или на 3'-конце (3'-кэп) или может присутствовать на обоих концах. Кэп-структуры включают,

например, перевернутые дезоксиабазные кэпы.

Некоторые фармацевтические композиции

В данном документе представлены фармацевтические композиции, содержащие соединение или модифицированный олигонуклеотид, представленные в данном документе, и фармацевтически приемлемый разбавитель. В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой водный раствор. В определенных вариантах осуществления водный раствор представляет собой физиологический раствор. Используемые в данном документе фармацевтически приемлемые разбавители понимаются как стерильные разбавители. Подходящие пути введения включают, без ограничения, внутривенное и подкожное введение.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят в форме единицы дозы. Например, в определенных вариантах осуществления единица дозы находится в форме таблетки, капсулы или болюсной инъекции.

В определенных вариантах осуществления фармацевтический агент представляет собой модифицированный олигонуклеотид, который был приготовлен в подходящем разбавителе, доведен до pH 7,0-9,0 с помощью кислоты или щелочи 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 Хенкса или раствор Рингера. Восстановленный продукт вводится в виде подкожной инъекции или внутривенной инфузии. Лيوфилизированный лекарственный продукт может быть упакован в 2 мл прозрачный стеклянный флакон типа I (обработанный сульфатом аммония), закупорен пробкой из бромбутилкаучука и запечатан алюминиевым поверхностным герметиком.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в данном документе, могут дополнительно содержать другие дополнительные компоненты, обычно встречающиеся в фармацевтических композициях, на их уровне

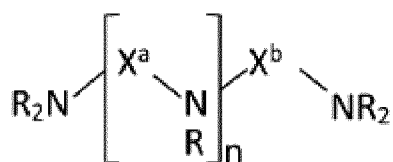
использования в уровнях техники соответствующих областей. Так, например, указанные композиции могут содержать дополнительные совместимые фармацевтически активные материалы, такие как, например, противозудные, вяжущие средства, местные анестетики или противовоспалительные средства.

В определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции, представленные в данном документе, могут содержать дополнительные материалы, полезные для физического составления различных дозированных форм композиций по данному изобретению, такие как красители, ароматизаторы, консерванты, антиоксиданты, дезактиваторы, загустители и стабилизаторы; такие дополнительные материалы также включают, но не ограничиваются ими, эксципиенты, 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 влиять на биологическую активность компонентов композиций по данному изобретению. Составы могут быть стерилизованы и, при желании, смешаны 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 вредно не взаимодействуют с олигонуклеотидом(ами) состава (препарата). Определенные фармацевтические композиции для инъекций представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях и могут содержать рецептурные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Некоторые растворители, подходящие для использования в фармацевтических композициях для инъекций, включают, но не ограничиваются ими, липофильные растворители и жирные масла, такие как кунжутное масло, сложные эфиры синтетических жирных кислот, такие как этилолеат или триглицериды, и липосомы. Водные инъекционные суспензии могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран.

Необязательно, такие суспензии могут также содержать подходящие стабилизаторы или агенты, которые увеличивают растворимость фармацевтических агентов, что позволяет получать высококонцентрированные растворы.

Липидные фрагменты использовались в терапии нуклеиновых кислот в различных способах. В одном способе нуклеиновую кислоту вводят в предварительно образованные липосомы или липоплексы, изготовленные из смесей катионных липидов и нейтральных липидов. В другом методе 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.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит полиаминовое соединение или липидный фрагмент, образующий комплекс с нуклеиновой кислотой. В определенных вариантах осуществления такие препараты включают одно или несколько соединений, каждое из которых по отдельности имеет структуру, определяемую формулой (Z), или его фармацевтически приемлемую соль,



где каждый X^a и X^b , для каждого случая, независимо представляет собой C_{1-6} алкилен; n равно 0, 1, 2, 3, 4 или 5; каждый R независимо представляет собой H , при этом, по меньшей мере, $n+2$ фрагментов R в, по меньшей мере, примерно 80% молекул соединения формулы (Z) в препарате не являются H ; m равно 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 одним или несколькими заместителями; при условии, что, если $n=0$, то по крайней мере $n+3$ R-фрагментов не являются H. Такие препараты описаны в публикации PCT WO/2008/042973, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки для раскрытия липидных препаратов. Некоторые дополнительные препараты описаны в Akins et al., Nature Biotechnology 26, 561-569 (01 May 2008), которая полностью включена в данное описание посредством ссылки для раскрытия липидных препаратов.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, приготовлена с использованием известных методик, включая, но не ограничиваясь ими, процессы смешивания, растворения, гранулирования, изготовления драже, левигации, эмульгирования, капсулирования, захвата или таблетирования.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, представляет собой твердое вещество (например, порошок, таблетку и/или капсулу). В некоторых из таких вариантов осуществления твердую фармацевтическую композицию, содержащую один или несколько олигонуклеотидов, получают с использованием ингредиентов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие агенты, смазывающие вещества, связующие и разрыхлители.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, составлена в виде депо-препарата. Некоторые такие депо-препараты, как правило, действуют дольше, чем не депо-препараты. В определенных вариантах осуществления такие препараты вводят имплантацией (например, подкожно или внутримышечно) или внутримышечной инъекцией. 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.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, включает систему доставки. Примеры систем доставки включают, но не ограничиваются ими, липосомы и эмульсии. Определенные системы доставки полезны для приготовления определенных фармацевтических композиций, включая те, которые содержат гидрофобные соединения. В определенных вариантах осуществления используются определенные органические растворители, такие как диметилсульфоксид.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит одну или несколько тканеспецифических молекул доставки, предназначенных для доставки одного или нескольких фармацевтических агентов по данному изобретению в конкретные ткани или типы клеток. Например, в определенных вариантах осуществления фармацевтические композиции включают липосомы, покрытые тканеспецифическим антителом.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит систему замедленного высвобождения. Неограничивающим примером такой системы замедленного высвобождения является полупроницаемая матрица из твердых гидрофобных полимеров. В определенных вариантах осуществления системы замедленного высвобождения могут, в зависимости от их химической природы, высвобождать фармацевтические агенты в течение нескольких часов, дней, недель или месяцев.

Некоторые фармацевтические композиции для инъекций представлены в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в данном документе, содержит модифицированный олигонуклеотид в терапевтически эффективном количестве. В определенных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество является достаточным для предотвращения, облегчения или ослабления симптомов заболевания

или для продления выживаемости субъекта, которого лечат.

В определенных вариантах осуществления один или несколько модифицированных олигонуклеотидов, представленных в данном документе, составляют 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, потому что их легче вводить, чем соответствующую активную форму. Например, в некоторых случаях пролекарство может быть более биодоступным (например, при пероральном введении), чем соответствующая активная форма. В некоторых случаях пролекарство может иметь улучшенную растворимость по сравнению с соответствующей активной формой. В определенных вариантах осуществления пролекарства менее растворимы в воде, чем соответствующая активная форма. В некоторых случаях такие пролекарства обладают лучшим свойством прохождения через клеточные мембраны, в которых растворимость в воде отрицательно влияет на подвижность. В определенных вариантах осуществления пролекарство представляет собой сложный эфир. В некоторых таких вариантах осуществления сложный эфир метаболически гидролизуеться до карбоновой кислоты при введении. В некоторых случаях содержащее карбоновую кислоту соединение представляет собой соответствующую активную форму. В определенных вариантах осуществления пролекарство содержит короткий пептид (полиаминокислоту), связанный с кислотной группой. В некоторых из таких вариантов осуществления пептид расщепляется при введении с образованием соответствующей активной формы.

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, чтобы изменить метаболическую стабильность или транспортные характеристики лекарства, чтобы замаскировать побочные эффекты или токсичность, для улучшения вкуса лекарственного средства или для изменения других характеристик или свойств лекарства.

Благодаря знанию фармакодинамических процессов и метаболизма лекарств *in vivo* специалисты в данной области, когда известно фармацевтически активное соединение, могут создавать пролекарства соединения (см., например, Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, pages 388-392).

Дополнительные пути введения включают, но не ограничиваются ими, пероральное, ректальное, трансмукозальное, кишечное, энтеральное, местное, суппозитарное, через ингаляцию, интратекальное, внутрисердечное, внутрижелудочковое, внутрибрюшинное, интраназальное, внутриглазное, внутриопухолевое, внутримышечное и интрамедуллярное введение. В определенных вариантах осуществления фармацевтические интратекалы вводят для достижения локального, а не системного воздействия. Например, фармацевтические композиции можно вводить непосредственно в область наступления желаемого эффекта (например, в почку).

Определенные наборы

Данное изобретение также предлагает наборы. В определенных вариантах осуществления наборы включают одно или несколько соединений, содержащих модифицированный олигонуклеотид, раскрытый в данном документе. В определенных вариантах осуществления указанные наборы могут использоваться для введения соединения субъекту.

В определенных вариантах осуществления набор включает фармацевтическую композицию, готовую для введения. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция присутствует во флаконе. Множество флаконов, например 10, может присутствовать, например, в дозирующих упаковках. В определенных вариантах осуществления флакон изготовлен так, чтобы быть доступным для шприца. Набор также может содержать инструкции по применению соединений.

В определенных вариантах осуществления набор содержит фармацевтическую композицию, присутствующую в предварительно заполненном шприце (таком как шприцы на одну дозу, например, с иглой 27 размера, $\frac{1}{2}$ дюйма (1,27 см) с защитой иглы), а не во

флаконе. Множество предварительно заполненных шприцев, например 10, может присутствовать, например, в дозирующих упаковках. Набор также может содержать инструкции по введению соединений, содержащих модифицированный олигонуклеотид, описанный в данном документе.

В определенных вариантах осуществления набор содержал модифицированный олигонуклеотид, представленный в данном документе, в виде лиофилизированного лекарственного продукта и фармацевтически приемлемый разбавитель. При подготовке к введению субъекту лиофилизированный лекарственный продукт восстанавливается в фармацевтически приемлемом разбавителе.

В определенных вариантах осуществления в дополнение к соединениям, содержащим модифицированный олигонуклеотид, раскрытый в данном документе, набор может дополнительно включать одно или несколько из следующего: шприц, спиртовой тампон, ватный тампон и/или марлевую прокладку.

Определенные экспериментальные модели

В определенных вариантах осуществления данное изобретение предоставляет способы использования и/или тестирования модифицированных олигонуклеотидов по данному изобретению в экспериментальной модели. Специалисты в данной области могут выбрать и модифицировать протоколы для таких экспериментальных моделей для оценки фармацевтического агента по изобретению.

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

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 оценивать путем измерения уровня одного или нескольких предсказанных или подтвержденных регулируемых микроРНК транскриптов. Ингибирование микроРНК

активности может привести к увеличению уровня транскрипта, регулируемого членом семейства miR-17, и/или белка, кодируемого транскриптом, регулируемым членом семейства miR-17 (т. е. транскрипт, регулируемый членом семейства miR-17, является дерепрессированным). Кроме того, в определенных вариантах осуществления могут быть измерены определенные фенотипические результаты.

Специалистам в данной области доступно несколько моделей животных для изучения одного или нескольких членов семейства miR-17 на моделях заболеваний человека. Модели поликистозных заболеваний почек включают, но не ограничиваются ими, модели с мутациями и/или делециями в Pkd1 и/или Pkd2; и модели, содержащие мутации в других генах. Неограничивающие иллюстративные модели ПБП, содержащие мутации и/или делеции в Pkd1 и/или Pkd2, включают гипоморфные модели, такие как модели, содержащие миссенс-мутации в Pkd1, и модели с пониженной или нестабильной экспрессией Pkd2; индуцибельные модели условного нокаута; и модели условного нокаута. Неограничивающие иллюстративные модели ПБП, содержащие мутации в генах, отличных от Pkd1 и Pkd2, включают модели с мутациями в Pkhd1, Nek8, Kif3a и/или Nphp3. Модели ПБП рассматриваются, 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

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

Модуляция активности микроРНК с помощью миметика анти-miR или микроРНК может быть оценена с помощью профилирования мРНК на

микромассивах. Последовательности мРНК, которые модулируются (количество увеличивается или уменьшается) миметиком анти-miR или микроРНК исследуются на предмет наличия центральной последовательности микроРНК, чтобы сравнить модуляцию мРНК, которые являются мишенями этой микроРНК, с модуляцией мРНК, которые не являются мишенями этой микроРНК. Таким образом, может быть оценено взаимодействие анти-miR с его микроРНК-мишенью или миметика микроРНК с его мишенями. В случае анти- miR, мРНК, уровни экспрессии которых повышены, подвергают скринингу на последовательности мРНК, которые содержат последовательность комплементарную центральной для последовательности микроРНК, которой анти-miR является комплементарной.

Модуляцию активности микроРНК соединением анти-miR можно оценить путем измерения уровня матричной РНК-мишени микроРНК, либо путем измерения уровня самой матричной РНК, либо транскрибированного из нее белка. Антисмысловое ингибирование микроРНК обычно приводит к увеличению уровня матричной РНК и/или белка целевой матричной РНК микроРНК, то есть обработка анти-miR приводит к дерепрессии одной или нескольких целевых матричных РНК.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры представлены для того, чтобы более полно проиллюстрировать некоторые варианты осуществления изобретения. Однако их никоим образом не следует истолковывать как ограничивающие широкий диапазон изобретения. Специалисты в данной области техники легко примут основополагающие принципы этого открытия для разработки различных соединений, не отступая от сущности данного изобретения.

Пример 1: Роль miR-17 в ПБП

Члены кластера микроРНК miR-17-92 семейства miR-17 активируются в мышинной модели ПБП. Генетическая делеция кластера miR-17-92 в мышинной модели ПБП снижает рост почечных кист, улучшает функцию почек и продлевает выживаемость (Patel et al, PNAS, 2013; 110 (26): 10765-10770). Кластер miR-17-92 содержит 6 различных микроРНК, каждый с отличающейся последовательностью: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19-b-1 и miR-92a-1.

Кластер miR-17-92 включает две микроРНК, miR-17 и miR-20a, которые являются членами семейства микроРНК miR-17. Каждый член этого семейства разделяет идентичность центральной последовательности и различные степени идентичности последовательности за пределами области центральной последовательности. Другими членами семейства miR-17 являются miR-20b, miR-93, miR-106a и miR-106b. miR-20b и miR-106a, которые находятся в кластере miR-106a-363 на X-хромосоме человека, а miR-93 и miR-106b находятся в кластере miR-106b-25 на хромосоме 7 человека. Последовательности членов семейства miR-17 показаны в Таблице 1.

Таблица 1: МикроРНК семейства miR-17

микроРНК	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ (от 5' к 3') область центральной последовательности 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

Предыдущие исследования с использованием инструментального исследовательского соединения анти-miR-17 выявили роль miR-17 в ПБП в двух разных моделях ПБП, модели *Pkd2*-КО (также известной как *Pkhd1/cre*; модель *Pkd2^{F/F}*) и модели *Pcy*. Инструментальный исследовательский модифицированный олигонуклеотид, комплементарный miR-17, был протестирован на мышинной модели ПБП. Соединение анти-miR-17 представляло собой полностью тиофосфатный олигонуклеотид в 19-связанных нуклеозидов длиной (5'-СТGCACTGTAAGCACTTTG-3'; SEQ ID NO: 7) с ДНК, 2'-МОЕ и S-cEt сахарными фрагментами. Хотя указанное соединение имеет неправильные спаривания по отношению к другим членам семейства miR-17, тестирование в анализах *in vitro* показало, что оно гибридизуется и ингибирует всех членов семейства miR-17.

У мышей *Pkd2*-КО спонтанно развивается поликистозная болезнь

почек. Мышей обрабатывали 20 мг/кг инструментального соединения анти-miR-17 или контрольного олигонуклеотида или ФСБ. Результаты показали, что обработка анти-miR-17 мышей *Pkd2-KO* снижала измеряемый параметр первичной обработки, отношение массы почки к массе тела, на 17% по сравнению с контрольной обработкой ($p=0,017$). Лечение анти-miR-17 также значительно снижало АМК и экспрессию мРНК биомаркеров повреждения почек, *Kim1* и *Ngal*, у мышей *Pkd2-KO*. Наконец, лечение анти-miR-17 привело к тенденции снижения уровня креатинина в сыворотке и снижению кистозного индекса у мышей *Pkd2-KO*. Эти результаты не наблюдались при использовании анти-miR-контроля, что указывает на то, что они специфически связаны с ингибированием miR-17.

У мышей *Pcy*, несущих мутацию в *Nphr3*, спонтанно развивается поликистозная болезнь почек с более медленным прогрессированием заболевания, чем у мышей *Pkd2-KO*. Мышей обрабатывали 50 мг/кг инструментального соединения анти-miR-17 или ФСБ один раз в неделю в течение 26 недель. Среднее отношение массы почек к массе тела у мышей *Pcy*, получавших анти-miR-17, было на 19% ниже, чем среднее отношение массы почек к массе тела у мышей *Pcy*, которым вводили только ФСБ ($p=0,0003$). Мыши *Pcy*, обработанные анти-miR-17, показали снижение кистозного индекса в среднем на 28% по сравнению с мышами *Pcy*, которым вводили только ФСБ ($p=0,008$).

Эти данные продемонстрировали, что в двух разных экспериментальных моделях ПБП miR-17 является подтвержденной мишенью для лечения ПБП.

Пример 2: Проектирование соединения и скрининг

В то время как инструментальное исследовательское соединение показало эффективность в моделях ПБП, было обнаружено, что указанное соединение является слегка провоспалительным в исследовании *in vivo*. Кроме того, инструментальное исследовательское соединение не было достаточно эффективным в разработке в качестве фармацевтического средства для лечения ПБП.

Соответственно, был проведен скрининг для выявления ингибиторов одного или нескольких членов семейства miR-17,

которые являются достаточно эффективными, удобными для введения и безопасными для введения субъектам с ПБП. Дополнительным критерием было достаточно высокое отношение доставки в почки к доставке в печень, для увеличения пропорции соединения анти-miR-17, которое доставляется в орган-мишень.

Было сконструировано приблизительно 200 модифицированных олигонуклеотидов, содержащих последовательность нуклеиновых оснований, комплементарную центральной последовательности miR-17, с различной длиной и химическим составом. Длина соединений составляла от 9 до 20 связанных нуклеозидов, а соединения различались по количеству, типу и размещению химических модификаций. Поскольку эффективность и безопасность не могут быть предсказаны на основе химической структуры соединения нуклеинового основания, соединения были оценены как *in vitro*, так и *in vivo* на такие характеристики, как потентность, эффективность, фармакокинетическое поведение, вязкость, безопасность и метаболическая стабильность, в серии анализов, разработанных для устранения соединений с неблагоприятными свойствами. В некоторых анализах инструментальное соединение анти-miR-17 использовали в качестве эталона, с которым сравнивали соединения библиотеки. Как описано ниже, каждое из почти 200 соединений было сначала протестировано в нескольких анализах *in vitro* (например, на активность, токсикологию, метаболическую стабильность), чтобы идентифицировать меньший набор соединений, пригодных для дальнейшего тестирования в более сложных анализах *in vivo* (например, фармакокинетический профиль, эффективность, токсикология). Процесс скрининга был разработан для идентификации потенциального фармацевтического агента на основе агрегированных данных всех анализов с акцентом на эффективность, фармакокинетический профиль (например, доставку в почки) и характеристики безопасности.

Потентность и эффективность in vitro и in vivo

Эффективность *in vitro* оценивали с использованием анализа с люциферазным репортером. Плаزمид с люциферазным репортером для miR-17 с двумя полностью комплементарными сайтами связывания miR-17 в тандеме в 3'-UTR гена люциферазы. Соединения большей

длины отбирали, если их максимальное ингибирование было больше, чем у инструментального соединения анти-miR-17. Поскольку более короткие соединения, такие как 9-меры, как правило, не являются максимально активными в тех же самых условиях анализа, которые используются для более длинных соединений, более короткие соединения были выбраны на основе максимального ингибирования по отношению к соответствующим контрольным соединениям. Таким образом, соединения, которые отличаются по длине и химическому составу, были включены в дальнейшие испытания.

Активность *in vivo* оценивали с использованием микроРНК анализ сдвига полисом (miPSA – microRNA polysome shift assay). Этот анализ был использован для определения степени, в которой соединения непосредственно взаимодействуют с мишенью miR-17 в почках у нормальных и ПБП мышей. MiPSA основывается на том принципе, что активные микроРНК связываются с их мРНК мишенями в трансляционно активных полисомах с высокой молекулярной массой (BMM), в то время как ингибированные микроРНК находятся в полисомах низкой ММ (HMM). Обработка анти- miR приводит к смещению микроРНК от полисом BMM к полисомам HMM. Таким образом, miPSA обеспечивает прямое измерение целевого взаимодействия микроРНК с помощью комплементарного анти-miR (Androsavich et al., Nucleic Acids Research, 2015, 44: e 13).

Выбранные соединения, которые прошли несколько критериев скрининга, оценивали на эффективность в экспериментальных моделях ПБП, например, на мышинной модели Pkd2-KO и мышинной модели Pcy. Мышей обрабатывали соединением анти-miR-17 и оценивали клинически значимые измеряемые параметры, включая отношение массы почки к массе тела, уровень азота мочевины в крови, уровни креатинина в сыворотке и кистозный индекс почки.

Фармакокинетические свойства

Метаболическую стабильность оценивали путем инкубации каждого соединения анти-miR-17 в лизате печени мыши. Через 24 часа рассчитывали процент оставшегося неповрежденного соединения. Соединения, которые не являются стабильными после 24-часовой инкубации, потенциально не являются стабильными *in vivo*.

Фармакокинетические свойства и распределение в тканях выбранных соединений оценивали у мышей дикого типа C57BL6 и мышей JСК (экспериментальная модель ПБП). Соединение вводили мышам дикого типа в дозе 0,3, 3 или 30 мг/кг или мышам JСК в дозе 3, 30 или 100 мг/кг. Через семь дней мышей умерщвляли. Ткани почек и печени собирали. Концентрацию анти-miR-17 соединения измеряли в печени и почках. Отдавали предпочтение соединениям, которые накапливаются в большем количестве в почках по сравнению с печенью (то есть имеют более высокое отношение накопления в почках к накоплению в печени).

Полный фармакокинетический профиль для выбранных соединений, которые прошли множественные критерии скрининга, был получен у мышей C57BL6. В одном исследовании мышам вводили однократную подкожную инъекцию соединения анти-miR-17 в дозе 30 мг/кг. В другом исследовании мышам вводили три подкожных инъекции соединения анти-miR-17 в дозе 39 мг/кг в течение двухмесячного периода. В каждом исследовании образцы печени и почек собирают через 1 час, 4 часа, 8 часов, 1 день, 4 дня, 7 дней, 14 дней, 28 дней и 56 дней после инъекций.

Токсикологические данные

В анализах *in vitro* потенциал токсичности оценивали с использованием биохимического анализа флуоресцентного связывания (FBA-biochemical fluorescent binding assay) и анализа срезов печени или почек. FBA выполняется путем инкубации флуоресцентного красителя с каждым соединением и немедленного измерения флуоресценции. Сильно флуоресцентные соединения обладают способностью вызывать токсичность *in vivo*. Анализ срезов печени или почек проводят путем инкубации среза ткани из образца сердцевины печени, выделенного из крысы. После 24-часовой инкубации РНК выделяют из среза ткани и измеряют уровни экспрессии 18 провоспалительных генов. Индукция экспрессии провоспалительных генов указывает на потенциал для провоспалительных эффектов *in vivo*.

Дополнительные токсикологические оценки *in vivo* проводили путем введения нормальным мышам (мышам Sv129) однократной подкожной инъекции 300 мг/кг соединения анти-miR-17. Через

четыре дня мышей умерщвляли, собирали кровь для химического анализа сыворотки, взвешивали печень и селезенку и выделяли РНК из тканей почек и печени. Был измерен уровень экспрессии провоспалительного гена, интерферон-индуцированного белка с тетратрикопептидными повторами (IFIT – interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats). Поскольку индукция экспрессии IFIT потенциально указывает на токсичность, соединения, которые не индуцируют экспрессию IFIT, являются предпочтительными.

На протяжении всего процесса скрининга некоторые соединения анти-miR-17 показали хорошие результаты в нескольких анализах. Хотя ни одно соединение не являлось лучшим в каждом анализе, после нескольких стадий скрининга некоторые соединения проявляли особенно благоприятные характеристики, такие как высокая активность и относительно высокое отношение накопления в почках к накоплению в печени. Из почти 200 соединений, которые были протестированы в анализах *in vitro*, приблизительно 20 соответствовали критериям для дальнейшего тестирования *in vivo*. Эти 20 соединений были в конечном итоге сокращены до пяти соединений, и, наконец, до одного соединения, RG4326, которое имело наилучший общий профиль и было выбрано в качестве потенциального фармацевтического агента. После идентификации этого соединения были проведены дополнительные исследования для оценки потентности, фармакокинетического профиля и эффективности.

RG4326 имеет следующую последовательность и схему химической модификации: $A_5G_5C_M A_F C_F U_F U_M U_S G_S$, в которой нуклеозиды, за которыми следует индекс «М», представляют собой 2'-О-метил-нуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует индекс «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует индекс «S», представляют собой нуклеозиды S-cEt, каждый цитозин является неметилированным цитозином, а все связи являются тиофосфатными связями. Как проиллюстрировано в следующих примерах, это соединение демонстрировало сильное целевое взаимодействие с miR-17 *in vivo*, эффективность на мышинной модели ПБП и фармакокинетический профиль, который

благоприятствовал распределению в почки.

Кроме того, было установлено, что вязкость RG4326 составляет 6 сП при концентрации приблизительно 150 мг/мл (в воде при 20°C), таким образом, RG4326 в растворе подходит для введения подкожной инъекцией.

Пример 3. Дополнительные короткие соединения анти-miR-17.

Дополнительное соединение из девяти нуклеотидов (RG4047), в котором каждый нуклеозид представляет собой нуклеозид S-cEt, было протестировано в отдельных анализах для сравнения активности, безопасности и фармакокинетического профиля с RG4326.

Одним из использованных анализов был анализ на люциферазу. Как отмечалось выше, короткие (например, 9-нуклеотидные) анти-miR-17-соединения, хотя они и могут иметь преимущество в исследованиях *in vivo*, не обязательно хорошо работают в анализах трансфекции *in vitro*. Соответственно, условия трансфекции в люциферазном анализе были оптимизированы для коротких соединений анти-miR-17, так что можно было измерить ингибирующую активность соединений.

RG5124 использовали в качестве контрольного соединения. RG5124 имеет длину 9 связанных нуклеозидов и имеет тот же характер модификации сахаров, что и RG4326, но имеет последовательность нуклеиновых оснований, которая не комплементарна miR-17.

Репортерная плазмида люциферазы для miR-17 содержала полностью комплементарный сайт связывания miR-17 в 3'-UTR гена люциферазы. Клетки HeLa трансфицировали миметиком микроРНК и его когнатным репортером люциферазы с последующей трансфекцией анти-miR-17 в дозах 0,001, 3, 10, 30, 100 и 300 нМ. В конце 24-часового периода трансфекции измеряли активность люциферазы. Как показано в Таблице 2-1, RG4047, хотя и не так сильно, как RG4326, ингибировал активность miR-17 в зависимости от дозы. СО указывает на стандартное отклонение.

Таблица 2-1: Люциферазный репортерный анализ

			Кратность дерепрессии люциферазы в каждой концентрации анти-miR-17 (нМ)					
			300 нМ	100 нМ	30 нМ	10 нМ	3 нМ	0.001 нМ
RG4326	AsGsCMAfCFUfUMU sGs	Среднее	11,7	13,9	14,1	10,4	5,3	1
		CO	3,6	6,5	6,9	4,9	1,8	0,2
RG5124	AsCsAMAfUfGfCMAsCs	Среднее	1	0,7	1	2,6	1,2	1
		CO	0,3	0,4	0,4	2,8	0,4	0,2
RG4047	AsGsCsAsCsUsUsUsGs	Среднее	7,5	8,2	3,5	2,2	1,6	1
		CO	3	3	3	3	3	60

RG4047 оценивали на активность *in vivo*, безопасность и распределение по почкам и печени. Как и в случае с большим скринингом библиотеки, активность *in vitro* не предсказывала поведение *in vivo*. RG4047 вызывал слабый провоспалительный сигнал как в почках, так и в печени, был менее сильным ингибитором miR-17, чем RG4326 *in vivo*, как у мышей дикого типа, так и у мышей с ПБП, и имел гораздо более низкое отношение накопления в почках к накоплению в печени (см. Таблицу 2-2). Эти исследования показали, что активность и свойства RG4047 не были улучшены по сравнению с RG4326.

Для дальнейшего изучения влияния размещения, типа и количества химических модификаций на активность и отношение накопления в почках к накоплению в печени для 9-мерных соединений дополнительные анти-miR-17-соединения оценивали у мышей дикого типа и мышей JCK. Модель JCK представляет собой мышиную модель медленно прогрессирующей поликистозной болезни почек, связанной с тем же геном, который вызывает нефронофтизис 9-го типа у человека. Почечные кисты у этой мыши развиваются в нескольких областях нефрона.

MiPSA использовали для оценки активности каждого соединения, измеренной по шкале замещения, у мышей дикого типа и мышей JCK. Тканевое накопление соединения анти-miR-17 измеряли путем экстракции соединения с использованием жидкостно-жидкостной экстракции (LLE-liquid-liquid extraction) и/или твердофазной экстракции (SPE-solid-phase extraction) с последующим анализом идентичности и концентрации соединения с

использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии ионного спаривания с обращенной фазой (ion-pairing-reversed-phase) в сочетании с масс-спектрометрией времени полета (IP-RP-HPLC-TOF).

Результаты для этих дополнительных соединений, а также для RG4326 и RG4047 показаны в Таблице. 2-2.

Мышам дикого типа вводили однократную дозу 3 мг/кг для анализа miPSA и однократную дозу 30 мг/кг для анализа накопления в тканях. Мышам JCK вводили однократную дозу 30 мг/кг как для miPSA, так и для анализа накопления в тканях. Ткань почки отбирали через семь дней после введения соединения анти-miR-17. Как показано в Таблице 2-2, изменения в типе и расположении модифицированных нуклеозидов продемонстрировали существенное влияние на ингибирующую активность miR-17 и/или отношение накопления в почках к накоплению в печени анти-miR-17 соединений. Например, в то время как RG4324 проявлял активность, измеренную с помощью miPSA, соотношение почка: печень было ниже, чем у других соединений. Более высокое отношение накопления в почках к накоплению в печени, как правило, является предпочтительным для заболевания, при котором основным местом действия является почка. Наоборот, RG4327 демонстрировал высокое отношение почка: печень, но низкую активность у мышей с ПБП. Как отмечено выше, RG4326 проявлял наиболее подходящую потенциальность и фармакокинетический профиль для лечения ПБП.

Таблица 2-2: Сравнение активности и накопления в тканях соединения анти-miR-17

Соединение	Последовательность (от 5' до 3') и химические модификации	Соотношение накопления в почках к накоплению в печени мышей дикого типа	Соотношение накопления в почках к накоплению в печени у ПБП мышей	miPSA показатель у мышей дикого типа	miPSA показатель у мышей с ПБП
<u>4047</u>	<u>AsGsCsAsCsUsUsUsGs</u>	<u>4,4</u>	<u>2,1</u>	<u>1,76</u>	<u>1,80</u>
<u>4324</u>	<u>AsGsCMA sCMU sUMU sGs</u>	<u>5,0</u>	<u>3,9</u>	<u>2,81</u>	<u>2,53</u>
<u>4325</u>	<u>AsGsCMAmCMUMUMU sGs</u>	<u>12,4</u>	<u>5,7</u>	<u>1,82</u>	<u>2,00</u>
<u>4326</u>	<u>AsGsCMAfCFUFUMU sGs</u>	<u>9,8</u>	<u>6,0</u>	<u>2,63</u>	<u>2,65</u>

<u>4327</u>	<u>AsGmCFAfCFUfUfUMGs</u>	<u>24,9</u>	<u>9,4</u>	<u>2,85</u>	<u>1,53</u>
-------------	---------------------------	-------------	------------	-------------	-------------

Пример 4. Активность RG4326 в дополнительных анализах in vitro

Дополнительные исследования in vitro были проведены для дальнейшего изучения активности RG4326. Репортерный анализ люциферазы использовали для проверки способности RG4326 ингибировать членов семейства miR-17: miR-17, miR-20a, miR-93 и miR-106b. Была сконструирована репортерная плазмида люциферазы для каждого из miR-20a, miR-93 и miR-106b с полностью комплементарным сайтом связывания микроРНК в 3'-UTR гена люциферазы. Клетки HeLa трансфицировали с помощью миметика микроРНК и его когнатного репортера люциферазы с последующей трансфекцией анти-miR-17 в дозе 100 нМ. Как показано в Таблице 3, каждая из miR-17, miR-20a, miR-93 и miR-106b была ингибирована RG4326, демонстрируя, что соединение анти-miR-17 ингибирует несколько членов семейства miR-17. Поскольку RG4326 на 100% комплементарен другим не протестированным членам семейства miR-17, miR-20b и miR-106b, ожидается, что они также ингибируют эти микроРНК. Данные в Таблице 3 также показаны на Фиг. 1А.

Таблица 3: Ингибирование семейства miR-17 in vitro.

	Среднее значение (раз) дерепрессии люциферазы	CO
miR-17	13,1	1,6
miR-20	21,7	2,8
miR-93	10,9	0,9
miR-106	17,7	5,5

Чтобы проверить способность RG4326 ингибировать регуляцию miR-17 эндогенных мишеней, дерепессию гена-мишени miR-17 оценивали in vitro в нескольких типах клеток почек из почек нормальных мышей и мышей с ПБП. Клетки собирательного протока почки мышей (IMCD3) обрабатывали 0,3 нМ, 1,2 нМ, 4,7 нМ, 18,8 нМ, 75 нМ и 300 нМ RG4326 или контрольным олигонуклеотидом RG5124. Дополнительные контрольные группы включали необработанные клетки и ложно-трансфицированные клетки (клетки, обработанные только реагентом для трансфекции). После 24-

часового периода трансфекции клетки собирали и экстрагировали РНК. Уровни мРНК 18 генов-мишеней miR-17 были измерены и усреднены для обеспечения фармакодинамического значения характерного набора параметров (ФД значение характерного набора параметров), представленного в виде Log2-кратного изменения (Log2FC) относительно ложной трансфекции. Как показано в Таблице 4, RG4326, но не контрольное лечение, дерепрессировало мишени miR-17 в зависимости от дозы. Данные также показаны на Фиг. 2В.

Таблица 4: ФД значение характерного набора параметров miR-17 в клетках IMCD3

		Концентрация соединения анти-miR-17 (нМ)					
		0,3	1,2	4,7	18,8	75	300
RG4326	Среднее Log2FC	-0,075	-0,067	0,027	0,272	0,369	0,373
	CO	0,020	0,017	0,014	0,037	0,006	0,002
RG5124	Среднее Log2FC	-0,083	-0,103	-0,097	-0,108	-0,124	-0,065
	CO	0,033	0,013	0,026	0,041	0,039	0,037

Способность RG4326 к дерепрессии мишеней miR-17 также оценивали на дополнительных типах клеток почек, полученных из почек как нормальных, так и ПБП мышей. Клетки обрабатывали 30 нМ RG4326 или контрольного олигонуклеотида RG5124. После 24-часового периода трансфекции клетки собирали и экстрагировали РНК. Уровни мРНК 18 генов-мишеней miR-17 были измерены и усреднены для обеспечения фармакодинамического значения характерного набора параметров (ФД значение характерного набора параметров), представленного в виде Log2-кратного изменения (Log2FC) относительно ложной трансфекции. Как показано в Таблице 5, RG4326, но не контрольный олигонуклеотид, дерепрессировал мишени miR-17 в нескольких различных типах клеток, полученных из здоровых и больных почек. «Р <0,05» указывает значение р менее 0,05, рассчитанное с помощью одностороннего ANOVA (анализа вариации). «НЗ» указывает на изменение, которое не является статистически значимым.

Таблица 5: Дерепрессия мишеней miR-17 в клетках почек

Тип клетки почки мыши	Номенклатура клеточных линий	Мышь Происхождение почек	RG4326 ФД значение характерного набора	RG5124 ФД значение характерного набора
--------------------------	------------------------------------	--------------------------------	---	---

			параметров (Log2FC@30 нМ)	параметров (Log2FC@30 нМ)
Собираательные протоки	DBA-ДТ	Нормальные	0,40 ±0,09; p<0,05	0,10 ±0,05; НЗ
Собираательные протоки	DBA-ПБП	ПБП	0,52 ±0,06; p<0,05	-0,07 ±0,02; НЗ
Собираательные протоки	IMCD3	Нормальные	0,57 ±0,06; p<0,05	-0,03 ±0,05; НЗ
Собираательные протоки	M1	Нормальные	0,18 ±0,18; p<0,05	-0,08 ±0,02; НЗ
Дистальные канальцы	МСКТ	Нормальные	0,10±0,01; p<0,05	0,03 ±0,01; НЗ
Проксимальные канальцы	LTL-ДТ	Нормальные	0,35 ±0,02; p<0,05	-0,04 ±0,02; НЗ
Проксимальные канальцы	LTL-ПБП	ПБП	0,39±0,01; p<0,05	-0,03 ±0,04; НЗ

Пример 5: Потентность RG4326 in vivo

МикроРНК анализ сдвига полисом (miPSA) использовали для идентификации соединений, которые непосредственно связываются с miR-17 в почках у нормальных и ПБП мышей. MiPSA основывается на том принципе, что активные микроРНК связываются с их мРНК мишенями в трансляционно активных полисомах с высокой молекулярной массой (ВММ), в то время как ингибированные микроРНК находятся в полисомах низкой ММ (НММ). Обработка анти-miR приводит к смещению микроРНК от полисом ВММ к полисомам НММ. Таким образом, miPSA обеспечивает прямое измерение целевого взаимодействия микроРНК с помощью комплементарного анти-miR (Androsavich et al., Nucleic Acids Research, 2015, 44: e13).

Для этого эксперимента в качестве модели ПБП была выбрана модель JCK – мышьяная модель медленно прогрессирующей поликистозной болезни почек, связанная с тем же геном, который вызывает нефронофтизис 9-го типа человека. Почечные кисты у этой мыши развиваются в нескольких областях нефрона.

Мышей C57BL6 обрабатывали однократной подкожной дозой 0,3, 3 и 30 мг/кг RG4326 или инструментального анти-miR-17 (описано в Примере 1). Мышей JCK обрабатывали одной подкожной дозой 3, 30 и 100 мг/кг RG4326 или инструментального анти-miR-17. Обработку ФСБ использовали в качестве дополнительного контроля.

Через семь дней после обработки мышей умерщвляли и выделяли почечную ткань для miPSA. Рассчитанные оценки смещения, показанные в Таблице 6, продемонстрировали сильное целевое взаимодействие RG4326 как в нормальных, так и в ПБП почках. Показатели замещения после обработки RG4326 были выше чем показатели замещения после обработки инструментальным соединением анти-miR-17. Данные для мышей дикого типа и мышей JСК также показаны на Фиг. 3А и 3В соответственно.

Таблица 6: Целевое взаимодействие с RG4326 in vivo

		miR					miR		
		0,3 мг/ кг	3 мг/ кг	30 мг/ кг			3 мг/ кг	30 мг/кг	100 мг/ кг
RG4326	Среднее	2,29	2,91	3,19		Среднее	1,63	2,58	2,73
	СО	0,52	0,97	0,81		СО	0,04	0,32	0,53
Инструментальный анти-miR-17	Среднее	1,51	2,05	2,77		Среднее	0,97	1,67	2,08
	СО	0,51	0,79	0,55		СО	0,21	0,27	0,46
PBS	Среднее	0,03				Среднее	0,00		
	СО	0,52				СО	0,28		

Пример 6: Эффективность in vivo RG4326 в экспериментальных моделях ПБП

Две экспериментальные модели ПБП были использованы для оценки эффективности. У мышей Pkd2-KO спонтанно развивается поликистозная болезнь почек, и их использовали в качестве модели АДПБП. См. Patel et al., PNAS, 2013; 110 (26): 10765-10770. У мышей Pcy, несущих мутацию в Nphp3, спонтанно развивается поликистозная болезнь почек с более медленным прогрессированием заболевания, чем у мышей Pkd2-KO. Модель Pcy используется в качестве модели нефронофтизиса. См. Harpe and Peters, Nat. Rev. Nephrol., 2014; 10: 587-601.

Модель Pkd2-KO

RG4326 был протестирован на мышинной модели АДПБП Pkd2-KO. Эта модель также упоминается как модель PKD2-KO. Мыши дикого типа были использованы в качестве контрольных мышей.

Олигонуклеотид, комплементарный микроРНК, не родственный miR-17, использовали в качестве контроля обработки по специфичности (RG5124).

В каждый из дней 10, 11, 12 и 19 от рождения одинаковым по полу мышам одного помета вводили подкожную инъекцию RG4326 в дозе 20 мг/кг (n=12), RG5124 в дозе 20 мг/кг (n=12), инструментального анти-miR-17 в дозе 20 мг/кг (n=12) или ФСБ (n=12). Мышей умерщвляли в возрасте 28 дней и измеряли массу почек, массу тела, кистозный индекс, 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 снижения травм и повреждений почек и улучшения функции. Статистическая значимость была рассчитана односторонним ANOVA с множественной коррекцией Даннетта.

Кистозный индекс представляет собой гистологическое измерение кистозной области относительно общей площади почек. Для этого анализа одну почку перфузировали холодным ФСБ и 4% (вес/объем) параформальдегидом и затем брали для анализа. Почки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 2 часов и затем помещали в парафин для разрезания. Сагиттальные срезы почек окрашивали гематоксилином и эозином (H & E). Все этапы обработки изображения были автоматизированы и выполнялись в свободно доступном программном обеспечении с открытым исходным кодом: скрипт R1, в котором использовались функции из пакета 2 EB Image Bioconductor и набора инструментов обработки изображений ImageMagick3. H&E изображения почек в формате Aperio SVS были преобразованы в изображения TIFF, и первый кадр был сохранен для анализа изображения. Сначала общая площадь сечения почки была рассчитана с использованием сегментации изображения. Сегментация изображения использовалась аналогичным образом, чтобы найти все внутренние структуры, включая почечную кисту. Был применен фильтр для удаления всех объектов, у которых радиус меньше трех пикселей. Кистозный индекс – это область изображения, связанная с кистами, деленная на общую площадь почек. Кистозный индекс рассчитывали отдельно для продольного и поперечного срезов почек

для каждого отдельного животного.

Комбинированный кистозный индекс отдельных животных сравнивали для каждой группы обработки.

Результаты представлены в Таблице 7. Среднее отношение массы почек к массе тела (отношение МП/МТ) у мышей Pkd2-KO, обработанных RG4326, было на 29% ниже, чем среднее отношение МП/МТ у мышей Pkd2-KO, которым вводили ФСБ ($p=0,0099$). Мыши Pkd2-KO, обработанные RG4326, показали снижение кистозного индекса в среднем на 12% по сравнению с мышами Pkd2-KO, которым вводили ФСБ, хотя различие не было статистически значимым. Средние уровни АМК были снижены на 13% у мышей Pkd2-KO, получавших ФСБ, хотя разница не была статистически значимой. Средние уровни креатинина в сыворотке у мышей Pkd2-KO, получавших RG4326, были на 18% ниже, чем у мышей Pkd2-KO, которым вводили ФСБ, хотя результат не был статистически значимым. Эти результаты не наблюдались с контрольным олигонуклеотидом, что указывает на то, что они специфически связаны с ингибированием miR-17. В то время как предыдущее исследование продемонстрировало снижение отношения МП/МТ, АМК и кистозного индекса в Pkd2-KO после обработки препаратом анти-miR-17, статистически значимых изменений в этом исследовании не наблюдалось. Лечение контрольным олигонуклеотидом, RG5124, не уменьшало отношение массы почки к массе тела, кистозного индекса или АМК.

Соотношение МП/МТ, АМК и кистозный индекс также показаны на Фиг. 4А, Фиг. 4В и Фиг. 4С, соответственно.

Таблица 7: Эффективность RG4326 в модели ПБП Pkd2-KO

		МП/МТ мг/г Соотношение	АМК mg/dL	Кистозный индекс	Сыворотка креатинин mg/dL
RG4326	Среднее	40,98	72,92	50,3	0,26
	СО	5,973	15,1	10,21	0,05
RG5124	Среднее	55,35	86,67	56,67	0,31
	СО	11,73	20,18	6,679	0,08
ФСБ	Среднее	57,72	83,58	56,86	0,31
	СО	18,47	23,96	7,928	0,14

Эти результаты демонстрируют, что обработка RG4326 приводит

к положительному результату у мышей Pkd2-KO для биологического измеряемого параметра, относящегося к лечению ПБП, объема почек относительно массы тела. Что касается этого конкретного измеряемого параметра, RG4326 было более эффективно, чем инструментальное соединение анти-miR-17. Обработка RG4326 привела к тенденции к снижению АМК и уменьшению кистозного индекса у мышей Pkd2-KO.

Модель Pcy

RG4326 был протестирован на мышинной модели Pcy. Мышей дикого типа использовали в качестве контрольной группы. С четырехнедельного возраста мышей Pcy обрабатывали один раз в неделю путем подкожной инъекции RG4326 в дозе 25 мг/кг, инструментального анти-miR-17 в дозе 25 мг/кг, контрольного олигонуклеотида RG5124 в дозе 25 мг/кг или ФСБ. Каждая группа обработки содержала 15 мышей-самцов. Три курса обработки проводились в возрасте 55, 56 и 57 дней, а затем еженедельно в возрасте 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14 недель. Также был протестирован толваптан, антагонист рецептора вазопрессина V2 (VRA), который назначают некоторым пациентам с поликистозной болезнью почек. Мыши были умерщвлены в возрасте 15 недель. Вес тела был записан. Одну из почек экстрагировали и взвешивали, а другие обрабатывали для гистологического анализа для расчета кистозного индекса, как описано для исследования в Pkhd1/cre; Pkd2^{F/F}. Измеряли уровень азота мочевины в крови (АМК) и уровень креатинина в сыворотке. Статистическая значимость была рассчитана односторонним ANOVA с множественной коррекцией Даннетта.

Результаты представлены в Таблице 8. Относительно среднего отношения МП/МТ у мышей, обработанных ФСБ, среднее отношение МП/МТ у обработанных Pcy мышей было на 19% ниже в группе, получавшей 25 мг/кг RG4326 ($p=0,0055$). Кроме того, кистозный индекс был уменьшен на 34% у мышей Pcy, получавших RG4326, по сравнению с мышами Pcy, которым вводили ФСБ ($p=0,016$). Обработка RG4326 снизила АМК у мышей Pcy на 16% по сравнению с АМК у мышей Pcy, обработанных ФСБ ($p=0,0070$). Обработка контрольным олигонуклеотидом или инструментальным соединением анти-miR-17 не

приводила к статистически значимому снижению отношения МП/МТ, АМК или кистозного индекса. Толваптан не был эффективным в этом исследовании. Данные в Таблице 8 также показаны на Фиг. 5.

Таблица 8: Эффективность RG4326 в модели Pcy

		МП/МТ Соотношение	АМК	Кистозный Индекс
RG4326	Среднее	18,1	19,7	0,16
	CO	2,0	2,8	0,06
RG5124	Среднее	21,4	21,2	0,23
	CO	3,4	2,3	0,08
Толваптан	Среднее	20,1	24,4	0,26
	CO	4,5	3,4	0,09
ФСБ	Среднее	22,5	23,4	0,24
	CO	3,9	3,8	0,07

Эти данные демонстрируют в дополнительной модели ПБП, что лечение RG4326 приводит к снижению массы почек, АМК и кистозного индекса.

Пример 7: Фармакокинетическая оценка RG4326

Из-за их пониженной способности связываться с белками сыворотки, которая является свойством, определяющим распределение олигонуклеотидов в организме, не сильно ожидается, что короткие олигонуклеотиды будут обладать фармакокинетическими свойствами, которые делают их пригодными для использования в качестве лекарственных средств. RG4326 инкубировали в гомогенате печени мыши, обезьяны или человека. Идентичность и концентрацию RG4326 и метаболитов определяли после 24- часовой инкубации. RG4326 и метаболиты были экстрагированы с помощью жидкостно-жидкостной экстракции (LLE) и/или твердофазной экстракции (SPE), которые затем были проанализированы на идентичность и концентрацию с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии ионного спаривания с обращенной фазой (ion-pairing-reversed-phase) в сочетании с масс-спектрометрией времени полета (IP-RP-HPLC-TOF). Как показано в Таблице 9, несмотря на свою короткую длину, было обнаружено, что RG4326 имеет особенно благоприятный фармакокинетический профиль, причем более 95% исходного соединения RG4326 остается интактным после 24-часовой инкубации.

Таблица 9: Метаболическая стабильность *in vitro* в лизате печени мыши, обезьяны и человека

Ex Vivo лизат печени (% анализатора)				
Соединение	Последовательность	Мышь	Обезьяна	Человек
RG4326	5'-AsGsCMAFCFUfUMUsGs-3'	99,1	95,9	98,7
Метаболит 1	5'-A ₅ G ₅ CMAFCF-3'	0,3	1,8	0,6
Метаболит 2	5'-A ₅ G ₅ CMAF-3'	0,6	2,3	0,7

Фармакокинетическое поведение оценивали путем введения однократной подкожной дозы 30 мг/кг RG4326 или инструментального соединения анти-miR-17 мышам дикого типа. Через один час, четыре часа, восемь часов, один день, семь дней, 14 дней, 28 дней и 56 дней после однократной инъекции мышей умерщвляли и измеряли среднюю концентрацию соединения анти-miR в ткани почек и печени (мкг/г) как описано выше. Площадь под кривой (AUC) была рассчитана для ткани почек и печени по формуле $\text{мкг} \cdot \text{ч/г}$, при этом мкг – количество олигонуклеотида в ткани, ч – время сбора ткани в часах, а г – вес ткани. Определяли отношение AUC почек к AUC печени. Ткань почки также обрабатывали для miPSA, чтобы определить целевое взаимодействие для каждого соединения в этом исследовании. PSA AUC рассчитывали по формуле $\text{Log2FC} \cdot \text{ч}$, при этом Log2FC – величина замещения, ч – момент сбора ткани в часах. Потенциал почек на 7-й день рассчитывали по формуле $\text{Log2FC} + \text{г/мкг}$, при этом Log2FC – величина замещения, определяемая miPSA, г – масса ткани почки, а мкг – количество анти-miR в ткани почки на седьмой день.

Как показано в Таблице 10, отношение AUC почки к AUC печени для RG4326 выше, чем для инструментального анти-miR-17. Поразительно, что, хотя AUC в почке ниже для RG4326, чем для соединения с анти-miR-17 средства, активность, определенная miPSA, существенно выше. Таким образом, RG4326 проявляет большую активность при более низких концентрациях в почке, основной ткани-мишени для ПБП.

Таблица 10: Фармакокинетический профиль RG4326

Профиль in vivo после однократного приема при 30 мг/кг		Инструментальный Anti-miR-17	RG4326
Фармакокинетика	AUC почки (мкг * ч/г; от одного часа до 56 дней)	20711	5347
	AUC печени (мкг * ч/г; от одного часа до 56 дней)	20275	1206
	Соотношение KAUC/LAUC	1,0	4,4
Ингибирование miR- 17	AUC miPSA почек (Log2FC * ч; от 8 часов до 7 дней)	296	463
Потентность	Почка D7 (Log2FC * г/мкг)	<u>0,047</u>	<u>0,351</u>

Фармакокинетическое поведение RG4326 было дополнительно охарактеризовано у мышей дикого типа (C57B16) и мышей ПБП (JCK). Группы по 5 мышей получали три подкожных инъекции по 10 мг/кг в каждый из трех последовательных дней. Через один, четыре, семь, 14 и 21 день после третьей и последней инъекции мышей умерщвляли и отбирали образцы плазмы, почек и печени. Для измерения RG4326 экстрагировали с использованием жидкостно-жидкостной экстракции (LLE) и/или твердофазной экстракции (SPE), и затем анализировали на идентичность и концентрацию с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии ионного спаривания с обращенной фазой (ion-pairing-reversed-phase) в сочетании с масс-спектрометрией времени полета (IP-RP-HPLC-TOF).

Данные обобщены в Таблице 11. Наблюдалось, что RG4326 является стабильным как в плазме, так и в тканях, причем более 90% исходного соединения остается через 21 день. Анти- miR распределяется по тканям быстро, в течение нескольких часов после инъекции и, прежде всего, в почку. Период полувыведения составляет приблизительно восемь дней в печени и почках мышей дикого типа, приблизительно шесть дней в печени мышей JCK и приблизительно 8 дней в почках мышей JCK. У мышей дикого типа отношение AUC почек к AUC печени составляло 17. У мышей с ПБП отношение AUC почек к AUC печени составляло 13. Эти данные демонстрируют, что фармакокинетический профиль RG4326 сопоставим у нормальных и ПБП мышей.

Таблица 11: Фармакокинетический профиль RG4326 у нормальных

и ПБП мышей

Мышиная модель	Нормальные		ПБП	
Линия мышей	C57BL6		JСК	
Матрикс ткани	Печень	Почка	Печень	Почка
%Родителей	>90%	>90%	>90%	>90%
C _{24ч}	1,6 мкг/г	61,4 мкг/г	5,9 мкг/г	66,5 мкг/г
T _{1/2}	~ 8 дней	~ 8 дней	~ 6 дней	~ 8 дней
AUC _{0-21дней}	17 мкг * день/г	282 мкг * день/г	37 мкг * день/г	497 мкг * день/г
Соотношение По/Пе (AUC)	17		13	
Соотношение По/Пе (C _{24h})	38		11	

Пример 8: Оценка безопасности RG4326

Потенциал токсичности для почек и печени оценивали в анализах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

Потенциал токсичности оценивали с использованием биохимического анализа флуоресцентного связывания (FBA – biochemical fluorescent binding assay). FBA выполняется путем инкубации флуоресцентного красителя с каждым соединением и немедленного измерения флуоресценции. Результаты выражены в виде кратности изменения (линейный FC) относительно контрольных образцов.

Сильно флуоресцентные соединения обладают способностью вызывать токсичность *in vivo*.

Анализы *ex vivo* проводили с использованием срезов ткани печени или почек. Анализ срезов печени или почек проводят инкубацией среза ткани из образца сердцевины печени или почки, выделенных из крысы.

После 24- часовой инкубации РНК извлекают из среза ткани и измеряют уровни экспрессии 18 провоспалительных генов, включая IFIT. Было выполнено преобразование log₂ изменения кратности (Log₂-FC) относительно обработки ФСБ. Индукция экспрессии провоспалительных генов указывает на потенциал для провоспалительных эффектов *in vivo*.

Анализ *in vivo* проводили на нормальных мышах Sv129.

Вводилась однократная подкожная доза RG4326 300 мг/кг. В качестве контроля были включены ФСБ и два анти-miR, не относящихся к miR-17, один из которых известен как провоспалительный (положительный контроль), а другой – не провоспалительный (отрицательный контроль). Четыре дня спустя мышей умерщвляли. Ткань почки и печени выделяли для выделения РНК. Уровень экспрессии гена IFIT, о котором известно, что он индуцируется во время воспалительного ответа, измеряли и нормализовали по GAPDH мыши. Было выполнено преобразование $\log_2$ изменения кратности ($\text{Log}_2\text{-FC}$) относительно обработки ФСБ.

Таблица 11: Профиль безопасности RG4326

	Положительный контроль	Отрицательный контроль	RG4326
Биохимический флуоресцентный анализ связывания Единица относительной флуоресценции (Линейный FC)	136,4 ± 14,9	46,3 ± 14,7	24,9 ± 3,1
<i>Ex Vivo</i> анализ срезов почек Харктерное распределение провоспалительного параметра ($\text{Log}_2\text{-FC}$)	1,35 ± 0,35	0,39 ± 0,07	-0,30 ± 0,22
Анализ срезов печени <i>Ex Vivo</i> Экспрессия IFIT3 ($\text{Log}_2\text{-FC}$)	7,57 ± 0,62	0,54 ± 0,60	1,11 ± 0,32
<i>In vivo</i> анализ острой фазы Экспрессия IFIT в почках ($\text{Log}_2\text{-FC}$) Экспрессия IFIT в печени ($\text{Log}_2\text{-FC}$)	1,29 ± 0,58 2,24 ± 0,84	0,28 ± 0,31 0,62 ± 0,54	0,34 (n=1) 0,21 ± 0,08

Эти данные продемонстрировали, что RG4326 показал благоприятный профиль безопасности и минимальный риск склонности вызывать воспаление, что основано на множественных анализах.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> REGULUS THERAPEUTICS INC.
 <120> МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОЛИКИСТОЗНОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК
 <130> 01138-0029-00PCT
 <150> US 62/430,139
 <151> 2016-12-05
 <160> 7
 <170> PatentIn версия 3.5
 <210> 1
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 caaagugcuu acagugcagg uag 23
 <210> 2
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 uaaagugcuu auagugcagg uag 23
 <210> 3
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 caaagugcuc auagugcagg uag 23
 <210> 4
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 caaagugcug uucgugcagg uag 23
 <210> 5
 <211> 23
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 aaaagugcuu acagugcagg uag 23
 <210> 6
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> Homo sapiens

<400> 6
uaaagugcug acagugcaga u 21

<210> 7
<211> 19
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> модифицированный олигонуклеотид

<400> 7
ctgcactgta agcactttg 19

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, содержащее модифицированный олигонуклеотид, состоящий из 9 связанных нуклеозидов, в котором указанный модифицированный олигонуклеотид имеет следующую характер распределения нуклеозидов в ориентации от 5' к 3':



при этом нуклеозиды, за которыми следует подстрочное «М», представляют собой 2'-О-метилнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует подстрочное «F», представляют собой 2'-фторнуклеозиды, нуклеозиды, за которыми следует подстрочное «S», представляют собой S-cEt нуклеозиды, и все связи представляют собой тиофосфатные связи; а также

при этом последовательность нуклеиновых оснований указанного модифицированного олигонуклеотида содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-CACUUU-3', причем каждый цитозин независимо выбран из неметилованного цитозина и 5-метилцитозина; или их фармацевтически приемлемой соли.

2. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что указанная последовательность нуклеиновых оснований указанного модифицированного олигонуклеотида содержит последовательность нуклеиновых оснований 5'-GCACUUU-3', причем каждый цитозин независимо выбран из неметилованного цитозина и 5-метилцитозина.

3. Соединение по п. 1, отличающееся тем, что указанная последовательность нуклеиновых оснований указанного модифицированного олигонуклеотида представляет собой 5'-AGCACUUUG-3', причем каждый цитозин независимо выбран из неметилованного цитозина и 5-метилцитозина.

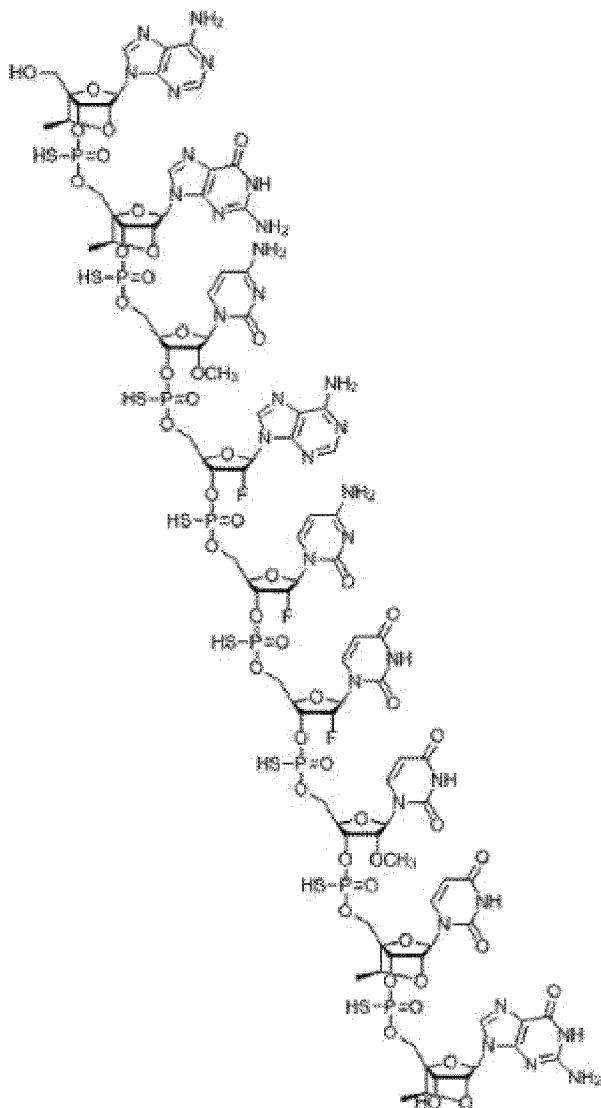
4. Соединение по любому из пп. 1, 2 или 3, отличающееся тем, что каждый цитозин представляет собой неметилованный цитозин.

5. Соединение по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что указанное соединение состоит из указанного модифицированного олигонуклеотида или его фармацевтически приемлемой соли.

6. Соединение по любому из пп. 1-5, отличающееся тем, что

указанная фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

7. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль.

8. Модифицированный олигонуклеотид по п. 7, отличающийся тем, что представляет собой фармацевтически приемлемую соль указанной структуры.

9. Модифицированный олигонуклеотид по п. 7, отличающийся тем, что представляет собой натриевую соль указанной структуры.

10. Модифицированный олигонуклеотид, имеющий структуру:

12. Фармацевтическая композиция по п. 11, отличающаяся тем, что указанный фармацевтически приемлемый разбавитель представляет собой водный раствор.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-6 или модифицированный олигонуклеотид по любому из пп. 7-10, которая представляет собой лиофилизированную композицию.

15. Фармацевтическая композиция, состоящая по существу из соединения по любому из пп. 1-6 или модифицированного

олигонуклеотида по любому из пп. 7-10 в физиологическом растворе.

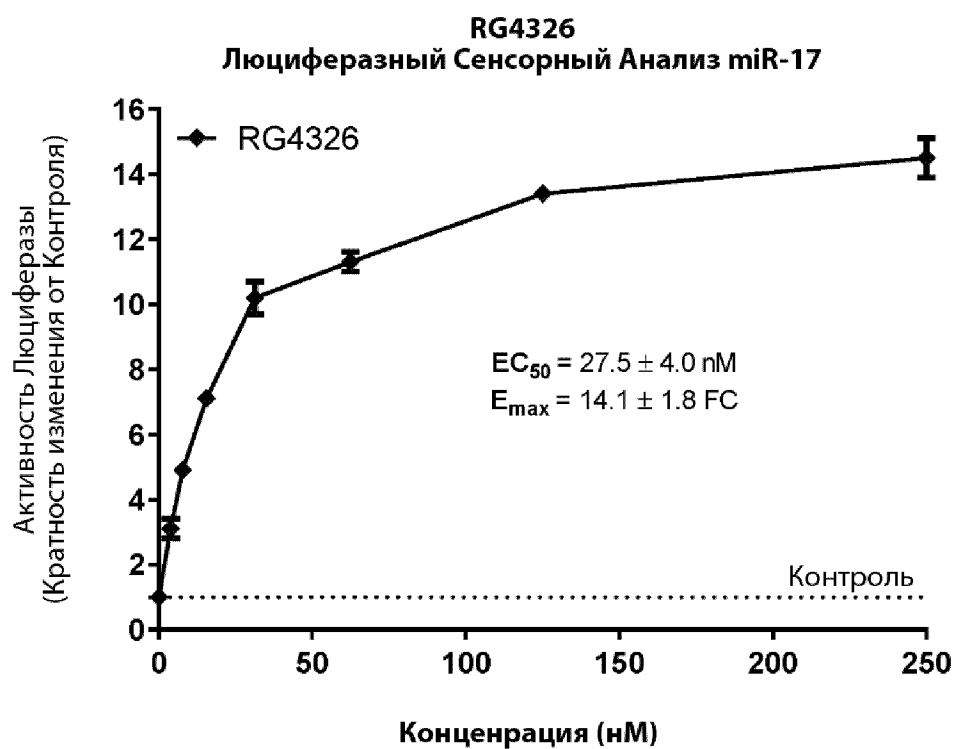
16. Способ ингибирования активности одного или нескольких членов семейства miR-17 в клетке, включающий контактирование клетки с соединением по любому из пп. 1-6 или модифицированным олигонуклеотидом по любому из пп. 7-10.

17. Способ ингибирования активности одного или нескольких членов семейства miR-17 у субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по любому из пп. 11-15.

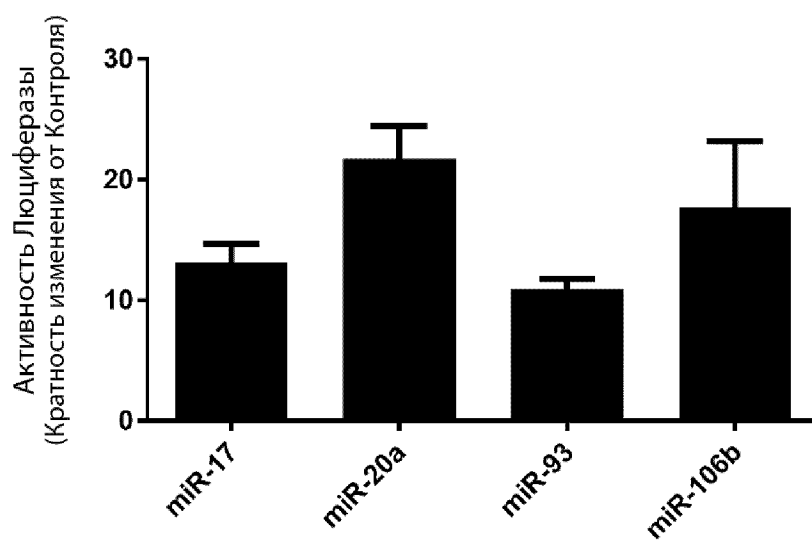
18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанный субъект имеет заболевание связанное с miR-17.

По доверенности

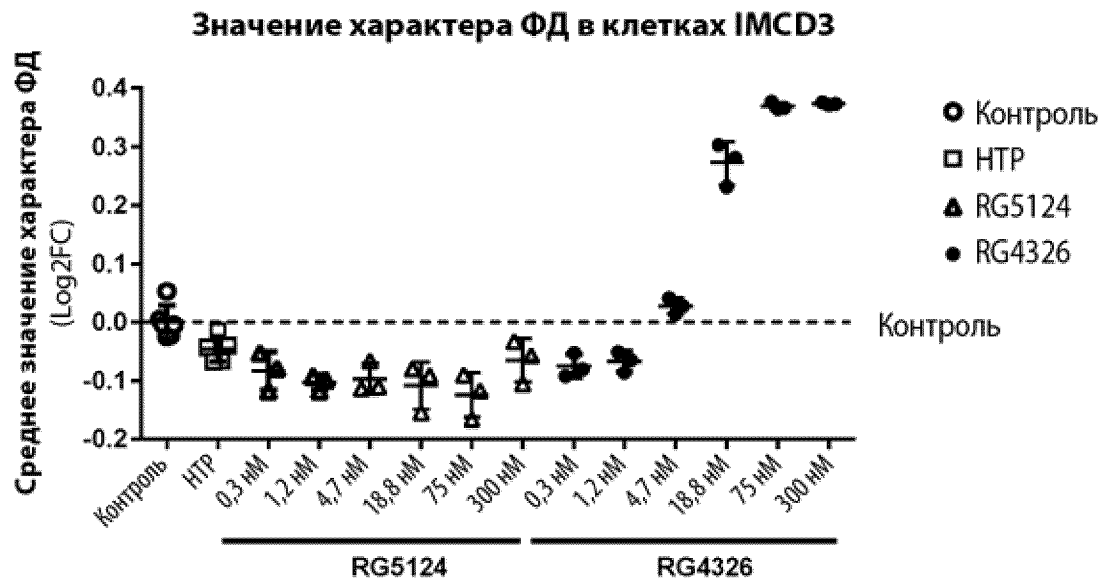
Фиг. 1А



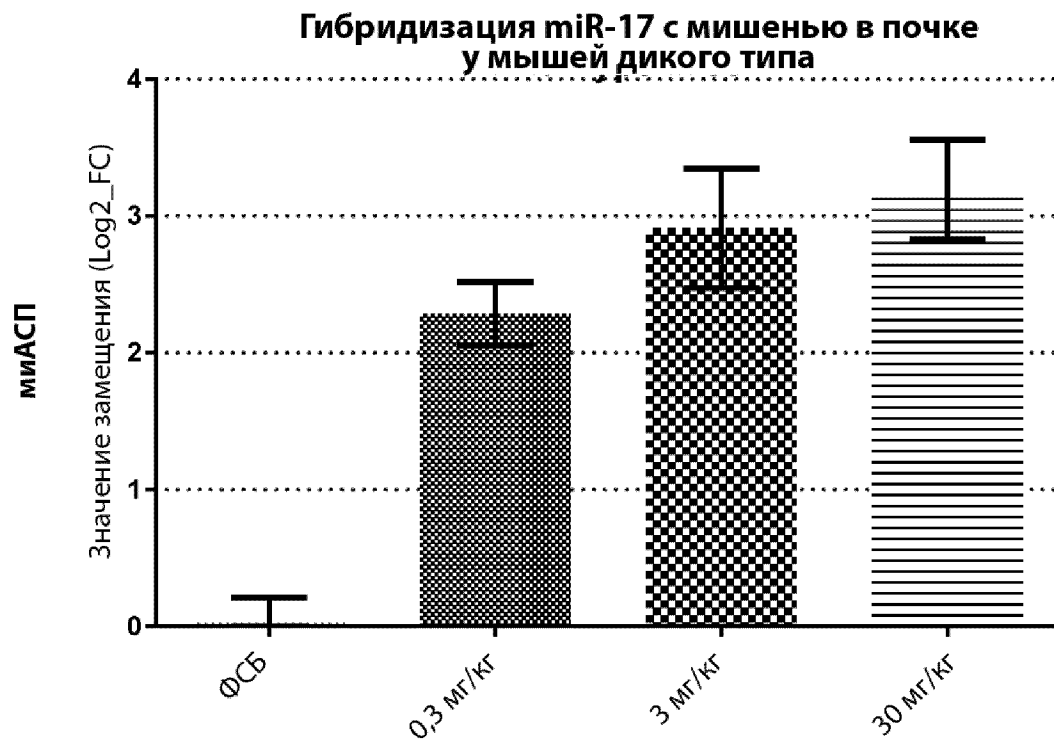
Фиг. 1В



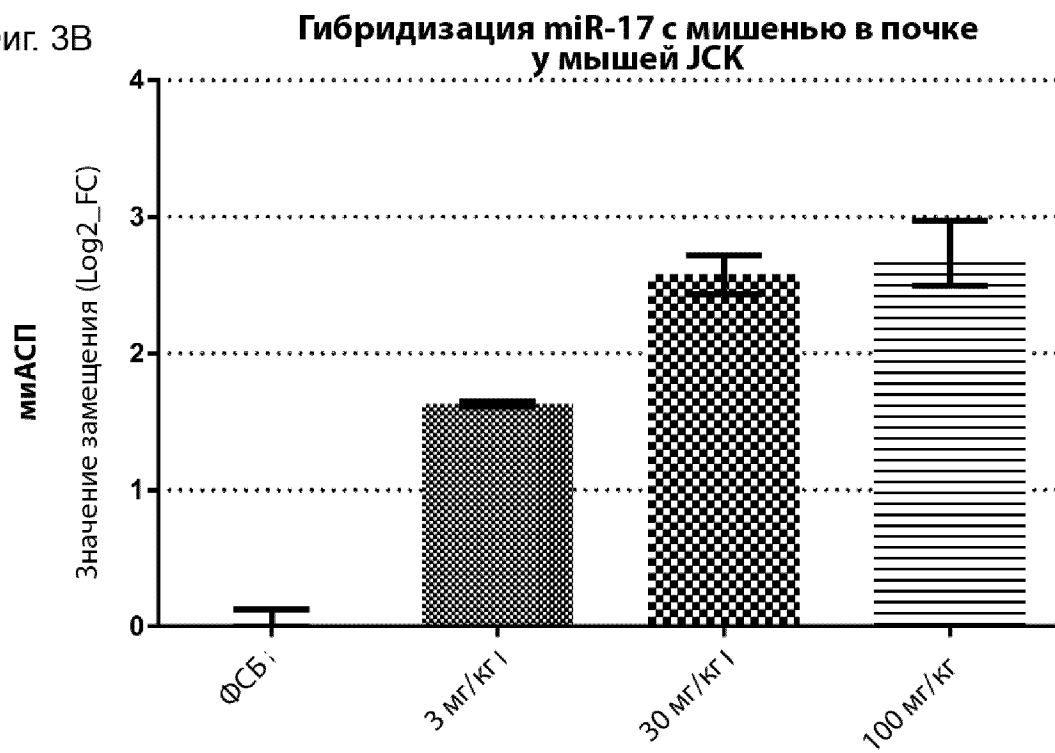
Фиг. 2



Фиг. 3А

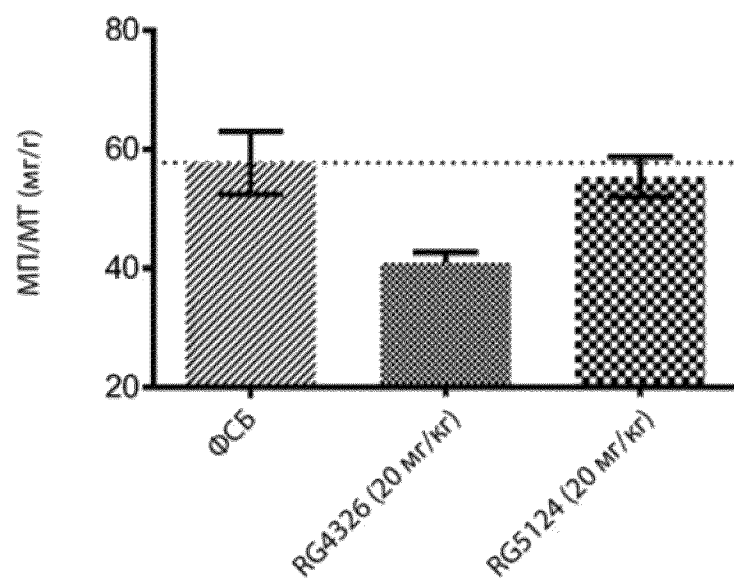


Фиг. 3В



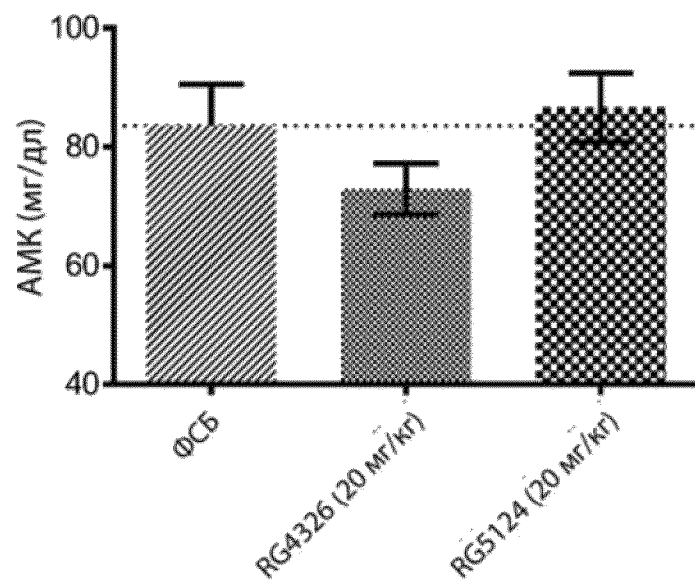
Фиг. 4А

Коэффициент отношения массы почка/тело
Мыши *Pkd2*-KO

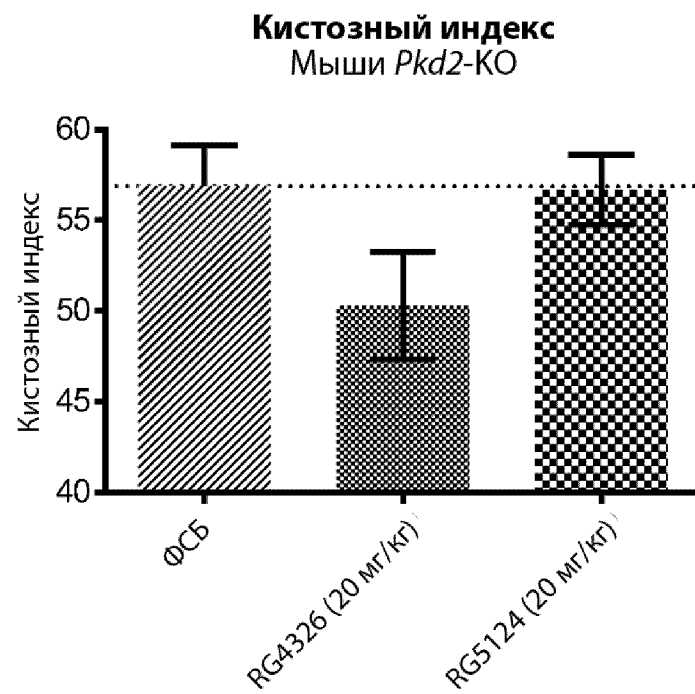


Фиг. 4В

АМК
Мыши *Pkd2*-KO

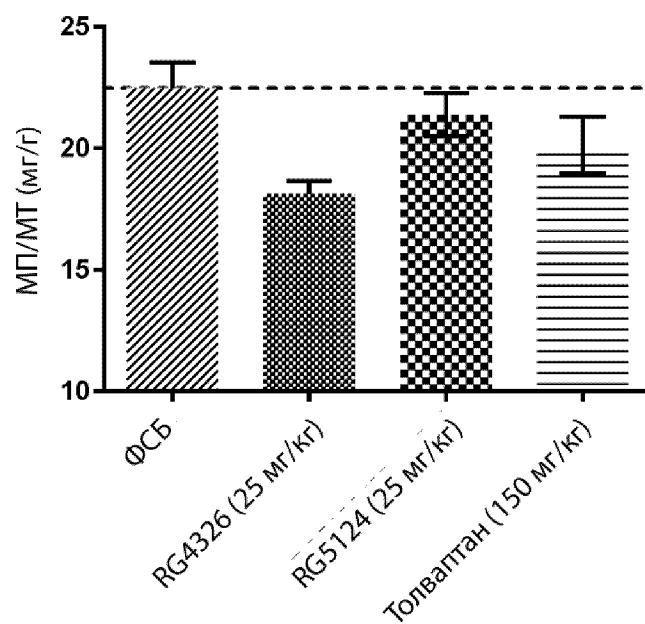


Фиг. 4С



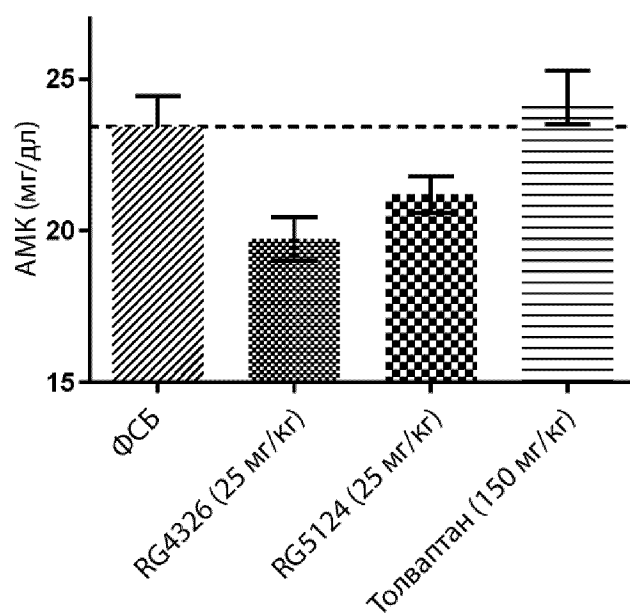
Фиг. 5А

Коэффициент отношения массы почка/тело
Мыши Рсу



Фиг. 5В

АМК
Мыши Рсу



Фиг. 5С

